

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**BDNF KATKILI KİTOSAN TÜP ÜRETİMİ ve FASİYAL SİNİR KESİSİ
TEDAVİSİNDE KULLANIMI**

Tunç Eren AKAY

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MALZEME BİLİMİ ve MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HAZİRAN 2020

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**BDNF KATKILI KİTOSAN TÜP ÜRETİMİ ve FASİYAL SİNİR KESİSİ
TEDAVİSİNDE KULLANIMI**

Tunç Eren AKAY

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MALZEME BİLİMİ ve MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HAZİRAN 2020

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BDNF KATKILI KİTOSAN TÜP ÜRETİMİ ve FASİYAL SİNİR KESİSİ
TEDAVİSİNDE KULLANIMI**

**Tunç Eren AKAY
MALZEME BİLİMİ ve MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından FYL – 2019 – 4822 nolu proje ile desteklenmiştir.**

HAZİRAN 2020

ÖZET

BDNF Katkılı Kitosan Tüp Üretimi ve Fasiyal Sinir Kesisi Tedavisinde Kullanımı

TUNÇ EREN AKAY

Yüksek Lisans Tezi, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Numan HODA

Haziran 2020; 56 sayfa

Kitosan; kitinin deasetile edilmesiyle elde edilen, zincir yapıda bir polisakkarittir. Antibakteriyel özellik göstermesi, biyouyumlu, yenilenebilir ve en önemlisi doğal bir polimer olması sebebiyle birçok alanda yaygın olarak kullanılan bir polimer olmuştur. Özellikle biyouyumlu ve biyobozunur olma özelliği, kitosanın kozmetik, tıp, biyomedikal ve biyomühendislik alanlarında kullanımını yıldan yıla arttırmış ve geleneksel olarak kullanılan metal ve kompozit temelli implant malzemelerinin yerini kitosan bazlı implant malzemeleri almaya başlamıştır.

Kafatası sinirlerinden yedinci çifti oluşturan fasiyal sinir, pons ve omurilik soğani arasından çıkarak yüz ifadeleri, mimikleri ve tat duyusunun iletilmesini kontrol eder. Baş ve boyun travmaları esnasında fasiyal sinir yaralanmalarına sıklıkla rastlanılmaktadır. Bu sinirin yaralanmalar sonucunda işlevini tamamen ya da kısmî olarak yerine getirememesi Fasiyal Sinir Paralizi olarak tanımlanır ve bu rahatsızlık psikolojik, estetik ve ekonomik sorunlara yol açar. Sinir travmaları sonrası oluşan kesik ya da kopmaların tedavi edilmesi ve onarılması için en iyi bilinen ve en yaygın kullanılan yöntem sinir uçları koaptasyonudur. Bununla birlikte, mikrocerrahi ve nörootoloji alanlarındaki ilerlemelere rağmen, insanda fasiyal sinir kesisi ve koaptasyonu sonrası işlevsel iyileşme istenilen düzeyde olamamaktadır.

Bu çalışmada, kitosan polimerlerinden elektro eğirme yöntemiyle biyobozunur nanolifler üretilmiş ve bu liflerden en homojen lif dağılımına sahip, boncuksuz lif parametreleri kullanılarak içi boş tüpler üretilmiştir. Üretilen tüpler protein yapıdaki BDNF molekülü ile katkılanarak fasiyal sinirin ana gövdesinin transvers kesisinin iki ucu arasına yerleştirilmiş ve BDNF katkılı kitosan tüplerin aksonal rejenerasyon ve fonksiyonel iyileşme üzerine etkisi araştırılmış ve gözlemlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELE: Kitosan, kitosan tüp, fasiyal sinir, BDNF, aksonal rejenerasyon

JÜRİ: Prof. Dr. Numan HODA

Prof. Dr. İbrahim Halil MUTLU

Prof. Dr. Yasin ARSLAN

ABSTRACT

Production of BDNF Doped Chitosan Tubes and Its Usage on Facial Nerve Injuries

Tunç Eren AKAY

MSc Thesis in Material Science and Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Numan HODA

June 2020; 56 pages

Chitosan is a chain-structured polysaccharide obtained by deacetylation of the chitin. Because of its antibacterial properties, being biocompatible, renewable, and natural polymer, it has been a widely used in many fields. Especially its biocompatibility and biodegradability has increased the use of chitosan in the fields of cosmetics, medicine, biomedical and bioengineering. It has started to use instead of traditionally used metal and composite-based implant materials.

The facial nerve is the seventh pair from the skull nerves, which exits between the pons and the spinal. It controls the facial expressions, and transfer of the impulse of taste. Facial nerve injuries are frequently encountered during head and neck trauma. Fully or partially failure of this nerve because of injuries is defined as Facial Nerve Paralysis and this disease causes psychological, aesthetic, and economic problems. The best known and the most common method for treating and repairing cuts or breaks after nerve traumas is nerve coaptation. However, despite advances in microsurgery and neurotology, functional recovery after facial nerve damage and coaptation is not at the desired level.

In this study, biodegradable nanofibers were produced from chitosan polymers by electro spinning method and hollow tubes were produced from these fibres by using the most homogeneous distribution, nonwoven fibre parameters. The produced tubes were doped with the protein structure, BDNF molecule, and placed between the two ends of the transverse section of the main body of the facial nerve, and the effect of BDNF doped chitosan tubes on axonal regeneration and functional recovery was investigated.

KEYWORDS: Axonal regeneration, BDNF, chitosan, chitosan tube, facial nerve

COMMITTEE: Prof. Dr. Numan HODA

Prof. Dr. İbrahim Halil MUTLU

Prof. Dr. Yasin ARSLAN

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimi hazırlarken yaptığım çalışmalarda bana her türlü imkânı sunan, fikir ve tavsiyeleriyle bana yol gösteren saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Numan HODA'ya teşekkürlerimi borç bilirim.

Üretilen BDFN katkılı kitosan tüplerin hayvan deneylerinde kullanımı sırasında desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Levent SARIKCIOĞLU'na teşekkür ederim

Hayatımın her alanında bana destek olan, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen sevgili eşim Buket Akay'a sonsuz teşekkür ederim. Son olarak tez çalışmalarını FYL-2019-4822 nolu yüksek lisans projesi ile maddi olarak destekleyen *Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine* teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Biyomalzemeler.....	3
2.1.1. Biyouyumluluk	3
2.1.2. Biyoaktivite.....	3
2.1.3. Biyobozunurluk	4
2.1.4. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler	4
2.2. Kitosan.....	7
2.2.1. Kitosan ve Kimyasal Özellikleri.....	7
2.2.2. Kitosanın Üretim Aşamaları	8
2.2.3. Kitosanın Deasetilasyon Derecesinin Belirlenmesi.....	10
2.2.4. Kitosanın Molekül Ağırlığının Belirlenmesi	11
2.2.5. Kitosanın Endüstriyel Kullanımı	12
2.2.6. Kitosanın Doku Mühendisliğinde Kullanımı.....	12
2.3. Elektro Lif Çekim Yöntemi ve Kitosan	16
2.4. BDNF ve Sinir Hücrelerinin Yenilenmesine Etkisi	18
3. MATERYAL ve METOT	20
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	20
3.2. Karides Kabuklarından Kitosan Üretimi	20
3.2.1. Karides Kabuklarının Kitosan Üretimine Hazırlanması.....	20
3.2.2. Karides Kabuklarının Demineralizasyonu.....	21
3.2.3. Karides Kabuklarının Deproteinizasyonu.....	21
3.2.4. Kitinin Renk pigmentlerinden Arındırılması.....	21

3.2.5. Kitin Polimerinden Kitosan Polimerinin Elde Edilmesi.....	21
3.3. Kitosanın Deasetilasyon Derecesinin Belirlenmesi	21
3.4. Kitosanın Molekül Ağırlığının Belirlenmesi.....	21
3.5. Kitosan Elektro Liflerin Üretimi	22
3.5.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanması	22
3.5.2. Elektro Lif Üretimi İçin Optimum Derişimin Belirlenmesi	22
3.5.3. Elektro Lif Üretimi İçin Optimum Cihaz Parametrelerinin Belirlenmesi ...	22
3.6. BDNF Katkılı Kitosan Tüplerin Üretimi.....	24
3.6.1. Kitosan Tüplerin Üretimi ve Bozunma Sürelerinin Belirlenmesi	24
3.6.2. Tüplerin BDNF ile Katkılanması.....	24
3.7 Üretilen Tüplerin Mikroskop Görüntülerinin Alınması	25
3.8. BDNF Katkılı Kitosan Tüplerin Hayvan Deneylerinde Kullanılması	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	29
4.1 Kitosanın Karakterizasyonu	29
4.1.1. Üretilen Kitosanın Deasetilasyon Derecesi	29
4.1.2. Üretilen Kitosanın Molekül Ağırlığı	30
4.2. Kitosan Elektro Liflerin Üretimi ve Karakterizasyonu	31
4.2.1 Elektro Lif Üretimi İçin Optimum Derişimin Belirlenmesi	31
4.2.2. Elektro Lif Üretimi İçin Optimum Cihaz Parametrelerinin Belirlenmesi ...	32
4.2.3. Üretilen Liflerin Optik Mikroskop Görüntüleri.....	35
4.2.4. Üretilen Liflerin SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Görüntüleri.....	39
4.3. Kitosan Tüplerin Bozunma Testi Sonuçları	42
4.4. Katkılı Kitosan Tüplerin BDNF Miktarlarının Belirlenmesi	42
4.4. Hayvan Deneylerinin Sonuçları	43
6. SONUÇLAR	44
7. KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “BDNF Katkılı Kitosan Tüp Üretimi ve Fasiyal Sinir Kesisi Tedavisinde Kullanımı” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

28./09./2020

Tunç Eren AKAY

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

L	: litre
A	: absorbans
λ	: dalga boyu
cm	: santimetre
g	: gram
mL	: mililitre
η_r	: görelî viskozite
η_{sp}	: özgül viskozite
η_{red}	: indirgenmiş viskozite
$[\eta]$	: içsel viskozite
M_v	: ortalama molekül ağırlığı
$^{\circ}\text{C}$	: selsiyus
M	: molarite
W	: watt
kV	: kilovolt
h	: saat
mm	: milimetre
mg	: miligram
s	: saniye
dak	: dakika
t	: zaman
nm	: nanometre

Kısaltmalar

BDNF	: Beyin türevli nörotrofik faktör
CNTF	: Silier nörotrofik faktör
PLA	: Polilaktik asit
PGA	: Poliglikolik asit
PLGA	: Poli(laktik – ko – glikolik) asit
DD	: Deasetilasyon derecesi
DA	: Asetilasyon derecesi
MA	: Molekül ağırlığı
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
PVA	: Polivinil alkol
PEO	: Polietilen oksit
SEM	: Taramalı elektron mikroskopu
YMAPEO	: Yüksek molekül ağırlıklı polietilen oksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Selüloz, kitin ve kitosan moleküllerinin fonksiyonel gruplarının şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.2. Kitinden kitosan ekstraksiyonunun şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.3. Kitosanın FTIR spektroskopisi ve karakteristik pikleri.....	10
Şekil 2.4. Elektro lif üretim cihazı ve lif oluşumunun gösterimi.....	17
Şekil 3.1. Lif üretimi için kullanılan NE3 laboratuvar tipi elektro lif çekim cihazı.....	23
Şekil 3.2. Elektro lif çekim cihazı yüksek gerilim güç kaynağı.....	23
Şekil 3.3. (a) Toplayıcı ve iğne arasındaki mesafe ve mesafe değiştirici kaldıraç sistemi (b) akış hızının belirlenmesi için kullanılan infüzyon sıringa pompası.....	23
Şekil 3.4. Cihaz tasarımındaki değişikliğin gösterilmesi.....	24
Şekil 3.5. Üretilen liflerin optik mikroskop ile görüntülenmesi.....	25
Şekil 3.6. Deney hayvanı üzerinde uygulanan kesi	26
Şekil 3.7. Fasiyal sinir ve dalları.....	27
Şekil 3.8. (a) BDNF katkılı kitosan tüpün doku içerisine yerleştirilmesi (b) BDNF katkılı kitosan tüpün fasiyal sinir transvers kesisine implante edilmesi.....	27
Şekil 3.9. (a) Hasarsız fasiyal sinir (b) fasiyal sinire transvers kesi uygulanması (c) BDNF katkılı kitosan tüpün fasiyal sinir transvers kesisine implante edilmesi.....	27
Şekil 3.10. a-b) Sağlıklı farenin vibrisseal kıllarının görüntüsü c) analiz amacıyla 3. sıranın en arka 2 kılının sağlam bırakılması sonrası görüntü	28
Şekil 3.11. Vibrisseal kılların kıllarının protraksiyon ve retraksiyon açıları arasındaki farkın ölçülmesi	28
Şekil 4.1. Farklı deasetilsayon sürelerine sahip örneklerin FTIR spektrumları.....	29
Şekil 4.2. Farklı deasetilsayon sürelerine sahip örneklerin FTIR spektrumlarının 1600-3500 cm^{-1} aralığındaki yakınlaştırılmış görüntüsü	29
Şekil 4.3. İndirgenmiş viskozitenin konsantrasyona bağlı değişimi	31
Şekil 4.4. Örnek L3517510'un lif çapı dağılım grafiği.....	34
Şekil 4.5. Örnek L3517515'in lif çapı dağılım grafiği.....	34
Şekil 4.6. Örnek L3517520'nin lif çapı dağılım grafiği.....	35

Şekil 4.7. Lif oluşumunun gözlemlenmediği örneklerin 10 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü	36
Şekil 4.8. Boncuklu lif yapısının 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü.....	36
Şekil 4.9. Örnek L252010'un 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü.....	36
Şekil 4.10. Örnek L3012510'nun 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü.....	37
Şekil 4.11. Örnek L3012515'in 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü.....	37
Şekil 4.12. Örnek L3012520'nin 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü.....	37
Şekil 4.13. Örnek L3517510'un 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü.....	38
Şekil 4.14. Örnek L3517515'in 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü.....	38
Şekil 4.15. Örnek L3517520'nin 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü.....	38
Şekil 4.16. Örnek L3517510'un sırasıyla 2500 X,5000 X ve 10000 X büyütme oranlı SEM görüntüleri	39
Şekil 4.17. Örnek L3517515'in sırasıyla 2500 X,5000 X ve 10000 X büyütme oranlı SEM görüntüleri	40
Şekil 4.18. Örnek L3517520'nin sırasıyla 2500 X,5000 X ve 10000 X büyütme oranlı SEM görüntüleri	41
Şekil 4.19. Kalan kitosan kütlelerinin zamana bağlı değişimi	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Yapısal değişkenler ve özellikler arasındaki ilişki.....	8
Çizelge 2.2. Kitosanın biyomalzeme olarak kullanım alanları ve bu kullanıma imkân sağlayan özellikleri	13
Çizelge 4.1. Deasetilasyon derecesinin işlem süresine bağlı değişimi.....	29
Çizelge 4.2. Kitosan çözeltilerinin viskozimetrede akış süreleri ve viskozite değerleri..	29
Çizelge 4.3. Değişen kitosan konsantrasyonuna göre lif oluşum durumu.....	31
Çizelge 4.4. Uygulanan gerilim ve akış hızının lif oluşumu ve lif yapısına etki.....	31
Çizelge 4.5. Uygulanan gerilim ve toplayıcı – iğne arası mesafenin ortalama lif çapına etkisi.....	33
Çizelge 4.6. Örneklerdeki azot miktarının kütlece yüzdeleri.....	41
Çizelge 4.7. Vibrisseal kılların motor performansının biyometrik analizi.....	43

1. GİRİŞ

Biyolojik sistemlerle etkileşim halinde olan, tedavi, onarım, destek vb. amaçlarla kullanılan malzemeler biyomalzemeler olarak tanımlanmaktadırlar. Bu malzemeler biyolojik olarak aktif olmakla beraber canlı dokulara da uyumluluk göstermelidirler. Genellikle tıp ve biyomedikal alanlarında geniş kullanım alanına sahip olan biyomalzemeler, doku mühendisliği, organ ve vücut uzuvlarının onarılması ya da yapay olarak üretilmesinde sıkça kullanılmaktadırlar. Canlı ortamla etkileşim halinde olmaları sebebiyle biyomalzemelerin toksik özellik göstermemesi ve yeri geldiğinde antibakteriyel özellik göstermeleri gerekmektedir. Ayrıca tedavi sürecinin en verimli şekilde tamamlanması için bozunma hızları da düşük olmalıdır. Bozunma sonrasında toksik etki yaratacak kalıntıların olmaması da önemli bir noktadır.

Biyomalzemeler laboratuvar koşullarında sentetik olarak elde edilebildikleri gibi, doğal oluşumlu da olabilirler. Malzeme özellikleri ve kaynakları göz önüne alındığında biyomalzemeleri metalik, polimerik, kompozit olarak sınıflandırabilmek mümkündür. Hangi tür malzemenin kullanılacağına uygulamanın yapılacağı doku karar vermektedir. Diş ve kemik gibi sert dokular için üretilen implantlar genellikle metal, metal bazlı kompozit ya da seramik bazlı yüksek mekanik özellik gerektiren malzemelerden seçilirken, deri, sinir doku, kas dokusu ve iç organlar için üretilen implant ve destek malzemeleri daha çok polimer ve polimer bazlı malzemeler arasından seçilmektedir. Seçilen malzemeler hedef dokuda tahribata ya da zehirli bir etkiye yol açmadan, hücre göçüne, madde alışverişine ve hücre tutunmasına elverişli olmaları ve en önemlisi bağışıklık sistemine etki etmemeleri gerekmektedir (Catledge vd., 2007). Bu sebeple gözenekli ve dallı yapıların doku mühendisliği alanındaki uygulamalara daha elverişli olduğu belirtilmiştir (Ko vd., 2003). Doku iskeletleri ve dolgu malzemelerinde kullanılan biyomalzemeler hücreleri mekanik yönden desteklediği gibi hücre ve dokuların 3 boyutlu formunun oluşumuna da yardımcı olmalıdır, ayrıca, doku ve organların onarımına yardımcı olarak o doku grubunun fonksiyonel özelliklerinin de korunup devam etmesini sağlamalıdır. Belirtilen sebeplerden dolayı doku mühendisliğinde kullanılan kitin, polihidroksialkonat ve alginat bazlı malzemelerin bu alan için büyük bir potansiyelinin ve uygulama alanının olduğu ve bu doğal polimerlerin yerinin sentetik polimerlerle doldurulamayacağı yapılan araştırmalarla ortaya konuşmuştur (Bedian vd., 2017). Bu çerçeveden bakıldığında selülozdan sonra doğada en yüksek oranda bulunan kitin ve kitinin deasetile edilmesiyle elde edilen kitosan, doğal yapısından kaynaklanan antibakteriyel ve antioksidan özellikleri de bünyesinde barındırarak, biyomalzeme sentezi ve uygulamalarında oldukça geniş bir paya sahiptir olmuştur. Sünger, hidrojel, lif ve yapıda üretilmesi kitosanın farklı doku hücreleri için kullanımına imkân sunmuş, özellikle fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerinin metalik implantlara göre daha üstün olmasıyla kitosan kullanımı için avantaj sağlamıştır. Metabolizma için gereken mineraller ile katkılanabilme, gözenekli yapıya sahip olma, gözenek boyutlarının kontrol edilebilmesi, genleşme ve şişme yeteneğine sahip olma, protein Emilimi yapabilme, hücre tipine uygun yüzey fonksiyonları ve kimyasalları ile modifiye edilebilme özelliklerine ve yüksek mekanik dayanıma sahip olması, kitosanın biyomalzeme olarak kullanımının doğru bir tercih olduğunu ortaya koymaktadır (Pellá vd., 2018).

Fasiyal sinir, yüz ifadesi kaslarını kontrol eden, dilin ön tat merkezi reseptörlerini kontrol eden ve kafa tasının dış bölgesinde ter, tükürük bezi gibi birden fazla bezi kontrol etme gibi önemli fonksiyonlara sahip bir sinir olup kafatası sinirlerinin yedinci çiftini oluşturur. Merkezi sinir sisteminden çevresel sinir sistemine, yüzü saran sinir ağlarına, kadar uzun bir seyir gösterir ve çok çeşitli travmalardan etkilenebilmektedir (Chhabda vd. 2020). Yüz siniri yaralanmaları fonksiyonel ve estetik hasarlar doğurabilecek sonuçlara sahiptir. Özellikle dış kafatası travmalarında klinisyenleri zorlayıcı hasarlara rastlanmaktadır. Hastalarda, derhal koaptasyon gerektiren, sinirde kesi ya da kopuk şeklindeki yaralanmalara rastlanılmaktadır (Kannan vd., 2020). Sinir hasarına ve yaralanma bölgesine bağlı olarak, kısmi ya da kalıcı yüz felci, tat alma duyusunda azalma ya da körelme, istemsiz yüz refleksleri ya da kontrolsüz mimik oluşumu gözlemlenebilmektedir. Bu rahatsızlıklar tedavi sürecinin zahmetli olması sebebiyle ekonomik, estetik deformasyon sebebiyle psikolojik sorunlara sebep olmaktadır. Fasiyal sinir paralizi olarak isimlendirilen bu tarz rahatsızlıklar mikro cerrahi yöntemlerle tedavi edilmeye çalışılmakta fakat tam bir rejenarasyon ve onarım gerçekleşmediği için ortaya çıkan sonuçlar tatmin edici olmamaktadır. Sinir hücrelerinin yenilenme hızlarının düşük olması ve hatta yaşa bağlı olarak çoğu zaman yenilenmenin durması fasiyal sinir hasarlarının tedavisi önündeki en büyük engeldir. İyileşme sürecinin başarıyla tamamlanabilmesi için sinir hücresi üzerindeki aksonal kopuk ya da kesiklerin tamamen giderilmesi gerekmektedir. Fasiyal sinir zedelenmelerinin onarımı için farklı yöntemler denenmiş olsa da tam bir başarı sağlanamamaktadır. Sinirsel onarım için yaygın olarak kullanılan metotlardan biri mikrocerrahi operasyonlarla sinir kesisinin dikim işlemi uygulanmaktadır. Bu yöntemin en önündeki en büyük engel fasiyal sinirin rejenarasyon sırasında dallanma yapmasıdır. Dallanma sonucu oluşan yeni uzantılar hedef doku dışındaki dokulara aşılırlar (Vleggeert-Lankamp vd., 2005). Bu durum değişken göz kırpmaya reflekslerine, konuşma güçlüklerine ve istemsiz kas seğirmelerine sebep olmaktadır. Bu tarz yaralanmaların tedavisi için rejenarasyon hızını artırıcı malzemeler ve aşılmanmayı engelleyici yollar aranmaktadır. Bu soruna çözüm olabilecek adaylar arasında beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF) ve tüp yapılı polimerler farklı yöntemler ile çözüm olarak önerilmiştir. Kohmura vd. (1999) BDNF'in fasiyal sinirde GAP-43 mRNA açılımı ve sentezini, topikal uygulanan BDNF'in fasiyal sinir rejenerasyonunu arttırdığını rapor etmişlerdir. Yetiser ve Kahraman (2008) ise BDNF ve silier nörotrofik faktör (CNTF) kullanımının fasiyal sinirin kesi ve ezi hasar modellerinde zamana bağlı olarak değişimlerini çalışmışlardır. BDNF seviyesinin travmadan bağımsız şekilde ilk birinci haftada artış gösterdiğini ve bunun geçici sürdüğünü rapor etmişlerdir. Lee vd. (2014) ise BDNF ve CNTF'nin kovalent bağlandığı kollajen hidrojel tüpler ile fasiyal sinir tamiri gerçekleştirmişler ve fasiyal sinir rejenerasyonundan anlamlı seviyede artış gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Benzer araştırmalar göstermiştir ki kitosan tüpler de sinir kesilerinin tedavisi için kuvvetli bir aday olmuş ve iyileşme sürecine destek olmuştur (Haastert-Talini vd. 2013; Vleggeert-Lankamp vd. 2005).

Yapılan bu çalışmanın amacı ise farklı kişiler ve yöntemlerde denenmesine rağmen beraber etkileri araştırılmamış olan BDNF ve kitosan tüpleri birlikte kullanarak fasiyal sinir paralizi tedavisine etkisinin araştırılmasıdır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Biyomalzemeler

Canlı sistemlerde yaşayan bir sistem, organ, ya da dokunun yerine geçen, canlı sistemlerle etkileşen malzemelere biyomalzemeler denilmektedir. Tarih boyunca insanlar kopan uzuvları, işlevlerini kaybeden organları ya da bütünlüğü bozulan dokularının onarımı için alternatif çözümler aramışlardır. Her deneme doku, organ ve uzuvlar yerine kullanılabilecek malzemelerin daha iyi anlaşılmasını sağlamış ve bu malzemelerin hangi özelliklere sahip olması gerektiğini ortaya koymuştur. Her ne kadar yaklaşık 2000 yıl önce Mısır, Roma ve Çin uygarlıklarında ayak protezleri, diş protezleri kullanılmış ve sonraki dönem uygarlıklarına aktarılmış olsa da biyomalzeme kavramının ortaya çıkmasının 18. yüzyıl sonları itibarıyla olmuş bu alandaki çalışmalar aşama ve gelişme kaydetmeye başlamıştır (Pasinli, 2004). 1912 yılında vanadyum çeliği alaşımlarının vücut içerisinde kullanılmasıyla malzeme ve canlı ortam etkileşimi başlamış oldu. Zamanla platin, gümüş gibi metallerle polimer malzemeler gibi farklı nitelik ve özelliklerdeki malzemelerin kullanılmasıyla biyomalzemelerin sahip olması gereken özellikler anlaşılmaya başlanmıştır (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003). Canlı ortamda toksik kalıntı kalmaması, doku ve organların işlevsel fonksiyonlarının sağlanması ve etki süresi ve biçimi göz önüne alındığında, fonksiyonel bir biyomalzeme biyoyumlu, biyoaktif ve biyobozunur olmalıdır.

2.1.1. Biyoyumluluk

Biyomalzemeler için en önemli özelliklerden biri biyoyumluluktur. Biyoyumluluk, kullanılan malzemelerin biyolojik ortamlar, hücreler ve dokular arasındaki sıvılar, hücreler, dokular veya organlarla kimyasal ve fizyolojik etkileşimlerde bulunması ve bu etkileşimlerin zararlı etki göstermemesi olarak açıklanabilir. Diğer bir deyişle biyoyumluluk biyomalzemelerin biyolojik ortamlardaki performanslarını belirlemek için kullanılan bir parametredir. Kullanılan malzemelerin biyoyumlu olması için bulunduğu canlı ortam tarafından kabul görmesi gerekmektedir. Malzemelerin bulundukları ortamda hücre ve dokuların normal yaşamsal döngülerine, gelişimlerine engel olmaması ve toksik etki oluşturmaması gerekmektedir (Ratner, 2011).

2.1.2. Biyoaktivite

Biyoaktiflik kavramı ilk olarak kemik içi implantasyon sonrasında kullanılan malzemenin hedef dokudan çıkartılmasına karşı gösterdiği direnç olarak tanımlanmıştır (Niu vd., 2014). Biyoaktivite genel olarak belirli bir biyolojik aktiviteyi hızlandırmak ya da kolaylaştırmak anlamına gelmektedir. Biyoaktif malzemeler, insan vücudunun yumuşak ve sert dokularına yapışarak doku yenilenmesini teşvik eden, yüzeylerinde bulunan fonksiyonel gruplar yardımıyla hücreler için kılavuzluk edici ve ürettikleri moleküler sinyaller ile hücre çoğalması, yer değiştirmesi, farklılaşması, protein sentezi ve mineralizasyon süreçlerini düzenlemek için büyüme faktörlerini içeren malzemelerdir (Campoccia vd., 2013; Hubbell, 1999).

2.1.3. Biyobozunurluk

Biyobozunurluk, bir malzemenin biyolojik ajanlar tarafından bozunabilme potansiyelinin bir ölçüsüdür. Başka bir deyişle malzemenin kimyasal bağlarının biyolojik ortamlardaki mikroplar ve enzimler yardımıyla parçalanabileceği anlamına gelmektedir (Pischedda vd. 2019). Biyobozunurluk medikal uygulamalar için dikkate alınması dikkate alınması gereken çok önemli bir parametredir. Biyomalzemelerin işlevsel özelliklerinin canlı ortamda etkin tutmak için gereken zaman, sıcaklık ve çevresel koşullar bozunma süresini, dolayısı ile de biyobozunurluk faktörünü doğrudan etkileyen etmenlerdir (Torgbo ve Sukyai, 2020). Bozunma hızının istenilen şekilde ayarlanabilmesi zor bir prostestir. Etkin maddelerin kontrollü olarak salınabilmesi için malzemelerin kimyasal yapılarında ve bağlarında değişiklikler yapılarak farklı bozunma hızlarına sahip biyomalzemeler elde edilirler. Uygulama yapılan dokunun tedavi, onarım ve yenilenme sürecine bağlı olarak bozunma süresin en doğru şekilde belirlenmesi gerekmektedir.

2.1.4. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler

Doku mühendisliği, organ ya da dokuların laboratuvar ortamında veya yine canlı vücudu içerisinde üretiminin yapılması ve hastalara uygulanması şeklinde tanımlanabilir. Biyomalzemeler doku mühendisliğinde önemli bir role sahiptir. Kayıp veya arızalı dokularla değiştirilmesi ya da onarılması için dokuya özgü gen dizilimi ve ekspresyonunu koruyarak, hücrelerel sinyallerin yeni fonksiyonel dokuya iletilmesini ve bu sayede büyüme, hücre organizasyonu, hücre çoğalması ve hücrelerel olayların aktive edilmesini sağlarlar. Biyomalzemeler hücrelerin veya hücre göçü, hücre tutunması ve büyüme faktörü gibi biyoaktif etmenlerin istenilen bölgeye lokalize edilmesini ve iletimini kolaylaştırarak uygun yapıya sahip yeni dokuların oluşumu için üç boyutlu alanlar tanımlayarak uygun işlevle sahip yeni dokuların gelişimine rehberlik ederler (Kim ve Mooney, 1998). Ponder vd. (1991) geliştirilen doku veya hücreler her ne kadar bir malzeme matrisine bağlanmadan da vücuda enjekte edilebilseler de nakledilen hücrelerin vücut içerisindeki yerleşmesini kontrol etmek bir hayli zor olduğunu belirtmiştir. Bununla birlikte hücrelere özgünlük katan ve hücre zarı üzerinde bulunan glikolipit ve glikoprotein yapıları zincirlerin canlı içerisinde serbest dolaşımda bulunması da büyük bir tehlike arz etmektedir. Bu yapılar her doku hücresi için farklı bir dizilim ve kod taşıdıkları için, vücudun farklı bölgelerinde yabancı yapılar olarak algılanıp bağışıklık sistemini tetikleyebilirler. Bunun sonucunda sağlıklı dokuların zarar görmesi, kontrolsüz hücre çoğalması gibi olumsuzlukların görülmesi yüksek ihtimal taşımaktadır. Özellikle memeli hücrelerinde farklılaşma ve hücre göçü sonucunda hücre yığınlarının kontrolsüz büyümesi ve uzuv şeklinin kaybolması da olası sonuçlardan biri olarak raporlanmıştır. Bu olumsuzlukların giderilebilmesi için nakledilen doku grubu bir destek yapıyla beraber implante edilmelidir. Biyomalzemelerden oluşan bu destek yapılar hücrelere mekanik dayanım ve sürdürülebilir farklılaşma konusunda fayda sağlamaktadırlar. Aynı zamanda yapıya eklenebilen fonksiyonel ya da radikal gruplar büyüme faktörü ve hücre göçünü kontrol edici sinyaller oluşturarak yeni dokunun kusursuz uyumunu sağlarlar (Kim ve Mooney, 1997). Ayrıca yapıya eklenecek olan gözenekli yapılar sayesinde yüzey alanı – hacim oranına sahip olan biyomalzemeler yüksek hücre yoğunluğunun olduğu dokularda hücrelerin dağılması ve ekstra tutunma yüzeyi oluşturmasıyla doku ve organ gelişimini destekleyici etkide bulunurlar. Bu noktada biyomalzemelerin tasarım parametreleri üzerinde çalışılan hedef dokunun gelişiminde çok önemli bir etmendir. Değiştirilebilir gözenek boyutları sayesinde hücre bölünme ve göç hızı kontrol altına

alınabilmektedir. Yukarıda bahsettiğimiz özelliklerin polimer malzemeler tarafından rahatlıkla sağlanabileceği göz önünde bulundurulduğunda, polimerlerin doku iskeleti olarak kullanımı kaçınılmaz olmaktadır.

Doku mühendisliği alanında biyomalzeme olarak kullanılan polimerler en temel şekilde doğal ve sentetik polimerler olarak ikiye ayrılabilirler. Sentetik polimerler laboratuvar ortamında sentezlenen polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), poli(laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) gibi polimerlerken, kolajen, alginat, kitin ve kitosan biyomalzeme olarak kullanılan doğal polimerlere örnek olarak verilebilir. Laktik asit ve glikolik asit gibi moleküllerin esterleşmesiyle oluşan PLA, PGA ve PLGA polimerleri doku mühendisliği çalışmalarına oldukça geniş bir yere sahiptir. Bu polimerlerin yapısında bulunun ester bağları hızlıca hidrolize olma eğilimindedirler ve polimerlerin enzimsiz ortamlarda da bozunmasını sağlarlar. Bozunma sonrasında organizmada her hangi bir toksik etki bırakmadan karbondioksit ve su olarak dışarı atılırlar (Williams, 2008). Bu polimerlerin bozunma süreleri birkaç hafta olabileceği gibi, molekül ağırlıkları, kristal yapıları ve zincir uzunluklarına bağlı olarak birkaç yıl da olabilmektedir. Bu durum kullanılan biyomalzemelerin hedef dokunun tedavi ve iyileşme süresine bağlı olarak modifiye edilmesine imkân sağlamaktadır. Ayrıca termoplastik polimerler sınıfına dahil olan bu polimerler, düşük erime noktaları sayesinde kolayca şekillendirilebilirler. Bu sayede gaz köpürtme, kalıplama ve ekstrüzyon gibi yöntemlerle istenilen şekle getirilebilirler. İstenilen şekil, boyut ve gözenek yapısıyla üretilen yapılar boşaltım sistemi elemanları için çok uygun bir doku iskeleti oluşturmaktadırlar (Marler vd., 1998). Özellikle böbrek ve üreter kanalı hücrelerinin çoğaltılıp nakledilmesinde oldukça yaygın bir kullanıma sahiptirler. Amiel ve Atala (1999) yaptıkları çalışmada PGA ve polikarbonat yapıdaki doku iskeletlerini fonksiyonel renal hücrelerinin yenilenmesi ve renal dokuların yeniden inşa edilmesi için kullanmışlardır. Polimer iskelete tohumladıkları böbrek hücrelerini farelerin deri altına yerleştirmişler ve hücrelerin çoğalarak glomelarus benzeri yapılara dönüştüklerini raporlamışlardır. Oluşan tübüllerin deri altında biriken ve çözünen üre ve kreatin gibi atıkların atılması görevini üstlendiğini belirtmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada Haaparanta vd. (2014) ürettikleri PLA temelli kompozit malzemelerin kıkırdak doku üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Ağ yapıda ürettikleri PLA bazlı doku iskeletlerini kolajen ve kitosanla katkılayarak kıkırdak doku hasarlarını tedavi etmeye çalışmışlardır. Sığırların dirsek kıkırdaklarına uyguladıkları tedavi sürecinde, hücre çoğalmasının normal sürece göre daha hızlı olduğunu saptamışlardır. Ayrıca değişken gözenek yoğunluğu ve boyutlarının farklı iyileşme süreçleri doğurduğunu gözlemlemişlerdir. Gözenek yoğunluğunun artmasının, homojen dağılım olması koşuluyla, hücre tutunması ve hücre göçü üzerinde olumlu etkisi olduğunu raporlamışlardır. Sağlanan biyolojik avantajların yanında üretilen doku iskeletlerinin sahip olduğu yüksek mukavemet sayesinde implante edilen bölge hareketli tutulsa dahi doku hasarının büyümediği ve hücre tutunma oranının artmasıyla beraber dolgu malzemesinin eklem bir parçası gibi davrandığını gözlemlemişlerdir.

Doku mühendisliği alanında sadece sentetik polimerler kullanılmamaktadır. Doğal polimerler kolay elde edilebilmeleri, doğada fazlaca bulunmaları, sentetik polimerlere göre daha düşük maliyetli ve en önemlisi biyoyumluluk derecelerinin daha yüksek olmaları sebebiyle daha fazla tercih edilmektedir. Sığır ve koyun yünlerinden elde edilen keratin, balık pulları, derileri ve kemiklerinden ekstrakte edilen kolajen ve kabuklu deniz canlılarından temin edilebilen kitin ile kitosan, doku mühendisliği alanında yaygın

kullanıma sahip doğal polimerlerdir. İkinci dünya savaşı döneminden başlayarak saç tellerinin yapısı ve kimyası merak konusu olmuştur. Özellikle naylon ve polyester liflerin ticarileşmesi ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmasıyla bu polimer gruplarından üretilen liflerin yapay saç olarak kullanılabileceği fikri yaygınlaşmaya başlamıştır. Buna karşın Avustralyalı bilim insanları saç protezleri konusunda sentetik değil doğal polimerlerin kullanılmasının daha doğru olduğunu savunmuşlar ve saç yapısını inceleyerek içerisindeki peptit zincirlerini yani protein yapısındaki keratinleri incelemişlerdir. Saç yapısındaki protein zincirlerinin koyun yünlerindeki protein zincirlerine benzerlikleri fark etmişler ve koyun yünlerinden elde edilecek protein yapıların başka bir deyişle keratin yapıların başta saç protezleri olmak üzere vücudun farklı bölgelerinde tedavi amaçlı kullanılabileceği fikrini ortaya atmışlardır (Rouse ve Van Dyke, 2010). 1970 sonrasındaki gelişmelerle keratin ekstraksiyonu, saflaştırması ve karakterizasyonu daha anlaşılır ve kolay hale gelmiştir. Bu durum keratinin toz, jel, lif ve köpük yapıda sentezlenebilme imkânı sağlamıştır. Üretilen yapılar farklı dokularda tedavi edici ya da destekleyici olarak denenmeye ve etkileri araştırılmaya başlamıştır (Noishiki vd., 1982). Yamauchi vd. (1996) özütlenen edilmiş yün keratinlerden üretilen ürünlerin özelliklerini araştırmış, çözücü ile döküm yöntemiyle ürettikleri keratin filmlerin fizyokimyasal ve biyo-bozunma özelliklerini incelemişlerdir. Saf keratin filmler kırılğan olmasına rağmen, gliserol eklenmesi şeffaf, güçlü, esnek ve biyolojik olarak parçalanabilir bir film ürettiklerini raporlamışlardır. Çalışmalarının devamında ürettikleri filmler farelerin fibroblast hücreleri için destek malzemesi olarak kullanmayı denemişler ve hücre büyümelerini saptayarak keratin filmlerin biyoyumluluk özelliğini ortaya koymuşlardır. Cam üzerindeki hücrelerin büyümesi ile karşılaştırdıklarında, keratin substrat üzerinde hücrelerin yapışma ve büyümesinin daha başarılı olduğunu söylemişlerdir (Yamauchi vd. 1998). Başka bir çalışmada Apel vd. (2008) keratin hidrojellerin periferik sinir rejenerasyonu süresi, nöromüsküler iyileşme ve sinir histomorfometrisine olan etkilerini araştırmışlardır. Hidrojellerin iyileşme sürecini kolaylaştırmanın yanında gibi sinir rejenerasyonunu hızlandırdığını raporlamışlardır. Bu sonuçlar insan saçından yapılan keratin esaslı iskelelerin periferik sinir rejenerasyonunu kolaylaştırabildiğini ve duyu sinirlerinin otogreftlerine eşdeğer nöromüsküler iyileşmeyi destekleyebildiğini ortaya koymuşlardır.

Son yıllarda dikkat çeken bir başka doğal polimer de kolajendir. Enjekte edilebilir kollajen matrislerden kemik rejenerasyonunda kullanılan yapı iskelelerine kadar geniş bir uygulama alanı bulunan kolajen, farklı üretim yöntemlerinin geliştirilmesiyle araştırmalarda ve uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Sığır derisini ve tendonlarından, balık derisi ve pullarından ve hatta timsah derisinden esktrakte edilme imkanı olan kolajen, dünyada en fazla bulunan proteinlerden biri olması doku mühendisliği alanında kullanımını tetiklemiş olsa da biyoyumlu ve bağışıklık sistemine karşı olumsuz bir etkide bulunmaması kolajeni aranılan bir biyomalzeme haline getirmiştir (Sugiura vd. 2009; Guellec vd. 1991; Exposito vd. 2002). Araştırmacılar, hücre göçü ve çoğalması gibi davranışlarının yanı sıra farklılaşma ve fenotip ekspresyonunu incelemek için kolajen iskeleleri kullanmışlardır. Bağ dokunun büyük birçoğunu oluşturan kolajen, deri ve kornea yapısına oldukça benzemektedir. Hem kozmetik hem de biyomalzeme alanında kullanılan kolajen, kozmetik alanda deri kırışıklıklarını gidermek için dolgu malzemesi olarak kullanılmasının yanı sıra, yanık ve doku kaybıyla sonuçlanan yaralanmaların tedavisinde kolajen bazlı doku iskeleleri kullanılmaktadır. Hücre benzerlik ve protein yapısının uyumlu olması hücre çoğalmasını

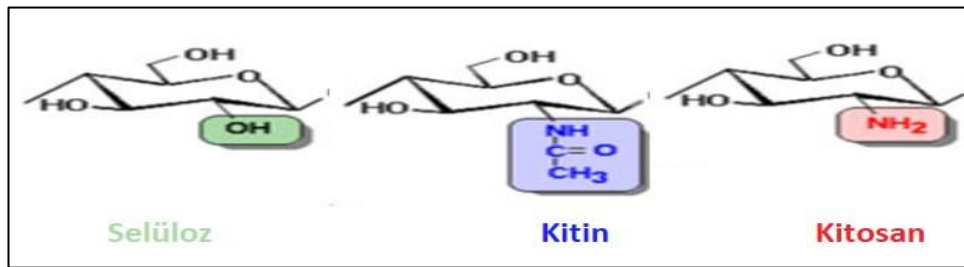
kolaylaştırmış, doku oluşumuna katkıda bulunmuştur (Yannas vd., 1982). Kolajenler epiderma yani deri hücrelerinin yenilenmesine yardım etmesinin yanı sıra yapay doku ve organ üretiminde de kullanılmaktadırlar. Schwab (1999) yaptığı çalışmada kolajen yapılı doku iskeletine ekilen kök hücreler ile kornea tamirinin ve hatta hücre dışı yapay kornea üretiminin mümkün olduğunu söylemişlerdir. Kök hücrelerin yaydığı hücrelerel sinyallerin kolajen molekülleri tarafından iletiliminin kolaylaşmasıyla çoğalan hücrelerin farklılaşarak korneal dokuyu oluşturduklarını ve hatta hücre dışı ortamda zayıf elektronik sinyallerle yönlendirilerek yapay olarak kornea oluşturduklarını raporlamışlardır.

Protein yapılı malzemelerin yanı sıra karbonhidrat yapıda doku malzemeleri de doku mühendisliği alanında sıkça kullanılmaktadır. Özellikle kitosan bu alanda en fazla tercih edilen biyomalzemelerden biri olarak dikkat çekmektedir. Hedef dokunun özelliklerine göre farklı form ve şekillerde üretilme imkânı olan kitosan, doku mühendisliği alanında sıklıkla kullanılan bir biyomalzeme konumundadır.

2.2. Kitosan

2.2.1. Kitosan ve Kimyasal Özellikleri

Son 50 yılda biyomalzeme alanındaki araştırmalar hem elde edilmelerinin kolay olması hem de zengin kaynaklara sahip olunması sebebiyle doğal polimerlere yönelimi sağlamıştır. Doğada en fazla miktarda bulunan selüloz polimerinden sonra sırayı kitin polimeri almaktadır. Kitin, N-asetil-Dglukozaminin, de yine polisakkarit yapıda olan zincirli bir yapı olup, yapısı selüloza benzemektedir. Kitinin deasetile edilmesiyle elde edilen kitosan, antibakteriyel, biyoyumlu, yenilenebilir ve en önemlisi doğal bir polimer olması nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmiş ve birçok alanda yaygın kullanılan bir polimer haline gelmiştir (Shahidi ve Abuzaytoun 2005; Synowiecki ve Al-Khateeb 2003). Karides, ıstakoz, yengeç gibi deniz hayvanlarının kabukları çok yüksek oranda kitin içerdiğinden, bu kabuklar kitosan üretimi için çok önemli kaynaklardır. Kitinin ve kitosanın molekül yapıları çok benzer olmasına karşın, kitin zincirlerindeki asetil fonksiyonel grupların yerine amin fonksiyonel gruplarının yapıya eklenmesiyle kitosan zincirleri elde edilmektedir. Şekil 2.1’de kitin yapısındaki asetil grupların amin gruplarıyla yer değiştirmesi şematize edilmiştir. Asetil grupların zincirden uzaklaştırılma derecesi deasetilasyon derecesi olarak tanımlanır ve kitosan için önemli bir parametredir. Kitin molekülünün kitosan olarak kabul edilmesi için deasetilasyon derecesinin en az %50 olması gerekmektedir. Deasetilasyon derecesi kitin kaynağına, proses süresine ve sıcaklığına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Deasetilasyon derecesi kitosanın molekül ağırlığı, bozunma süresi ve çözünürlüğü üzerinde söz sahibidir.



Şekil 2.1. Selüloz, kitin ve kitosan moleküllerinin fonksiyonel gruplarının şematik gösterimi

Ortalama zincir uzunluğu sabit kalmak suretiyle deasetilasyon derecesi yükseldikçe, molekül ağırlığı düşmekte, bozunma süresi kısalmakta ve çözünürlüğü artmaktadır. Doku mühendisliği uygulamalarında salınım ve tedavi süresine uygun olarak modifiye edilen kitosan moleküllerinin molekül ağırlığı değişkenlik göstermekte olsa dahi deasetilasyon derecesinin en az %80 olması istenmektedir. Yapısal özelliklerine bağlı olarak bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerin değişimi Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1 Yapısal değişkenler ve özellikler arasındaki ilişki

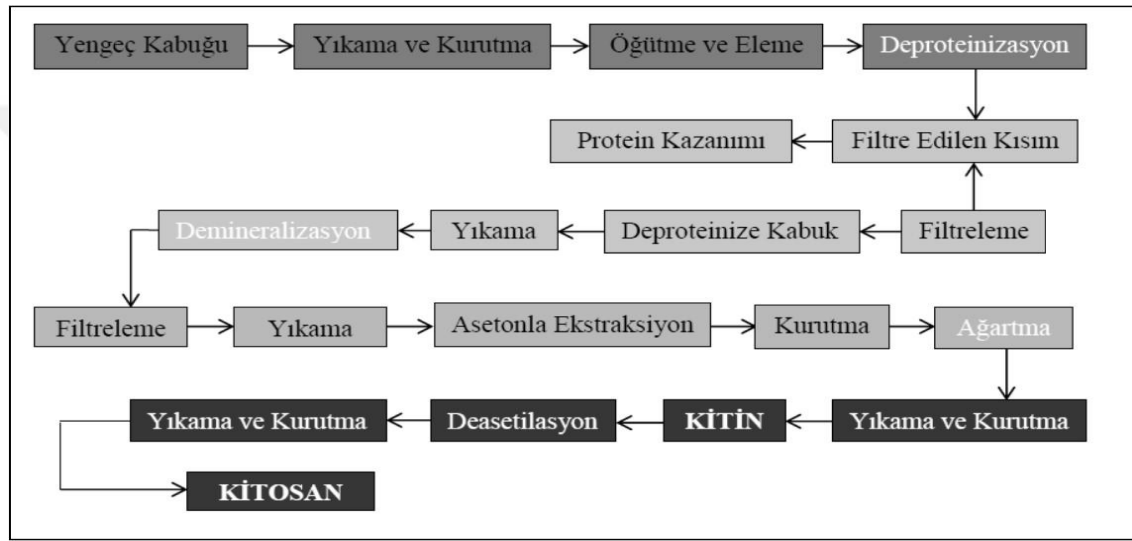
Özellik	Özellik – DD İlişkisi	Özellik- MA İlişkisi	Kaynak
Çözünürlük	DD yükseldikçe artar	MA yükseldikçe azalır	(Cho vd. 2000; Yi vd. 2005)
Kristallenme	DD yükseldikçe azalır	MA yükseldikçe azalır	(Kurita vd., 2000; H. Zhang & Neau, 2001)
Biyobozunurluk	DD yükseldikçe bozunma süresi kısalır	MA yükseldikçe bozunma süresi uzar	(Kofuji vd. 2005; Huang vd. 2004)
Biyouyumluluk	DD yükseldikçe artar	MA yükseldikçe azalır	(Chatelet vd. 2001)
Viskozite	DD yükseldikçe artar	MA yükseldikçe artar	(Okamoto vd. 2002)
Adezyon	DD yükseldikçe artar	MA yükseldikçe artar	(Roldo vd. 2004)
Antibakteriyel Etki	DD yükseldikçe artar	MA yükseldikçe artar	(X. F. Liu vd. 2001)
Antioksidant	DD yükseldikçe artar	MA yükseldikçe azalır	(Park vd. 2004)
Hemostati	DD yükseldikçe artar	MA yükseldikçe azalır	(Rao vd. 1997)

Çizelge 2.1’de görüldüğü üzere deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığının değişmesi kitosanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değiştirmektedir. Bu sayede istenilen şekilde modifiye edilebilen kitosana farklı kullanım alanları sağlamıştır.

2.2.2. Kitosanın Üretim Aşamaları

Kapsamlı bir literatür taraması yapıldığında kitosan üretimi için çeşitli yöntemler önerildiği görülmüştür. Bu yöntemlerin çoğunda yüksek sıcaklıkta aşırı derişik sodyumhidroksit çözeltisi kullanılmaktadır (Mohammed vd. 2013). Önerilen diğer yöntemler ise yüksek sıcaklıkta ve basınçta alkali muamelesi içerirken, bazı yöntemler ultrasonik deasetilasyon veya enzimatik deasetilasyon ile gerçekleştirilir (Abdou vd. 2008; Chen vd. 1997; Martinou vd. 1995; El Knidri vd. 2018). Geleneksel kitosan üretim metotları uzun zaman harcayan ve yüksek enerji tüketimi gerektiren ısıtma prosesleri ile yapılmaktadır. Bu geleneksel metotlar kitinden kitosanın ekstraksiyonu konusunda

başarılı olsalar da zaman ve enerji maliyeti sorun olmuştur. Mikrodalga ışınlamaları reaktiflerin molekül titreşimlerini artırarak kimyasal tepkimeleri saatler hatta günler yerine dakikalar içinde gerçekleştirebilecek derecede güçlü bir alternatif enerji kaynağı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Daha kısa süreler içerisinde daha yüksek verimliliğe sahip enerji verimliliği yüksek olan mikrodalga ile sentez yöntemleri hem organik hem de inorganik bileşiklerin sentezini hızlandırmak için son derece uygun bir alternatif olmuştur (Hayes vd. 2004; Lertwattanaseri vd. 2009). Ayrıca mikrodalga sentez yöntemleriyle kitosan, selüloz ve diğer biyopolimerlerin depolimerizasyonu ve moleküler ağırlık indirgemeleri için çok etkili bir yöntemdir (Fan vd., 2013; Illy vd., 2014). Yöntemler farklılık gösterse de ana hatlarıyla her yöntemde izlenen basamaklar büyük oranda benzerlik göstermektedir. Şekil 2.2’de kitosan üretimi için izlenen basamaklar şematize edilmiştir.



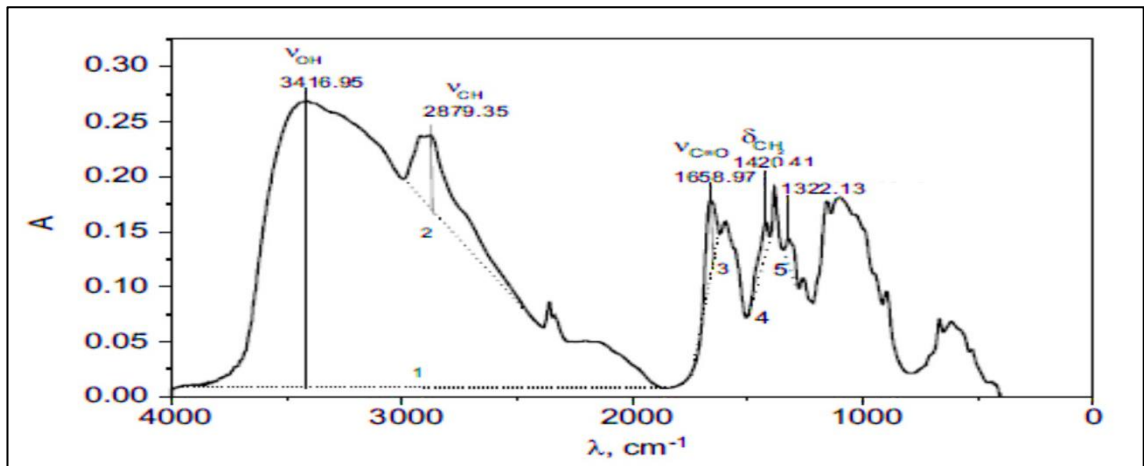
Şekil 2.2. Kitinden kitosan ekstraksiyonunun şematik gösterimi

Akış şemasında da görüldüğü üzere protein giderme, mineral giderme ve deasetilasyon işlemleri kabuklardan kitosan üretiminde baş rol oynamaktadır. Yıkanan, kurutulan ve öğütülen deniz canlılarına ait kabuklar üzerlerindeki et parçaları ve diğer protein kalıntıların giderilmesi için deproteinizasyon işlemine alınır. Bu aşamada kabuklar alkali özellikteki çözeltilerde bekletilerek protein moleküllerinin parçalanarak çözünmesi sağlanır. Bu işlem için genellikle %5 ile %10 arası derişime sahip NaOH çözeltileri kullanılmaktadır (Mizani ve Aminlari, 2007). Deproteinizasyon işlemi tamamlayan kabuklar nötr Ph seviyesine gelene kadar destile su ile yıkanır ve kurutulur. Bu kabuklar yüksek oranda kalsiyum ve kalsiyumhidroksiapatit minerallerini içermektedir. Minerallerin yapıdan izole uzaklaştırılması için HCl çözeltileri en uygun adaydır. Kabukların içerdiği mineraller alkali özellikli olduğu için asidik ortamlarda çözünmeleri daha kolay olmaktadır. Molar derişimi 1 mol/L ile 3 mol/L arasında değişen HCl çözeltileri kullanılarak demineralizasyon prosesi gerçekleştirilir (Ghorbel-Bellaaj vd., 2012). Minerallerinden arındırılan kabuklar renk giderimi için ağartma prosesine alınır. Deniz canlılarının renk pigmentleri dış iskeletlerine dağılmış durumdadır. Bu nedenle beyaz renkli ve yüksek saflıktaki kitosanın üretilebilmesi için renk pigmentlerinin giderilmesi gerekmektedir. Ağartma işlemi için en yaygın kullanılan kimyasallar aseton, hidrojen peroksit ve EDTA'dır. Daha etkin renk giderimi olması için kimyasalın belirli

oranlarda karıştırılması da alternatif bir çözügen olarak literatüre sunulmuştur (Yen vd., 2011). Kabukların renklerinden arındırılması ve ağartılmasıyla kitin üretimi tamamlanmaktadır. Üretilen kitinin kitosana dönüşmesi için yapıdaki asetilen gruplarının amin gruplarıyla yer değiştirmesi gerekliliği daha önceden bahsedilmişti. Bu işlemin gerçekleşmesi için sentezlenen kitin tozları yüksek konsantrasyonlu NaOH (en az kütlece %50 (a/a)) çözeltisinde yüksek sıcaklıklarda yer değiştirme tepkimelerinin tamamlanması için gereken zaman sağlanarak kitinin kitosana dönüşmesi sağlanır (Yuan vd., 2011). Bu aşamalar geleneksel yöntemlerle yapıldığında saatler hatta günlerce sürebilmektedir. Mikrodalga radyasyonu kullanılarak yapılan sentezler yüksek miktardaki üretimlerin daha hızlı ve daha yüksek verimle yapılmasını sağladığı bilgisi ışığında mikrodalga ile kitosan sentezinin daha elverişli olduğu kanısına varılmaktadır. Sentezlenen kitosanın kullanım alanının belirlenmesinde ise deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı önemli rol oynar.

2.2.3. Kitosanın Deasetilasyon Derecesinin Belirlenmesi

Deasetilasyon kavramı kitosan zinciri üzerindeki asetil gruplarının yapıdan ayrılması ve onların yerini amin gruplarının alması olarak tanımlanabilir. Zincire ne kadar fazla amin grubu eklenirse molekülün kitinden kitosana geçişi o kadar başarılı olur. Yapıya eklenen amin gruplarının sayısının toplam amin grupları ve asetilen gruplarının sayısına oranının yüzde olarak belirtilmesi de deasetilasyon derecesi olarak adlandırılır (Czechowska-Biskup vd., 2012). Deasetilasyon derecesinin belirlenmesi için UV-Vis spektroskopisi, FTIR spektroskopisi, proton ve karbon NMR' ve potansiyometrik titrasyon gibi farklı yöntemler mevcuttur (Muzzarelli ve Rocchetti 1985; D. Liu vd. 2006; Pelletier vd. 1990; Kasaai 2008). Bu yöntemler içerisinde FTIR spektroskopisi diğer yöntemlere göre daha pratik uygulanması ve hızlı sonuç vermesi ile diğer yöntemlere göre bir adım öne çıkmıştır (Duarte vd., 2002). FTIR spektroskopisi molekül yapısındaki fonksiyonel grupları ve bu grupların zincirde bulunma yoğunluğu hakkında bilgi vermektedir. Özellikle amin ve asetil grupların pik şiddetleri ya da bu grupların bağladığı karbon atomlarının sayısal yoğunluğu deasetilasyon derecesinin hesaplanması için önemli bilgiler sağlamaktadır. Şekil 2.3'te kitosanın karakteristik FTIR pikleri ve bu piklerin bulunduğu dalga boyları görülmektedir.



Şekil 2.3. Kitosanın FTIR spektroskopisi ve karakteristik pikleri

Piklerin altında kalan alanlar o dalga numarasına sahip fonksiyonel grubun zincirde bulunduğu yoğunlukla orantılı olduğundan deasetilasyon derecesi hesaplanırken yapıda kalan asetil gruplarının bağlı olduğu karbon atomlarının (C=O), toplam karbon atomları sayısına yanı hidroksil (OH) gruplarının bağlı olduğu karbon atomları sayısına oranı dikkate alınır. Deasetilasyon derecesinin hesaplanması denklem 2.1 de verilmiştir.

$$DA(\%) = \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times 100 / 1,33 \quad (2.1)$$

Denklemde polimerin asetilasyon derecesi DA , 1655 ve 3450 cm^{-1} dalga numaralarındaki absorpsiyon değerleri sırasıyla A_{1655} ve A_{3450} ile gösterilmiştir. Asetilasyon derecesinin hesaplanmasının ardından deasetilasyon (DD) derecesi denklem 2.2 ile hesaplanır.

$$DD(\%) = 100 - DA(\%) \quad (2.2)$$

Bu yöntem ile hızlı, doğruluk payı yüksek ve pratik olarak deasetilasyon derecesinin hesaplanmasına olanak sağlanır (Kasaai 2008)

2.2.4. Kitosanın Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Deasetilasyon derecesi gibi molekül ağırlığı da kitosanın uygulama alanının belirlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Kitosan üzerine yapılan çeşitli çalışmalar, düşük molekül ağırlıklı kitosanların yüksek molekül ağırlıklı kitosana göre daha yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Düşük molekül ağırlıklı kitosanların daha belirgin antibakteriyel özellik gösterdiği yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Kulikov vd., 2014; N. Liu vd., 2006). Molekül ağırlığının saptanabilmesi için H-NMR, C-NMR, FTIR spektroskopisi gibi farklı yöntemler önerilmektedir. Molekül ağırlığının viskozite üzerine olan etkisi göz önüne alındığında içsel viskozite yardımıyla molekül ağırlığı tayini daha pratik ve etkin bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (Kasaai vd. 2000). Bu yöntemle molekül ağırlığı tayin etmek için polimer uygun bir çözücü içerisinde farklı konsantrasyonlarda çözündürülür ve çözeltilerin viskozite kolonunda akış süreleri ölçülür. Ölçülen süreler yardımıyla polimer çözeltisinin içsel viskozitesi hesaplanır ve Mark – Houwink eşitliği yardımıyla molekül ağırlığı hesaplanır.

$$\eta_r = \frac{t_i}{t_0} \quad (2.3)$$

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 \quad (2.4)$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (2.5)$$

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red} \quad (2.6)$$

Eşitlik 2.3 ile polimer çözeltisinin göreceli viskozitesi hesaplanır. t_i ve t_0 sırasıyla hazırlanan polimer çözeltisinin ve kullanılan çözücünün kolondan akış zamanlarını göstermektedir. Denklem 2.4 kullanılarak özgül viskozite (η_{sp}) hesaplanır ve eşitlik 2.5'te görüldüğü gibi özgül viskozitenin, polimer çözeltisi konsantrasyonuna oranlanmasıyla da indirgenmiş viskozite (η_{red}) hesaplanır. Eşitlik 2.6'da konsantrasyon

“0” a yaklaşırken indirgenmiş viskozitenin limit değeri hesaplanır ve içsel viskoziteye ulaşılır ($[\eta]$). Bu aşamadan sonra bulunan içsel viskozite değeri eşitlik 2.7’deki Mark – Houwing eşitliğinde yerine yazılarak molekül ağırlığı hesaplanır.

$$[\eta] = KM_v^\alpha \quad (2.7)$$

Denklemden K ve α polimer – çözücü sistemine ait parametreler olup deneysel olarak hesaplanırlar.

2.2.5. Kitosanın Endüstriyel Kullanımı

Daha önce de belirtildiği gibi yenilenebilir olması, toksik özellik göstermemesi, biyobozunur, biyoyumlu, antibakteriyel olması gibi önemli özelliklere sahip olması, kitosanı birçok alanda aranan bir malzeme haline getirmiştir. Tarım sektöründen yiyecek içecek sektörüne, çevre kirliliğine karşı mücadeleden, kozmetik sektörüne kadar birçok alanda kitosan kullanımı görülmektedir. Antibakteriyel ve antioksidant özellik göstermesi sayesinde küf ve mantar oluşumuna engel olan kitosan, kontrollü salınım sağlayan hidrojel yapısı sayesinde gübre salınım ajanı olarak kullanıldığı gibi organik ve biyolojik kontaminasyonu da engelleyerek tarım sektöründe yaygın bir kullanıma sahip olmuştur. Ayrıca bitkilerde bağışıklık sistemini destekler ve bitki büyümesini hızlandırır. Gözenekli yapısı sayesinde ısı yalıtımı sağlar ve tohumlara kaplama yapılarak onları soğuktan ve donmadan korumak amacıyla da kullanılmaktadır (Prashanth ve Tharanathan, 2007; Mourya ve Inamdar, 2008; Rinaudo, 2006). Yapıdaki gözenekli yapıların modifiye edilebilmesi ve membran ve şelat oluşturabilme yeteneğiyle absorpsiyon kapasitesi yüksek bir adsorban olarak da kullanılan kitosan, kirli sulardaki metal iyonlarının emilimi, içme suyu tesislerinde ve havuzlarda topaklaştırıcı ve sentetik polimerlerin giderimi için kullanılarak sularda koku azaltıcı olarak da kullanılmaktadır (Gazi ve Shahmohammadi 2012; Guibal vd. 2014). İnsan tarafından sindirilemeyen bir polisakkarit olan kitosan tokluk hissi yarattığı için obeziteyle mücadelede de etkin olarak kullanıldığı gibi lipid bağlayıcı özelliğiyle kolesterol düşürücü, stabilizatör olma özelliğiyle soslar ve hazır sıvı gıdalar için kıvam arttırıcı, antibakteriyel ve antifungal özelliği ile de meyve ve sebzeler için koyucu kaplama olarak kullanılarak gıda sektöründe de kendine yer bulur (Dutta vd. 2004; Pandis vd. 2014; Chivangkul vd. 2014). Film yapıda kullanılabilmesi ve hidrojel olarak kremlere katkılanarak deride nem koruyucu, derideki renk pigmentlerini aktive edici şekilde tasarlanarak deri renk tonunun korunmasında, sabun, diş macunu gibi banyo ve temizlik malzemesi olarak kullanılarak da kozmetik sektöründe yer almaktadır (Cavello vd., 2014; Muzzarelli, 2009). Tüm bu bahsedilen özelliklerin yanında kitosanı ön plana çıkartan biyoyumluluk, biyobozunurluk ve antibakteriyellik özellikleri, kitosanı biyomalzeme olarak doku mühendisliği alanında kullanım için kitosanı çok iyi bir aday haline getirmektedir.

2.2.6. Kitosanın Doku Mühendisliğinde Kullanımı

Ön plana çıkartan üstün özellikleri ile kitosan biyomalzeme olarak son derece verimli ve etkili bir kullanıma sahiptir. Özellikle son dönemlerde araştırmacılar kitosanı birçok farklı doku ve hücre grubu için kullanmışlar ve olumlu sonuçlarıyla literatüre katkıda bulunmuşlardır. Cerrahi operasyonlardan yapay vücut uzuvlarının üretilmesine, deri onarımından ilaç salınımına kadar birçok alanda başarıyla uygulanmış bir

biyomalzeme olarak dikkat çekmektedir. Çizelge 2.2’de kitosanın potansiyel uygulamaları ve bu uygulamalara imkân veren özellikleri genel hatlarıyla özetlenmiştir.

Çizelge 2.2 Kitosanın biyomalzeme olarak kullanım alanları ve bu kullanıma imkân sağlayan özellikleri (Cavello vd. 2014).

Biyomalzeme Olarak Kullanımı	Özellikleri
Ameliyat dikiş ipi	Biyouyumluluk, biyobozunurluk
Diş implantları	Biyobozunurluk, film oluşturma
Yapay epitel doku	Yenilenebilme
Kemik kırıkları onarımı	Film oluşturma ve katkılanabilme
Kornea kontakt lens	Hidrat oluşturma ve biyouyumluluk
İlaç salınım ajanı	Toksik etki göstermeme, biyobozunurluk
Kapsulasyon	Lizozom enzimleriyle parçalanabilme

Doku mühendisliği alanında polimer malzemelerin en yaygın kullanımı doku iskeleti olarak karşımıza çıkmaktadır. Doku iskeletleri hücre ekimine, çoğalmasına ve göçüne olanak sağlayan yapılardır. Doku iskeletleri hücre çoğalması sonucu oluşan gerilime karşı koyabilecek mekanik dayanıma sahip, hücresel ve dokusal yapıların şekil ve fonksiyonel yapılarının oluşumuna da destek olmalıdır, ayrıca doku iskeletleri ve dolgu malzemeleri, doku ve organların tedavi ve yenilenmesine yardımcı olarak doku ve organların işlevsel özelliklerinin devam etmesini de sağlamalıdır. Kitosanın sünger, hidrojel, lif ve film yapıda üretilebilmesi, kitosanın farklı doku hücreleri için kullanılabilmesini sağlamıştır. Fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerinin metaller ve sentetik polimerlere göre daha üstün olması, kitosan kullanımını arttıran en önemli etmen olmuştur (Jayakumar vd., 2010). Doku destek malzemeleri biyobozunurluk, metabolizma için gereken mineraller ile katkılanabilme, gözenekli yapıya sahip olma, genleşme ve şişme yeteneğine sahip olma, protein emilimi yapabilme, hücre tipine uygun yüzey fonksiyonları ve kimyasalları ile modifiye edilebilme özelliklerine ve yüksek mekanik dayanıma sahip olmalıdırlar. Tüm bu özelliklerin yanında soğuma, lif oluşturma ve kristalleşme hızına bağlı olarak birbirine bağlı gözenek ağı oluşturabilmesi ve bu gözenek ağının hücre ekimi, hücre göçü ve gerekli besin ve minerallerin iletiminin kolaylaştırması kitosanın doku iskeleti olarak kullanımında onu bir adım öne çıkartan en önemli özellik olarak gözlemlenmiştir (Bedian vd. 2017). Kitosan üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde kitosan destek malzemelerinin, hidrojel, nanokompozit, biyokompozit, nanokristal film ve nanofiber bazlı yapılar olarak kullanıldığı görülmüştür (Bhardwaj vd., 2011; W. Wang vd., 2008; Yamane vd., 2005). Kitosan matrisli kompozit malzemeler kitosanın hidrojel oluşturabilme özelliğinden faydalanılarak üretilmiş yapılardır. Su tutma kapasitesi gayet yüksek olan hidrojeller esnek ve yumuşak yapı kazanmıştır. Özellikle vücudu saran epitel doku, deri dokusu, burun ve kulak kıkırdak yapılarının

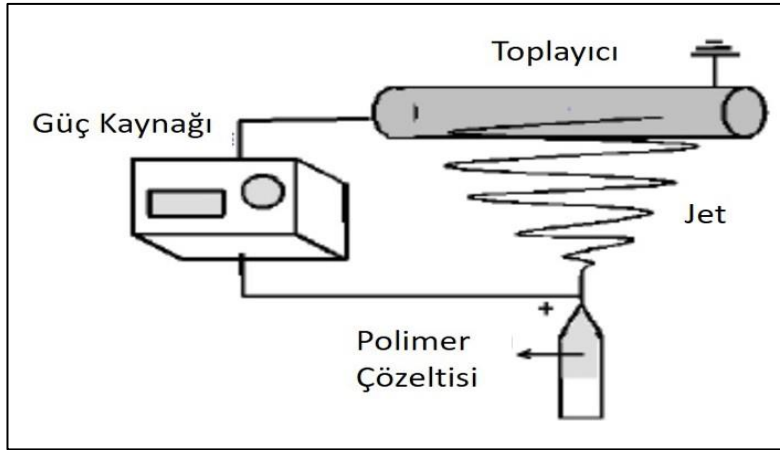
biyolojik taklidinde sıkça kullanılmaktadırlar (Croisier ve Jérôme, 2013). Kim vd. (2008) hidrojenlerin, yapılarına eklenen diğer polimerler ile fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağ oluşturabildikleri ve bu sayede hedef dokuya tutunma yönünde önemli bir avantaja sahip olduklarını raporlamışlardır. Tang vd. (2009) kitosanın bu özelliklerini kullanarak termal duyarlılığa sahip kitosan – polivinil alkol kompozitler sentezleyerek kemik dokunun ana malzemesi olan kalsiyumhidroksiapatit ile katkılayarak kemik hücrelerinde protein transferini sağlayan destek yapıları üretmişlerdir. Protein iletim mekanizmalarını gözlemleyerek yaptıkları çalışmalarda kalsiyumhidroksiapatit katkılı kitosan – polivinil alkol (PVA) biyokompozitlerin termal duyarlılığı arttırdığı ve en yavaş, en büyük protein moleküllerinin dahi hücre içerisinde gerekli bölgelere taşınabildiğini gözlemlenmiştir. Bhattarai vd. (2005) hidroksiapatit katkılı kitosan – PVA hidrojel nanokompozitleri kemik kırıkları arasında dolgu çimentosu olarak kullanımı araştırılmışlar ve saf kitosan dolgu malzemelerine göre tedavi sürecinin daha hızlı olduğunu raporlanmıştır. Kitosan matrisli kompozit malzemeler hücreler için daha geniş adezyon imkânı tanımış olsa da biyoyumluluk özelliğinin artırılması ve canlı içi uygulamalarda biyolojik ortamı daha iyi kopyalayabilmek amacıyla doğal fiberler ve proteinlerle katkılayarak biyokompozitler üzerine eğilimi yoğunlaştırmıştır. Nanoteknolojinin de yaygınlaşmasıyla boyutları 1 – 100 nm arasında olan biyohibrit malzemelerin üretilmesi kitosanın kullanım alanının genişletmiş, biyo ve nano kompozitler alanındaki araştırma ve çalışmaların merkezi olmuştur. Sharma vd. (2016) kitosan bazlı biyokompozitleri, kolajen fiberler ve nanohidroksiapatitlerle katılamışlardır. Mekanik dayanımı daha yüksek, protein emilimin kapasitesinin daha yüksek olduğu, hidrofilik ve bozunma sonrası canlı için hiçbir yan etki oluşturmayan kitosan temelli nanobiyokompozitler sentezleyerek kemik doku hücreleri üzerinde çalışmışlardır. Araştırmaları sonucunda ürettikleri kompozit malzemelerin kemik hücrelerinin büyüme ve çoğalma hızını arttırdığını raporlamışlardır. Biyolojik unsurlarla katılanan biyokompozitlerin daha üstün antibakteriyel ve antifungal etki gösterdiği ve kitosan matris içerisine ekimi yapılan hücre kültürüne bağlı olarak katkı unsuru olabilecek yardımcı moleküller aracılığıyla hücrelerin iskelet yüzeyine daha güçlü tutunduğu ve hücre satabilizasyonun daha başarılı olduğu Davoodbasha vd. (2016) tarafından raporlanmıştır. Bu bölüme kadar özetlenen çalışmalarda kitosanın doku iskeleti olarak üretiminin başarıyla gerçekleştirildiği görülse de yüzey kaplaması ve film formunda kullanımı tam olarak açıklanamamıştır. Polimer çözeltileri kullanılarak yapılan çalışmalar sıcaklığın çok yavaş değiştirilmesi ve çözücüsünün ağır ağır buharlaştırılmasıyla kristal yapılı polimerlerin üretilbildiği literatürde mevcuttur. Wang vd. (2013) çözgenli döküm işlemiyle çözücünün buharlaştırılmasıyla yüzey fonksiyonel gruplarının modifiye edilebildiği kitin nanokristalleri üretmişler ve bu kristal yapılı kitini deasetile ederek kristal yapılı kitosan filmlerin ürettiklerini raporlamışlardır. Bu yöntem ile elde edilen doku iskeletleri daha yüksek çekme dayanımına ve esneklik modülüne sahip olduğunu belirtmişlerdir. Kristal yapı içerisine hapsedilen inorganik tuzların yıkama işlemleri sonucunda sistemden uzaklaştırılmasıyla nano gözeneklere sahip filmler üretilmiş ve bu gözeneklerin hücre tutunması, hücre göçü ve madde iletimine olumlu katkı sağladığı raporlanmıştır. Sahip oldukları olumlu yanlara rağmen, nanokristal yapıda sentezlenen filmlerin ısı toleranslarının düşük olması ve maruz kaldıkları en küçük sıcaklık farkında dahi kristal örgünün bozularak tekrar amorf yapılı polimer zincirlere dönme isteği kitosan filmlerin organizma içerisinde hücre destek malzemesi olarak kullanımını zorlaştırmıştır (Zhu vd. 2015).

Nanofiberler, lif çapı 1000 nm ve altındaki lif kümeleri olarak tarif edilmektedir (Ahmed vd., 2012). Doğada kendiliğinden var olan kolajen, ipek, selüloz, kitin ve kitosan gibi polimerlerin hemen hemen hepsi lif formuna getirilerek biyomalzeme olarak yaygın bir kullanıma sahiptir. Kitosan nanolifler kendi yapılarından kaynaklı antibakteriyel etkileri, biyouyumlulukları ve bozunma sonucu zehir salınımı yapmamaları sayesinde doku mühendisliği alanında sıkça tercih edilen malzeme tipi olmuştur. Proses sırasında üretim parametrelerinde değişiklikler yapılarak, gözenek boyutu ve dağılımının modifiye edilebilmesi, diğer üretim yöntemlerine göre maliyet etkinliğinin daha yüksek olması ve uygulama kolaylığı sağlaması sebebiyle kitosan lifler araştırmacılar tarafından ilgi odağı olmuştur. Yüzey alanı – hacim oranının yüksek oluşu, esnek ve pürüzlü yüzey yapısına sahip olması kitosan lifleri doku mühendisliği için yüksek adezyon özelliğine sahip ideal bir aday haline getirmektedir. Kitosan nanofiber yapıdaki doku destek üniteleri mikrokontakt yazılım, ultrasonik çöktürme, dondurarak kurutma, elektro eğirme gibi farklı metotlarla üretilebilmektedir (Ahmed vd., 2012; Desai vd., 2008). Kitosan bazlı doku iskeletlerinin etkinliğinin arttırmak amacıyla kitosan genel olarak sentetik polimerler ile karıştırılarak kullanılmaktadır. Shrestha vd. (2016) kitosan - poliamid – 6,6 polimerleri karışımıyla ürettikleri nano gözenekli fiberleri kemik dokunun öncü hücrelerinin çoğaltılması için kullanmışlar ve biyo aktif durumdaki kalsiyum iyonlarının gözenekler içerisine daha etkin difüzyona uğrayarak kemik hücrelerinin daha hızlı geliştiğini ve çoğaldığını raporlamışlardır. Nano boyuttaki gözeneklerin protein emilimi ve hidroksiapatit moleküllerinin depolanması üzerindeki etkisi Li vd. (2015) tarafından araştırılmış ve bu fenomenlerin daha etkin rol oynayarak hücre gelişimine olumlu katkı sağladığı raporlanmıştır. Fiberlerin osteosit hücreleri üstündeki olumlu etkileri araştırmacıları kitosan liflerin sinir dokuda da uygulanabilirliği konusunda merak uyandırmıştır. Sinir hücrelerinin onarılmasına yardımcı olabilecek hücre destek malzemesinin üretimi amacıyla kitosan – kolajen, kitosan – poliüretan, kitosan – polietilen glikol karışımları gibi karışımlardan elektro eğirme yöntemi ile üretilen lifler sinir dokusunun yapısal özelliklerinin mimiklenmesiyle, laboratuvar ortamında hücre kültürü geliştirme çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Nanofiber yapıların film ve hidrojellere karşı avantajları araştırılmış, Cooper vd. (2011) Schwann hücrelerinin kutuplu yapılarının, katyonik bir polimer olan kitosan tarafından aksonal yönelimlerinin kontrol edilebilmesiyle film yapılı malzemelere göre daha başarılı mimiklendiğini ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte lifli yapıların sinir hücre ağına olan benzerliği ile yüksek derece adezyon ortamı oluşturduğu ve hücreler arasında protein ve iyon geçişlerini daha verimli sağladığı, bu sebeple de hücre yenilenmesi ve çoğalmasında diğer destek malzemelerine göre daha başarılı olduğu raporlanmıştır. Kutupsal yapının dolayısıyla da aksonal yönelimlerin kontrol altına alınabilmesi bu noktada başka bir önem kazanmıştır. Bu yöntem için en önemli adayın yüksek molekül ağırlığına sahip polietilenoksit olduğu Zhang ve Zhang (2001) tarafından raporlanmıştır. Araştırmaları esnasında polietilenoksitin (PEO) lif çapı ve gözenek yoğunluğu üzerine de büyük etkisi olduğunu görmüşler, sinir hücrelerinin morfolojileri ve fonksiyonel özelliklerini düşündüklerinde kitosan liflerin tüp haline getirilmesinin sinir hücrelerinde uygulanabilirliğinin daha uygun olduğu sonucuna ulaştırmıştır. Bu nedenle Zhang ve Zhang (2001) polietilenoksit ile beraber üretilen kitosan fiberleri içleri boş tüpler haline getirerek uygulamışlardır. Lif yönelimi, gözenek boyutu ve dağılımıyla beraber lif çapı en uygun olan adayları tüp haline getirmiş ve sinir hücrelerinin dendrit-akson doğrultusunda zarar görmüş bölgelerinde destek ünitesi olarak kullanmışlardır. Üretilen tüplerin sinir hücresinin yenilenip onarılmasında hızlandırıcı etkiye sahip olduğu ve impuls iletiminde hiçbir

problem kalmaksızın sinir hücresinin kendini yeniden yapılandırmasına yardımcı olduğunu raporlamıştır. Tanaka vd. (2015) frenik sinir hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda kitosanı trifloroasetikasit içerisinde çözündürerek elektro lif çekim yöntemiyle iç çapları 2 mm olan tüpler üretmiş ve sinir hücresinin kesik uçlarını bu tüplerin içinde yerleştirerek sinir hücresindeki kesikin iyileşmesinde tüplerin etkisini araştırmışlardır. Deneylerinin sonucu olarak ürettikleri tüplerin, kesik sinir hücrelerinin tedavisinde olumlu etkisinin olduğunu raporlamışlardır. Bunun yanında Matsumoto vd. (2010) kitosan tüplerin motor sinir hücrelerinde oluşan yaralanmalarda sinir gövdelerinin yanlış dendritlerle sinaps oluşumunu engellediği, sinir hücresi üzerindeki elektriksel iletme yardımcı olduğu ve yapıya ekledikleri kolajen lifler ile sinir hücreleri üzerindeki yaralanmaların tedavi sürecinin hızlandığını raporlamışlardır. Bu çalışmalar sinir kesisi sonucu oluşan yaralanmalarda kitosan tüplerin kullanılmasının doğru bir tercih olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle kitosan tüpler fasiyal sinirin kesilmesi sonucu oluşan yaralanmaların tedavi sürecinde kullanılma uygun bir aday olarak ön plana çıkmaktadır.

2.3. Elektro Lif Çekim Yöntemi ve Kitosan

Nanoteknolojinin gelişmesiyle beraber hem sentetik hem de doğal polimerlerden üretilen ve karakteristik çaplara sahip olan nanolifler tıbbi ve farmakolojik alanlardaki uygulamalar için umut verici olmuştur. Geniş yüzey alanları, yüksek mekanik özellikleri, farklı morfoloji ve geometride üretim imkânı sunan nanolifler doku mühendisliğinde yara örtüsü, kontrollü ilaç salımı, doku iskeletleri ve vasküler protezlerin üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Hu vd. 2014; Huang vd. 2003). Nanofiber üretimi için uygulanan çeşitli yöntemler içerisinde, elektrospinning, elektro lif çekimi, metodu dikkat çekmektedir. Nanometre ve submikrometre seviyesinde çaplara sahip lif üretilmesine izin veren yüksek maliyetli olmayan ve çok yönlü bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (Zhou ve Gong, 2008). Elektro lif çekim yöntemiyle fiber üretimi viskoz bir polimer çözeltisinin yüksek elektrik alan altında elektrostatik kuvvetlerle etkileşmesine dayanır. Elektro lif çekim düzeneği, Şekil 2.4, temel olarak iletken ve kılcal yapıları bir iğne, yüksek gerilim uygulayabilen bir güç kaynağı, çözeltiyi beslemek için bir şırıngadan ve biri topraklanmış iki elektrottan oluşur. İletken iğne ucuna gönderilen polimer çözeltisi burada damlacıklar oluşturur. Elektrotlar arasında oluşan yüksek potansiyel polimer çözeltisinin yüzey gerilimini yendiğinde elektrik yüklü jetler oluşur ve bu jetler topraklanmış elektrota yerleştirilen toplayıcıya doğru hareket ederler. Jet veya jetler toplayıcı yüzeye ilerlerken aynı zamanda çözücünün de buharlaşmasıyla ve toplayıcı üzerinde dokumasız bir lif ağı oluştururlar (Bizarria vd. 2014).



Şekil 2.4. Elektro lif üretim cihazı ve lif oluşumunun gösterimi

Her ne kadar basit bir proses olarak görünüyor olsa da homojen ve boncuksuz yapıli lif dağılımı elde edebilmek için sıcaklık, akış hızı, besleme potansiyeli ve toplayıcı ile iğne ucu arası mesafe parametreleri dikkatli ve hassas bir şekilde uygulanmalıdır. Cihaza bağlı bu değişkenlerin yanı sıra polimer çözeltisinin yüzey gerilimi, iletkenliği, sıcaklığı ve işlemin yapıldığı ortamın sıcaklığı ve nem oranı da kontrol altında tutulmalıdır. Sıcaklık ve nemlilik polimer jetlerinin toplayıcıya iletilmesi sırasında çözücünün sistemden uzaklaşması için çok önemlidir. Çözücü buharlaştırılmazsa toplayıcı üstünde boncuklu lifler ya da lif yerine spray filmler oluşur. Cihaza bağlı değişkenler ise genel olarak lif kalitesini, gözenekli yapıyı ve lif çapını belirlemede önem kazanmaktadır. Homojen ve boncuksuz lif yapısını elde edebilmek için en uygun ortam sıcaklığı ve nemliliğinde, iletken bir polimer çözeltisi iğne ucuna damlacıklar oluşturacak hızda beslenmeli ve bu damlacıkların yüzey gerilimini yenebilecek büyüklükte potansiyel uygulanmalıdır (Dan Li vd., 2005; Jayakumar vd., 2010; Ramakrishna vd., 2005).

Kitosandan elektro lif çekim yöntemiyle lif üretimi önündeki en büyük engel kitosanın çözünme sorunudur. Suda ve alkali sistemlerde çözünmeyen kitosan, daha çok pH'sı 2 ile 6 arasında olan asidik çözeltileri tercih eder. Özellikle asetik asit, formik asit, laktik asit gibi organik asitlerin sulu çözeltilerinde çözünebilen kitosan çözeltilerini oldukça viskoz hale getirir ve uygulanan potansiyelin yüzey gerilimini yenmesi zor hatta imkânsız hale gelir. Bu da elektro lif çekim işlemini zorlaştırır. Ayrıca polimer zincirleri arasında hidrojen bağlarının oluşumu da elektrik alan etkisine bırakına polimerlerin hareketini önler (Whistler 1993; Geng vd. 2005; Neamark vd. 2006). Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında saf kitosan çözeltisinden lif üretiminin ancak hacimce %90 derişime sahip asetik asit çözeltisi içerisinde kütlece %7 kitosan konsantrasyonuna sahip sistemlerde başarılı olduğun fakat üretilen liflerin homojen olmadığı ve boncuklu yapılar oluşturduğu Geng vd. (2005) tarafından raporlanmıştır. Bu sorunun çözümü için saf kitosan çözeltileri yerine polimer karışımlarından elde edilen çözeltiler hazırlanmış ve lif formasyonları denenmiştir. Polivinil alkol (PVA), polilaktik asit (PLA) ve polietilenoksit (PEO) gibi polimerler viskoz yapıdaki kitosan çözeltilerinin yüzey gerilimlerini düşürücü yüzey aktif madde olarak rol aldıklarından lif üretimini kolaylaştırdıkları Subramanian vd. (2005) ve Bhattarai vd. (2005) tarafından yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Xu vd. (2009) PLA – kitosan karışımından hazırladıkları çözeltileri hacimce %2 derişime sahip asetik asit çözeltisinde çözdürmüşler ve lif üretimini başarı ile gerçekleştirmişlerdir. Çok

yüksek gerilim uygulanmasına gerek olmadığını, PLA katkısının hem iletkenliği arttırdığı hem de yüzey gerilimini düşürdüğü belirtilirken üretilen lif çaplarının 200 – 800 nm aralığında olduğu raporlamışlardır. Yapılan çalışmada PLA – kitosan oranının kütlece 4:1 oranında olduğu belirtilmiş bu da üretilen liflerde kitosanın aksine PLA'nın baskın olmasına sebep olmuş ve bu çalışmanın handikabını ortaya koymuştur. Benzer bir çalışmada Xu vd. (2009) tarafından yapılmış ve farklı oranlardaki kitosan – PVA karışımını saf trifloroasetik asit içerisinde çözündürerek ve elektro lif çekim işlemi uygulamışlardır. Elde edilen lif çaplarının 300 – 1200 nm aralığında olduğunu raporlamışlardır. Yine bu çalışmada da PVA'nın karışımındaki kütlece oranının kitosandan daha yüksek olması kitosan fiber oranının daha düşük olmasına sebep olmuş, ayrıca trifloroasetik asitten gelen flor radikallerinin toksik etki oluşturduğu bu sebeple doku mühendisliği alanında kullanımının pek uygun olmadığı raporlanmıştır. PLA – kitosan ve PVA – kitosan karışımlarının aksine PEO – kitosan karışımı kullanılarak yapılan proseslerde kitosan miktarının daha baskın sonuç olarak da kitosan liflerin daha baskın olduğu matrisler gözlemlenmiştir. Bizarria vd. (2014) çalışmalarında değişen kitosan/PEO oranlarını çalışarak lif formasyonlarını gözlemişlerdir. Ekip hacimce %90 derişimde asetik asit çözeltisi içerisinde kütlece %4 derişimde kitosan çözeltisi hazırlamış ve ayrı bir sistemde kütlece %3 derişime sahip PEO sulu çözeltisi hazırlamıştır. Kitosan ve PEO çözeltilerini kitosan/PEO oranı 3:1, 3:2 ve 1:1 olarak karıştırarak lif çekim işlemi uygulamışlardır. Çalışmalarının sonucunda her bir örnekte kitosan yüzdesinin korunduğunu ve kitosan liflerin ağırlıkta olduğu matrisler elde ettiklerini raporlamışlardır. Ayrıca PEO'nun suda çözünebilir olmasından dolayı elde edilen liflerin bol saf suyla yıkanarak sadece kitosan liflerden örülü bir ağ elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bu durum doku mühendisliği uygulamaları için saf kitosan liflerden oluşan doku destek malzemelerinin üretilebileceğini açıkça ortaya koymuştur.

2.4. BDNF ve Sinir Hücrelerinin Yenilenmesine Etkisi

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), merkezi ve çevresel sinir sistemi nöronlarının yaşama, büyüme işlevsel görevleri yerine getirme gibi yaşamsal olayların kontrolü ve devamlılığının sağlanmasında görev alan nörotrofin türevli bir proteindir. BDNF'nin motor nöronlarda, periferik ve vasküler sinir hücrelerinde, epitel doku hücrelerinde sentezlendiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Yarim ve Kazak, 2015). BDNF önemli birçok nöronun yaşam döngüsünün devamını sağlamanın yanı sıra nöronlarda oluşan yaralanmaların tedavisi ve hücrelerin yenilenmesinde de görev alır. Bu özelliği BDNF'i sinir hücrelerinin yaralanması, kesi meydana gelmesi ya da kopması gibi durumların tedavi sürecinde kullanımı için uygun bir aday olarak öne çıkarmıştır (Ozawa vd. 2014). Literatürde BDNF'nin nörolojik, rahatsızlıkların tedavisinde kullanılabileceğine dair çalışmalara da rastlanmaktadır. Vögelin vd. (2006) yaptıkları çalışmalarda hem laboratuvar ortamında hem de canlı ortamda yaptıkları çalışmalarda BDNF salınımının aksonal yenilenme üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Farelerden izole ettikleri sinir hücrelerini kültür ortamında yetiştirmiş ve yapay olarak sinir kesisi oluşturmuşlardır. Hücre kültür ortamına ekledikleri kalsiyum alginat kapsüllere hapsedilmiş BDNF'in zamanla salınımını sağlayarak sinir hücresinin yenilenme ve iyileşme sürecini takip etmişlerdir. Çalışmalarının ikinci aşamasında fasiyal sinir üzerinde oluşturdukları kesiği ürettikleri BDNF – alginat kompozitleri ile sargılamışlar ve tedavi sürecini takip etmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda hem kültür ortamında hem de canlı ortamdaki denemeler olumlu sonuçlanmış ve BDNF'in aksonal yenilenmeyi

hızlandırarak tedavi sürecini kısalttığını raporlamışlardır. Wilhelm vd. (2012) BDNF ekspresyonunu kalıtsal olarak hücre tipine spesifik bir şekilde manipüle ederek, BDNF'yi Schwann hücrelerinden ve motor nöronlardan seçici olarak uzaklaştırmışlardır. BDNF izolesi yapılmış Schwann hücrelerinin aksonal yenilenmeyi yavaşlatacağı ve hatta durduracağını ön görmüşlerdir. Bu grubu kontrol grubu olarak kullanan araştırmacılar bir başka izole edilen grupta aksonal uçlar BDNF ve CNTF bileşiminden oluşan yapıyla sarmış ve sinirsel iletim ve hücre yenilenmeyi takip etmişlerdir. Tahmin edildiği gibi BDNF'ten yoksun Schwann hücreleriyle sarılı olan nöronlarda iyileşme ve sinirsel iletim gözlemlenmezken, BDNF ve CNTF bileşimi ile enkapsüle edilmiş nöronlarda sinirsel iletimin devam ettiğini ve aksonal yenilenmenin tahmin edilen süreden daha erken tamamlandığını rapor etmişlerdir. McGregor ve English (2019) BDNF ekspresyonunu ve yazılımını düzenleyerek periferik sinir hücrelerinde oluşan yaralanmalara müdahale ederek yenilenme sürecine destek olunabileceğini raporlamışlardır. Bununla birlikte BDNF'in hücre içerisinde mRNA sentezini aktive ettiğini, hücre içindeki yapısal proteinlerin sentezini hızlandırdığını ve bu yolla aksonal yenilenmeyi hızlandırdığını açıklamışlardır. Bu bilgiler sinir hücrelerinin yenilenme sürecini desteklemesi ve tedaviyi hızlandırmasıyla BDNF'in sinir hücrelerinde oluşan yaralanmalarda kullanımının isabetli bir karar olduğunu göstermektedir.

3. MATERYAL ve METOT

Yapılan çalışmada daha önce farklı çalışmalarda bireysel olarak denenilen ve sinir hücrelerinin yenilenmesinde olumlu sonuçlar veren kitosan tüpler ile BDNF rekombinant protein bir araya getirilerek biyobozunur BDNF katkılı tüpler üretilmiş ve fasiyal sinir kesisi onarımı için deney hayvanlarına implante edilerek tedavi süreci gözlemlenmiş ve üretilen yapıların yenilenme sürecine olan etkisi incelenmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Kitosan tüplerin üretimi için gerekli olan kitosan Adaga Gıda ve Danışmanlık San. A.Ş.'den temin edilen karides kabuklarından üretilmiştir. Kitosan üretimi sırasında kimyasal proseslerde hidroklorik asit (HCl) (Sigma), Sodyum Hidroksit (NaOH) (TEKKİM), hidrojen peroksit (H₂O₂) (Sigma), üretilen kitosanın molekül ağırlığının belirlenmesi için asetik asit (CH₃COOH) (Merck), sodyum asetat (CH₃COONa) (Merck) ve elektro lif çekim işleminde polimer çözeltilerinin hazırlanması için yüksek molekül ağırlıklı polietilenoksit (YMAPEO) (Sigma) ve asetik asit (CH₃COOH) (Merck) kullanılmıştır. Tüplere katkılanan BDNF proteini Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü'nden temin edilmiştir. Karides kabuklarının öğütülmesi metal bıçaklı Fakir Aromatik öğütme robotu, sentez prosesleri Samsung ME711 mikrodalga fırın, kurutma işlemleri Nüve EV018 vakumlu etüv, çözeltilerin hazırlanması ve karıştırılması IKA C-MAG HS 7 marka ve model numarasına sahip manyetik karıştırıcı kullanılarak yapılmıştır. Elektro lif çekim işlemi NE3 laboratuvar tipi elektro lif çekim cihazı ile yapılmış, cihaz ve cihaz bileşenlerinin görselleri Şekil 3.1-3'te verilmiştir. Tartımlar Mettler Toledo marka ve TLE204 model numarasına sahip hassas terazide, pH ölçümleri Mettler Toledo Five Easy pH metre ile yapılmıştır. Üretilen kitosanın deasetilasyon derecesinin belirlenmesi için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi yöntemi kullanılmış ve ölçümler Perkin Elmer UATR Two, cihazı ile 400-4000 cm⁻¹ dalga numaraları arasında yapılmış, molekül ağırlığının belirlenmesi için de kılcal borulu viskozimetre kullanılmıştır. Üretilen kitosan lif örneklerinin optik mikroskop görüntü analizleri de LEICA DM2500 alttan aydınlatmalı mikroskopla yapılmıştır. Liflerin SEM analizleri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Elektron Mikroskop Görüntü Analiz Ünitesi (TEMGA) imkanları dahilinde ZEİSS-LEO 1430 SEM elektron mikroskobu cihazı ile yapılmıştır.

3.2. Karides Kabuklarından Kitosan Üretimi

Temin edilen karides kabuklarından kitosan üretimi için mikrodalga ile sentez yöntemi kullanılmıştır.

3.2.1. Karides Kabuklarının Kitosan Üretimine Hazırlanması

Saf su ile yıkanan karides kabukları 80 °C'de vakum ortamında kurutulmuştur. Kurutma işleminin ardından karides kabukları öğütülmüş ve sentez prosesleri için uygun duruma getirilmiştir.

3.2.2. Karides Kabuklarının Demineralizasyonu

Toz haline getirilen karides kabukları kütlege 1:10 oranında 3 M HCl çözeltisi ile karıştırılmış ve elde edilen karışım mikrodalga fırında 650 W güçte 20 dakika bekletilmiştir. Bu işlem ile karides kabukları içeriklerindeki minerallerden arındırılmıştır. Demineralize olan karides kabukları pH değeri 7 olana kadar saf su ile yıkanmış ve 80 °C’de vakum ortamında kurutulmuştur.

3.2.3. Karides Kabuklarının Deproteinizasyonu

Minerallerinden arındırılan kabukların içeriğindeki organik atıkların ve protein kalıntılarının giderilmesi amacıyla ağırlıkça (a/a) %8 derişime sahip NaOH çözeltisi hazırlanmıştır. Demineralize olan karides kabukları ağırlıkça 1:10 oranında NaOH çözeltisiyle karıştırılmış ve 650 W güçte 20 dakika mikrodalga işlemine tabi tutulmuştur. Mikrodalga yardımıyla proteinlerinden arındırma işleminin ardından karides kabuklarından kitin ekstraksiyonu sağlanmıştır. Ekstrakte edilen kitin, pH derecesi 7 olana kadar saf suyla yıkanmış ve 80 °C’de vakum ortamında kurutulmuştur.

3.2.4. Kitinin Renk Pigmentlerinden Arındırılması

Karides kabukları renkli olduğundan dolayı elde edilen kitin de aynı renk pigmentlerini taşımaktadır. Bu renk pigmentlerinden arındırmak için ekstrakte edilen kitin kütlege 1:10 oranında H₂O₂ – HCl karışımında oda sıcaklığında bir gün bekletilmiştir. H₂O₂ – HCl karışımı hazırlanırken H₂O₂ ve kütlege %37’lik HCl kütle oranları 9:1 olacak şekilde kullanılmıştır. 24 saat sonunda renk pigmentlerinden arındırılan kitin polimeri pH değeri 7 olana kadar saf su ile yıkanmış ve 80 °C’de vakum ortamında kurutulmuştur.

3.2.5. Kitin Polimerinden Kitosan Polimerinin Elde Edilmesi

Kitosanın elde edilebilmesi için kitinin deasetile edilmesi gerekmektedir. Deasetilasyon işlemi için ağırlıkça (a/a) %50 derişime sahip NaOH çözeltisi hazırlanmış ve kitin ile kütlege 1:20 oranında karıştırılarak 650 W güçte 25 dakika mikrodalga işlemi uygulanmıştır. Deasetilasyon işlemi sonunda elde edilen kitosan pH değeri 7 olana kadar saf su ile yıkanmış ve 80 °C’de vakum ortamında kurutulmuştur.

3.3. Kitosanın Deasetilasyon Derecesinin Belirlenmesi

Sentezlenen kitosanın deasetilasyon derecesinin belirlenmesi için FTIR spekturumları alınmıştır. 1655 ve 3450 cm^{-1} dalga numaralarındaki absorbans değerleri yardımıyla asetilsasyon ve deasetilasyon dereceleri belirlenmiştir.

3.4. Kitosanın Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Sentezlenen kitosanın ortalama molekül ağırlığının belirlenmesi amacıyla 1 gram kitosan 50 mL hacme sahip 0,1 M Sodyum asetat (CH₃COONa) – 0,2 M Asetik asit (CH₃COOH) karışımında çözdürülmüş ve elde edilen ana çözeltiden ağırlık/hacim derişimleri (a/v) 0,002 g/mL, 0,004 g/mL, 0,006 g/mL, 0,008 g/mL ve 0,02 g/mL olacak şekilde 5 farklı çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin her birinin bağlı viskoziteleri kılcal borulu viskozimetre yardımıyla akış sürelerinin ölçülmesiyle

hesaplanmış ve konsantrasyona karşı bağıl viskozite grafiği yardımıyla özgül viskozite değeri hesaplanmıştır. Mark Houwink eşitliği kullanılarak kitosan polimerinin ortalama molekül ağırlığı hesaplanmıştır.

3.5. Kitosan Elektro Liflerin Üretimi

Kitosan tüplerin üretim aşaması öncesinde kitosandan elektro lif çekim yöntemiyle boncuksuz ve homojen dağılıma sahip liflerin elde edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla öncelikli olarak polimer çözeltilerinin lif çekim işlemine en uygun derişimleri ve karışım oranları belirlenmiş, ardından cihaz parametrelerinin optimize edilme çalışmaları yapılmıştır. Kusursuz liflerin üretilmesiyle tüp üretimine geçiş sağlanmıştır.

3.5.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Elektro lif çekim işlemi için en uygun kitosan ve PEO konsantrasyonlarının belirlenmesi için öncelikli olarak 100 mL saf su ile 900 mL saf asetik asit karıştırılarak hacimce (v/v) %90 derişimde asetik asit çözeltisi elde edilmiştir. Elde edilen asetik asit çözeltisi içerisine ağırlıkça (a/a) derişimi %7 olacak şekilde 73,150 g kitosan eklenmiş ve çözünmesi için manyetik karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında bir gün beklenmiştir. Başka bir balon joje içerisine ağırlık – hacim (a/v) derişimi %3 olan PEO çözeltisi hazırlamak için 1 L distile su içersine 30,00 gram PEO eklenmiş ve çözünmesi için manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında bir gün bekletilmiştir. Hazırlanan bu çözeltiler stok çözeltiler olup çalışma süresince bu çözeltilerden belirlenen miktarlarda alınmış ve seyreltme işlemleri uygulanarak kullanılmıştır.

3.5.2. Elektro Lif Üretimi İçin Optimum Derişimin Belirlenmesi

Lif çekim işlemi için en uygun konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla ağırlıkça (a/a) %4, %5, %6 ve %7 derişime sahip kitosan çözeltileri ana çözeltinin seyreltilmesiyle elde edilmiş ve ağırlık – hacim (a/v) derişimi %3 olan PEO sulu çözeltisiyle kitosan – PEO oranı 3:1 olacak şekilde karıştırılmışlardır. Elde edilen karışım çözeltiler 12 saat oda sıcaklığında karıştırılmış ardından 1 saat gaz çıkış işlemi için bekletilmiş ve ardından elektro lif çekim işlemine tabi tutulmuşlardır.

3.5.3. Elektro Lif Üretimi İçin Optimum Cihaz Parametrelerinin Belirlenmesi

Lif çekim işlemi için en uygun parametrelerin belirlenmesi amacıyla kısım 3.5.2’de hazırlanan çözeltiler ayrı ayrı lif çekim işlemine tabi tutulmuşlar ve kusursuz homojen dağılıma sahip lif oluşumu sadece ağırlıkça (a/a) %4 kitosan konsantrasyonunda gözlemlendiğinden cihaz optimizasyon işlemleri bu konsantrasyon üzerinden devam etmiştir. İlk olarak uygulanması gereken potansiyel üzerinde çalışılmış, bu amaçla polimer çözeltilerine 20 kV ile 35 kV arasında gerilimler uygulanarak polimer jetlerinin oluşması gözlemlenmiştir. Polimer jetlerini oluşumunun sağlandığı örneklerde akış hızı optimize edilmeye çalışılmıştır. En uygun akış hızının belirlenebilmesi için polimer çözeltisi 0,50 mL/h ile 2,50 mL/h değerleri arasındaki akış hızları denenmiştir. Akış hızı ve besleme geriliminin belirlenmesinin ardından iğne ve toplayıcı arasındaki mesafe 10 cm ile 20 cm arasında değiştirilerek oluşan liflerin homojen dağılım gösterdiği ve boncuksuz yapıda olduğu örnekler optik mikroskop görüntüleri alınarak belirlenmiş ve

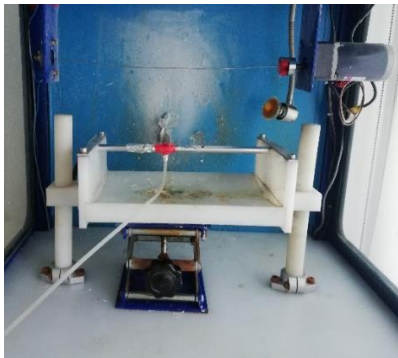
bu örneklere ait üretim parametreleri not edilerek çalışma belirlenen parametrelerle devam etmiştir.



Şekil 3.1. Lif üretimi için kullanılan NE3 laboratuvar tipi elektro lif çekim cihazı



Şekil 3.2. Elektro lif çekim cihazı yüksek gerilim güç kaynağı



(a)



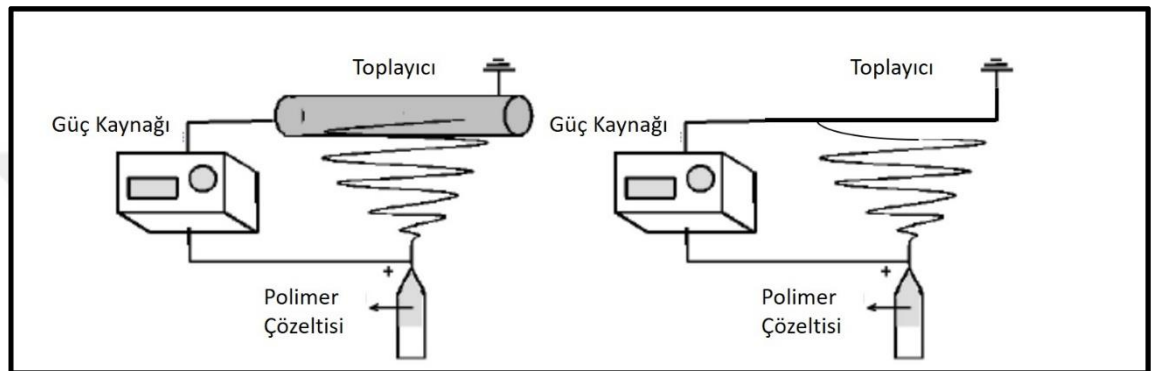
(b)

Şekil 3.3. a) Toplayıcı ve iğne arasındaki mesafe ve mesafe değiştirici kaldıraç sistemi
b) Akış hızının belirlenmesi için kullanılan infüzyon şırınga pompası

3.6. BDNF Katkılı Kitosan Tüplerin Üretimi

3.6.1. Kitosan Tüplerin Üretimi ve Bozunma Sürelerinin Belirlenmesi

Elektro lif çekimi için, en uygun kitosan derişimi olarak belirlenen ağırlıkça (a/a) %4 konsantrasyona sahip kitosan çözeltisi kullanılarak, kitosan – PEO oranı 3:1 olan kitosan – PEO çözeltilerinin karışımı hazırlanmış ve bu karışımdan elde edilen çözelti kullanılmıştır. Tüplerin üretimi için standart elektro lif çekim cihazı üzerinde tasarımsal değişiklikler yapılmıştır. Toplayıcı ana silindir sökülerek yerine 2 mm kalınlığında paslanmaz çelik tel monte edilmiş ve liflerin bu tel üzerinde toplanması sağlanmıştır. Cihaz tasarımını şematize eden görsel Şekil 3.4’de verilmiştir.



Şekil 3.4. Cihaz tasarımındaki değişikliğin gösterimi

1,75 ml/saat akış hızı, 35 kV besleme gerilimi ve 20 cm toplayıcı mesafesinde lif üretimi yapılmış ve üretilen lifler 2mm kalınlığındaki çelik tel üzerinde toplanmıştır. Bu işlem 3 saat sürdürülmüş ve prosesin bitmesinin ardından toplanılan liflerin tel üzerinden alınmasıyla iç çapı 2 mm dış çapı 2.4 mm olan içi boş tüpler elde edilmiştir. Tüpler 24 saat boyunca 50 °C sıcaklıkta vakum ortamında kurutulmuştur. Üretilen tüpler kitosan – PEO karışımı içeren çözelti kullanılarak yapıldığından tüplerin yapısında da kitosan – PEO karışımı bulunmaktadır. PEO’nun üründen uzaklaştırılması için kurutma işleminin ardından tüpler saf su ile yıkanmıştır. Bu işlem aynı zamanda kitosan lifler arasındaki gözenek miktarı ve boyutunu da arttırmış bu sayede BDNF katkılanması için ekstra alan oluşturulmuştur. Yıkanan tüpler tekrar 50 °C sıcaklıkta ve vakum ortamında kurutulmuştur.

Üretilen tüplerin biyolojik ortamda bozunma sürelerinin belirlenmesi için 5 ml serum fizyolojik çözeltisi içerisine 1 g kitosan tüp konulmuş ve 37 °C sıcaklıkta karanlık ortamda bırakılarak örnekler hazırlanmış ve örneklerin kütle kayıpları bir ay boyunca gün aşırı olarak gözlemlenmiştir.

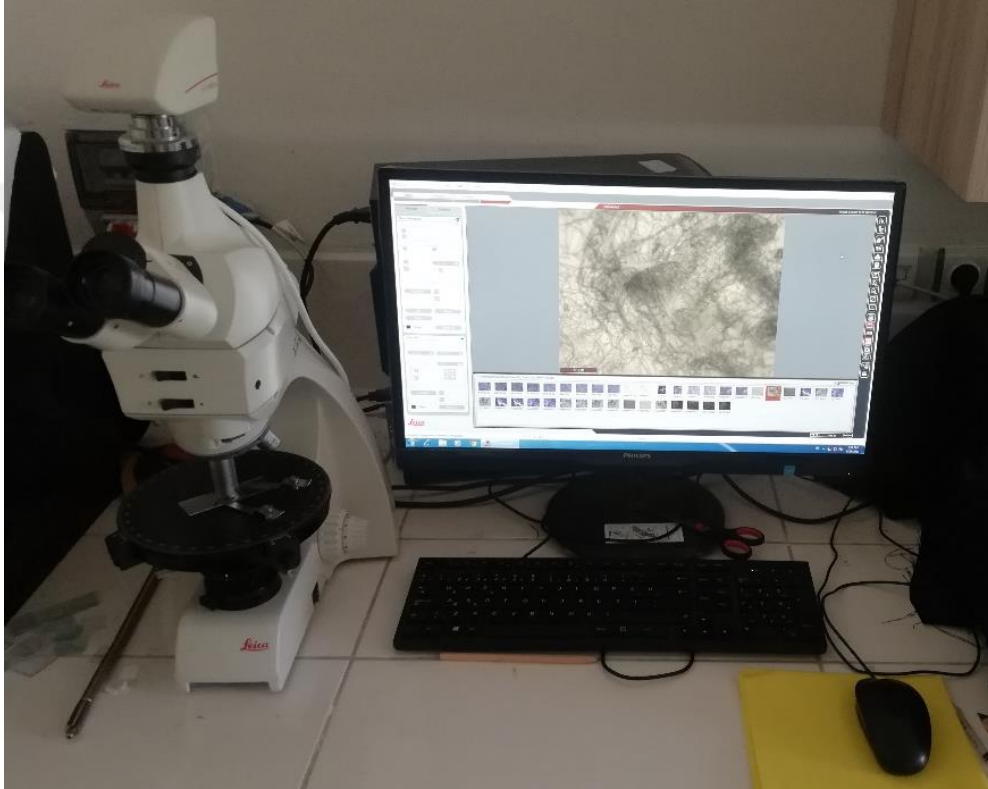
3.6.2. Tüplerin BDNF ile Katkılanması

Yıkanan ve kurutulan tüpler BDNF derişimi 22,5 mg/L olan BDNF çözeltisi içerisinde 24 saat bekletilerek etken maddenin lifler arasına emperenye olması sağlanmıştır. Bu işlem öncesinde tüpler saf suya konularak vakuma tabi tutulmuş ve gözenekler arasına hapsolmuş gazların çıkışı sağlanarak gözenekler tamamen açık hale getirilmiştir. Üretilen tüplerin BDNF ile katkılanma derecelerinin belirlenmesi için katkı

ve katkısız tüpler ayrı ayrı “Dumas” metodu ile azot analizine tabi tutulmuş ve örneklerin azot içerikleri arasındaki fark yardımıyla yapıya katılan BDNF yüzdesi hesaplanmıştır.

3.7 Üretilen Tüplerin Optik Mikroskop Görüntülerinin Alınması

Üretilen lif ve tüplere ait optik mikroskop görüntüleme işlemi Akdeniz Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü’nde gerçekleştirilmiştir. Örneklerin görüntüleri alınırken 40 kat büyütme oranı kullanılmıştır. SEM görüntüleri ise TEMGA bünyesinde bulunan ZEİSS-LEO 1430 SEM elektron mikroskobu cihazı ile yapılmıştır ve 10.000 kat büyütme altında görüntüler alınmıştır.



Şekil 3.5. Üretilen lifleri optik mikroskop ile görüntülenmesi

3.8. BDNF Katkılı Kitosan Tüplerin Hayvan Deneylerinde Kullanılması

Çalışmada 50 adet dişi, genç, 200-260 gr arasında Rattus norvegicus türü Wistar sıçan kullanılmıştır. Tüm denekler 12 saat gece, 12 saat gündüz sirkulusunda ve her kafeste 4 denek olacak şekilde sınırsız yem ve su ile beslenmiş, deney öncesinde bütün denekler kontrol edilerek, normal olmayanlar deney grubundan çıkarılmış ve denekler 5 ana gruba ayrılmıştır. Tüm prosedürler Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Bakım ve Kullanım Kuruluna sunulularak gerekli izinler alınmıştır. (Etik kurulu protokol numarası: 2019.03.004)

Grup 1: Bu grup kontrol grubu olup 10 adet denek içermektedir. Denekler normal yaşam döngülerine devam etmektedir.

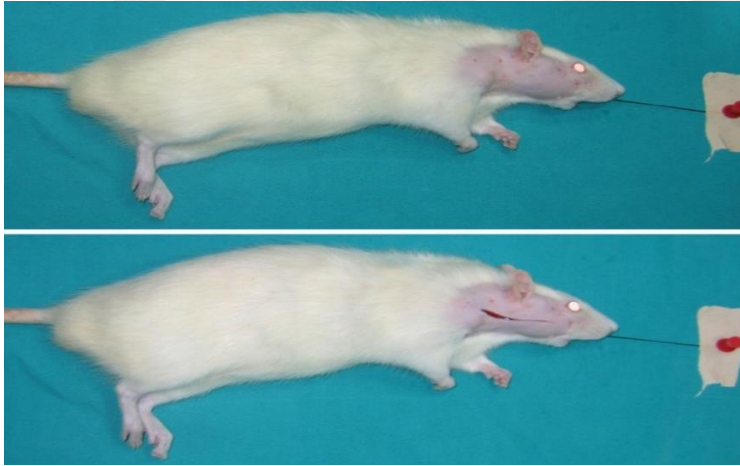
Grup 2: Bu grupta 10 adet denek bulunmaktadır. Bu deneklere cerrahi stres uygulanması amacıyla fasiyal sinire ulaşılmış ve dalları ortaya çıkarılarak kesi kapatılmıştır. Vibrisseal kas içerisine sadece serum fizyolojik enjeksiyonu yapılmıştır. Bu grup Sham grubu olarak isimlendirilmiştir.

Grup 3: 10 adet denek bu gruba yerleştirilmiş olup bu deneklerde fasiyal sinir transvers yönde kesilip, primer tamir gerçekleştirilmiştir.

Grup 4: 10 adet denek içeren bu grupta deneklerin fasiyal sinirleri transvers yönde kesilip iki sinir ucu arasında biyobozunur katkısız kitosan tüp yerleştirilmiştir.

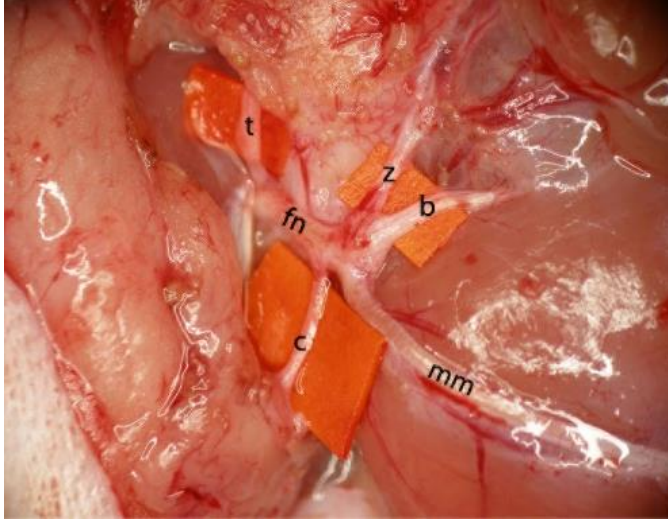
Grup5: Bu gruptaki 10 deneğin fasiyal sinirleri transvers yönde kesilip iki sinir ucu arasında BDNF katkılı kitosan tüp yerleştirilmiştir.

Olympus SZ61 marka ve model numarasına sahip fiberoptik aydınlatmalı operasyon mikroskobu altında deneklerin fasiyal sinir dallarına ulaşılmış ve Grup 3 – 5 deneklerinde fasiyal sinir orta seviyesinde transvers olarak kesilmiştir. Kesilen sinirin proksimal ve distal gövdesi dikiş materyali yardımıyla bağlanmış ve sinir liflerinin rejenere olması önlenmiştir. Şekil 3.6’da deney hayvanları üzerinde yapılan kesi gösterilmektedir.

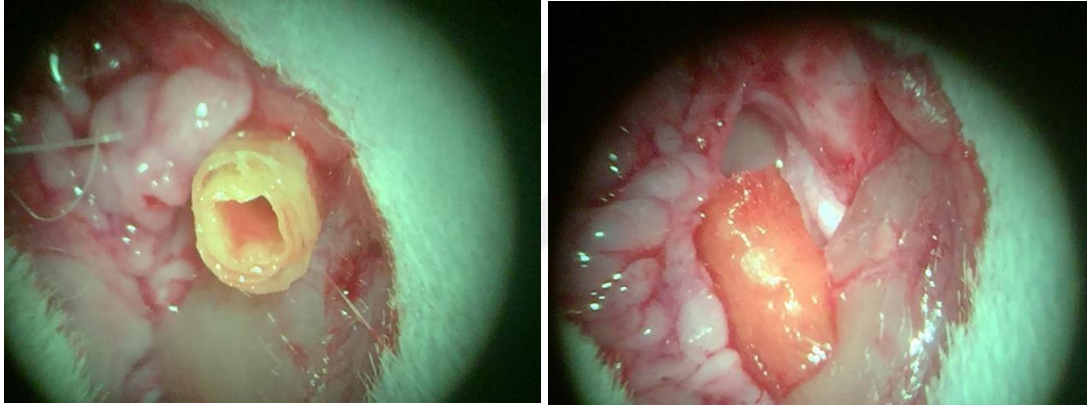


Şekil 3.6. Deney hayvanı üzerinde uygulanan kesi

Cerrahi işlem sonrasında kesi 4.0 dikiş materyali ile dikilerek kapatılmış ve denekler postoperatif bakım odasında iyileşmeye bırakılmıştır. Yapılan cerrahi işlemler sonrasında denekler standart kafeslerine alındıktan sonra deneklerin uyanmalarına yakın bir zamanda deneklere 3 gün boyunca 20 mg/kg TramadolHCl verilmiş ve postoperatif analjezileri sağlanmıştır. Kesi tedavisi uygulanan deneklere 50 mg/kg/gün dozunda alfa lipoik asit verilmiş, bu tedavi iki günde bir olacak şekilde (totalde 100 mg/kg) 2 ay boyunca uygulanmıştır. 2. ayın sonunda tüm deneklerin vibrisseal kıl hareketleri video kamera ile kaydedilmiş ve analizleri yapılmıştır.



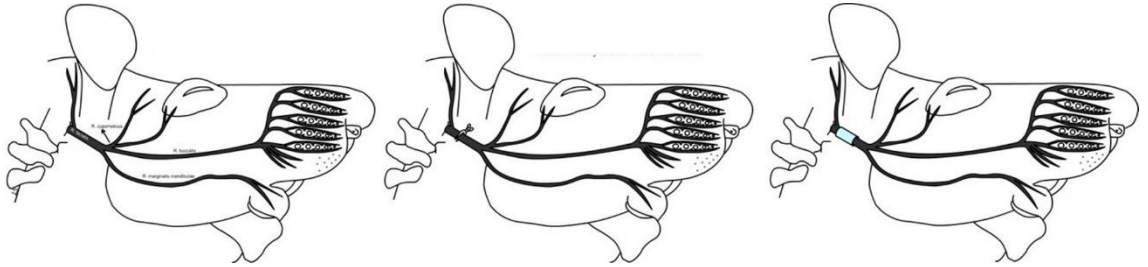
Şekil 3.7. Fasiyal sinir ve dalları (b: bukkal dal, c: servikal dal, fn: fasiyal sinirin ana gövdesi, mm: marginalismandibulae dalı, t: temporal dal, z: zygomatik dal)



(a)

(b)

Şekil 3.8. a) BDNF katkılı kitosan tüpün doku içerisine yerleştirilmesi **b)** BDNF katkılı kitosan tüpün fasiyal sinir transvers kesisine implante edilmesi



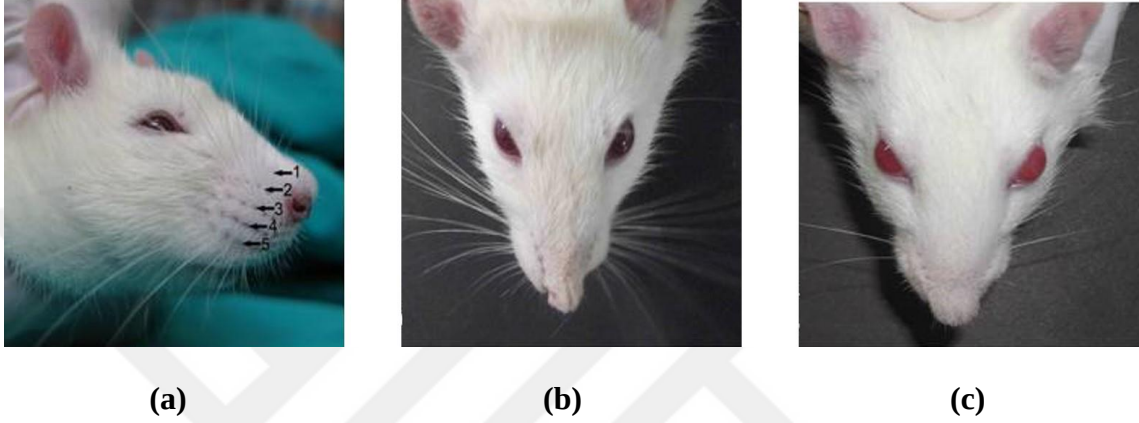
(a)

(b)

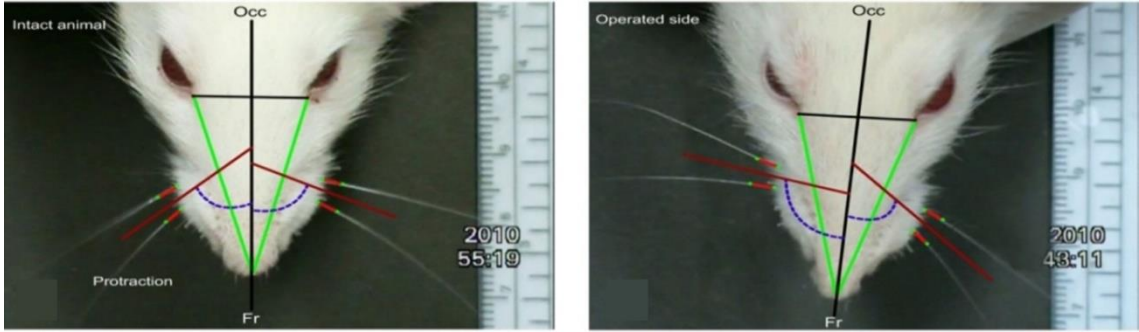
(c)

Şekil 3.9. a) Hasarsız fasiyal sinir **b)** fasiyal sinire transvers kesi uygulanması **c)** BDNF katkılı kitosan tüpün fasiyal sinir transvers kesisine implante edilmesi

Deney gruplarının oluşturularak tüplerin implante edilmesinin ardından deneklerin vibrissel kıllarından en kalın ve en uzun kıllar olan 3. Sıranın en arkadaki 2 kılı hariç diğer kıllar kesilmiştir (Şekil 3.10). Analiz amacıyla aktif eksplorasyon hareketi sırasında 3 – 5 dakika boyunca vibrisseal kılların hareketleri kayıt altına alınmıştır. Her denekten elde edilen kayıtlardan denek başının hareketsiz olduğu 1,5 saniyelik diziler halinde seçilerek biyometrik analizleri incelenmiştir. Deneklerin burun ucu ve göz içi köşeleri referans alınarak her bir kılın taban noktası ve gövde üzerinde 0,5 cm uzaklıktaki birer nokta bilgisayar ortamına konulmuş ve bıyık kıllarının protraksiyon ve retraksiyon açıları arasındaki fark büyüklük olarak hesaplanmıştır. (Şekil 3.11)



Şekil 3.10. a-b) Sağlıklı farenin vibrisseal kıllarının görüntüsü **c)** analiz amacıyla 3. sıranın en arka 2 kılının sağlam bırakılması sonrası görüntü



Şekil 3.11. Vibrisseal kılların kollarının protraksiyon ve retraksiyon açıları arasındaki farkın ölçülmesi

Her bir grup için elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak hesaplandıktan sonra istatistiksel anlamlılık Student t testi ile değerlendirilmiş ve tüm analizler SPSS 11.0 programı kullanılarak yapılmış ve anlamlılık düzeyi 0,05 olarak belirlenmiştir.

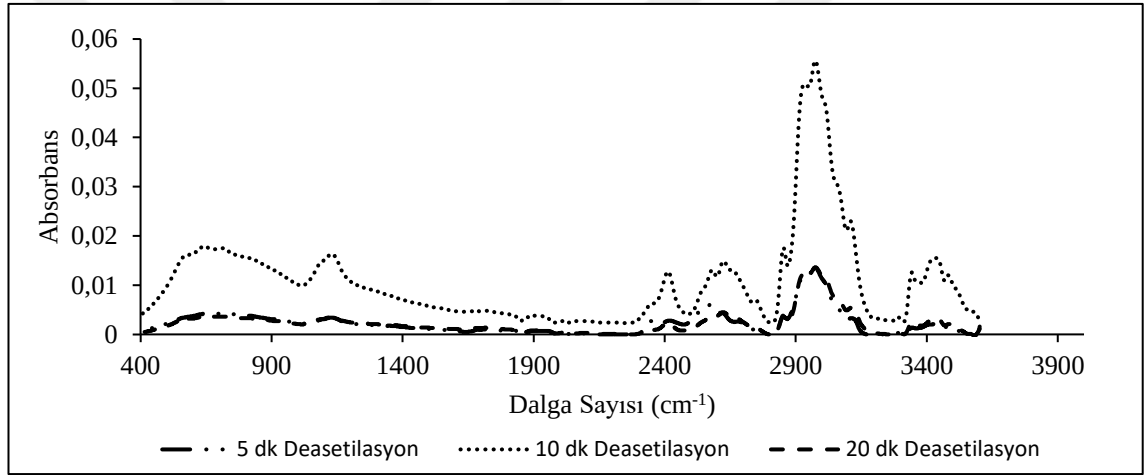
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde üretilen kitosan polimeri ve üretilen kitosan elektro liflerin karakterizasyon çalışmaları ile BDNF katkılı kitosan tüplerin uygulandığı hayvan deneylerine ait sonuçlar paylaşılmıştır.

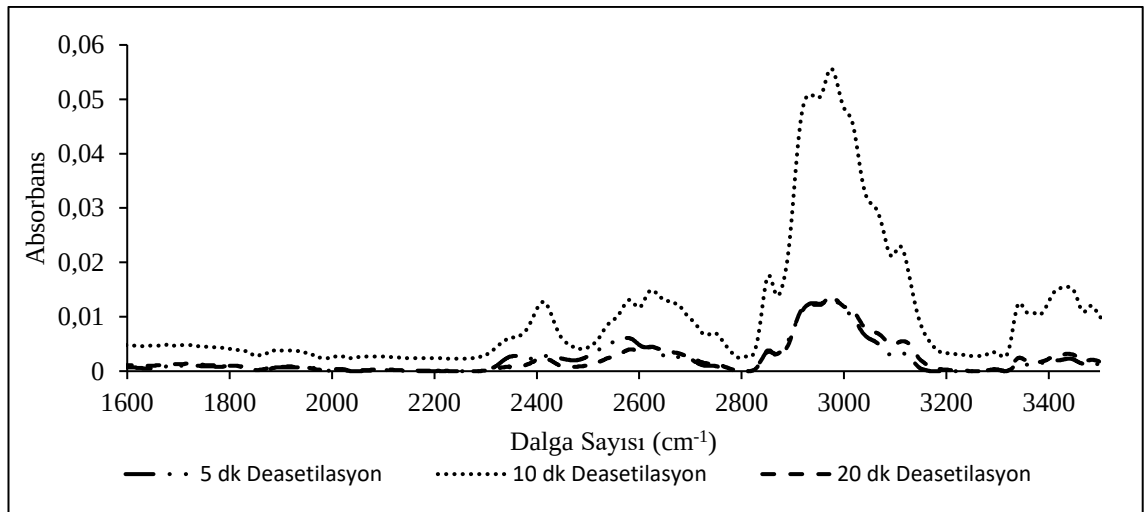
4.1 Kitosanın Karakterizasyonu

4.1.1. Üretilen Kitosanın Deasetilasyon Derecesi

Üretilen kitosan polimerinin deasetilasyon derecesinin belirlenmesi amacıyla Perkin Elmer UATR Two, cihazı ile 400-4000 cm^{-1} aralığında absorbasns ölçümleri alınmıştır. Deasetilasyon işlemi 3 farklı zaman parametresiyle çalışılmış ve örneklerin FTIR spektrumları Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı deasetilasyon sürelerine sahip örneklerin FTIR spektrumları



Şekil 4.2. FTIR spektrumlarının 1600-3500 cm^{-1} aralığındaki yakınlaştırılmış görüntüsü

Spektrumlarından elde edilen sonuçlar ışığında örneklerin 1655 ve 3450 dalga sayılarındaki absorbans değerleri kullanılarak aşağıdaki eşitlikler yardımıyla asetilasyon ve deasetilasyon dereceleri belirlenmiştir. Proses zamanına olarak bağlı deasetilasyon derecelerinin değişimi Çizelge 4.2’de verilmiştir.

$$DA(\%) = \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times 100 / 1,33 \quad (4.1)$$

$$DD(\%) = 100 - DA(\%) \quad (4.2)$$

Çizelge 4.2. Deasetilasyon derecesinin işlem süresine bağlı değişimi

Örnek No	Deasetilasyon Süresi (dak)	Asetilasyon Derecesi (%)	Deasetilasyon Derecesi (%)
1	5	61	39
2	10	30	70
3	20	15	85

Çizelge 4.2’de de görüldüğü gibi proses süresi uzadıkça de asetilasyon derecesi de yükselmiştir. Deasetilasyon süresinin 5 dakika olduğu örneklerde deasetilasyon derecesi %39, 10 dakika olduğu örneklerde %70 ve proses süresinin 20 dakika olduğu örneklerde deasetilasyon derecesi %85 olarak hesaplanmıştır. Kitosanın biyomalzeme olarak kullanımı için deasetilasyon derecesinin en az %80 olması gerektiği göz önüne alındığında 20 dk sonucunda elde edilen örneklerin deneylerin geri kalanında kullanımı uygun bulunmuştur.

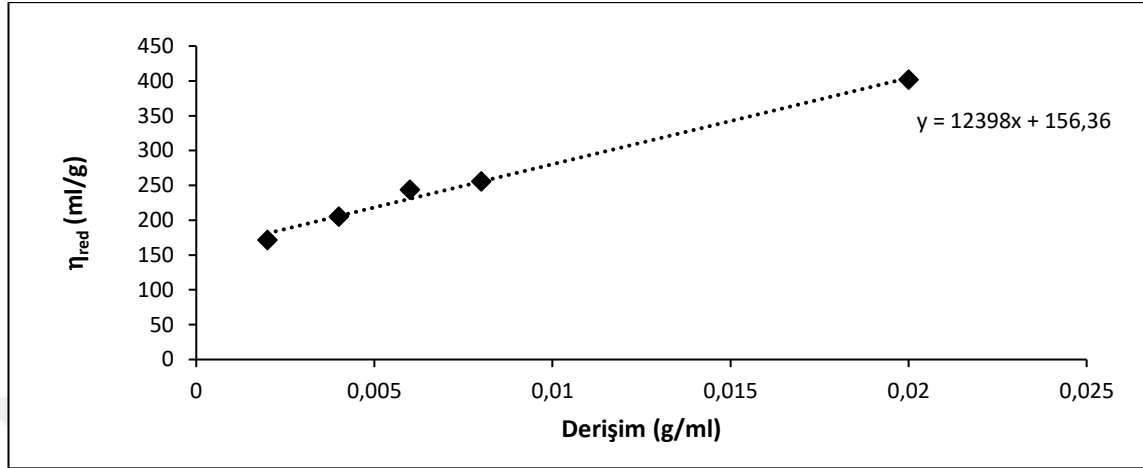
4.1.2. Üretilen Kitosanın Molekül Ağırlığı

0,1 M Sodyum asetat (CH_3COONa) – 0,2 M Asetik asit (CH_3COOH) çözeltisinin ve bu karışımında çözdürülerek elde edilen, ağırlık/hacim (a/v) derişimleri 0,002 g/ml, 0,004 g/ml, 0,006 g/ml, 0,008 g/ml ve 0,02 g/ml olan kitosan çözeltilerinin ve kılcal borulu viskozimetredeki akış süreleri ve viskozite değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kitosan çözeltilerinin viskozimetrede akış süreleri ve viskozite değerleri

Derişim (g/mL)	Akış Süresi (s)	η_r	η_{sp}	η_{red}
0	67	1	0	
0,002	90	1,343284	0,343284	171,6418
0,004	122	1,820896	0,820896	205,2239
0,006	165	2,462687	1,462687	243,7811
0,008	204	3,044776	2,044776	255,597
0,02	605	9,029851	8,029851	401,4925

Molekül ağırlığının hesaplanabilmesi için içsel viskozitenin hesaplanması gerekmektedir. Eşitlik 2.6'daki limit değerinin hesaplamak için indirgenmiş viskozitenin konsantrasyona bağlı değişimini incelemek yeterli olacaktır. Şekil 4.1'de indirgenmiş viskozitenin konsantrasyona bağlı değişimi görülmektedir.



Şekil 4.3. İndirgenmiş viskozitenin derişime bağlı değişimi

Şekil 4.1'de görüldüğü üzere indirgenmiş viskozite ile derişim arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. İçsel viskozite ($[\eta]$) değeri bu doğrusal ifadenin konsantrasyon "0" noktasına yaklaşırken limit değeri yani ordinat eksenin kestiği noktadır. Bu bilgi yardımıyla içsel viskozite ($[\eta]$) değeri 156,36 olarak hesaplanır. Bu aşamadan sonra molekül ağırlığının hesaplanması için Mark – Houwing eşitliği (Eşitlik 2.7) kullanılır. Eşitlikte geçen K ve α değerleri polimer çözücü sistemine ait katsayılar olup kitosanın deasetilasyon derecesine bağlı değişkenlerdir. Jia (2002) bu parametrelerin deasetilasyon derecesine bağlı değişimlerini Eşitlik 3.1 ve Eşitlik 3.2'de olduğu gibi tanımlamıştır.

$$K = 1,64 \times 10^{-30} x DD^{14} \quad (4.2.)$$

$$\alpha = -1,02 \times 10^{-2} x DD + 1,82 \quad (4.3.)$$

Eşitliklerde DD kitosanın deasetilasyon derecesidir. Sentezlenen kitosan polimerinin deasetilasyon derecesi yerine yazıldığında K parametresi $1,69 \times 10^{-3}$ ve α katsayısı 0,953 olarak hesaplanmıştır. K ve α kat sayılarının Mark – Houwing eşitliğinde yerine yazılmasıyla sentezlenen kitosanın molekül ağırlığı 160 kDa olarak hesaplanmıştır.

4.2. Kitosan Elektro Liflerin Üretimi ve Karakterizasyonu

4.2.1 Elektro Lif Üretimi İçin Optimum Derişimin Belirlenmesi

Deasetilasyon derecesi %85 ve ortalama molekül ağırlığı 160 kDa olan kitosan kullanılarak ağırlıkça (a/a) %4, %5, %6 ve %7 derişime sahip çözeltiler ile ağırlık – hacim (a/v) derişimi %3 olan PEO sulu çözeltilerinin kitosan – PEO oranı 3:1 olacak şekilde

karıştırılmasıyla elde edilen karışım çözeltilerin lif oluşturabilme durumları ve detayları Çizelge 4.3'te verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi kitosan polimerinden lif oluşumu kitosan konsantrasyonunu ağırlıkça (a/a) %4 ve %5 olduğu durumlarda görülmüş fakat hem homojen dağılımlı hem de boncuksuz yani kusursuz lif oluşumu sadece kitosan derişiminin %4 olduğu durumda gözlemlenmiştir. En uygun kitosan konsantrasyonunun belirlenmesinden sonra tüm elektro lif çekim işlemleri bu derişimde devam etmiştir.

Çizelge 4.3 Değişen kitosan konsantrasyonuna göre lif oluşum durumu

Kitosan Derişimi (a/a) (%)	PEO Derişimi (a/v) (%)	Karışım Oranı (K:PEO)	Lif Oluşum Durumu	Boncuklu Lif Oluşturma Durumu	Lif Dağılımı
4	3	3:1	var	Yok	Homojen
5	3	3:1	var	Var	Homojen
6	3	3:1	yok	-	-
7	3	3:1	yok	-	-

4.2.2. Elektro Lif Üretimi İçin Optimum Cihaz Parametrelerinin Belirlenmesi

Çizelge 4.4 ve 4.5'te uygulanan gerilim, akış hızı ve iğne ucu-toplayıcı arası mesafenin değişimine göre gözlemlenen lif formasyonları hakkındaki bilgiler verilmiştir. Örnek kodlamaları yapılırken ilk iki basamak uygulanan gerilimi, sonraki iki basamak akış hızını ve son iki basamak iğne ucuyla toplayıcı arasındaki mesafeyi belirtmektedir. Örneğin L250510 kodlu örnek uygulamanın 25 kV gerilim altında, 0,5 mL/h akış hızında ve iğne ucu – toplayıcı mesafesinin 10 cm uzaklıkta yapıldığını belirtmektedir.

Çizelge 4.4. Uygulanan gerilim ve akış hızının lif oluşumu ve yapısına etkisi

Örnek Kodu	Gerilim (kV)	Akış Hızı (mL/h)	Mesafe (cm)	Sonuç
L200510	20	0,5	10	Lif oluşumu Gözlenmedi
L201010		1	10	
L201510		1,5	10	
L202010		2	10	
L202510		2,5	10	

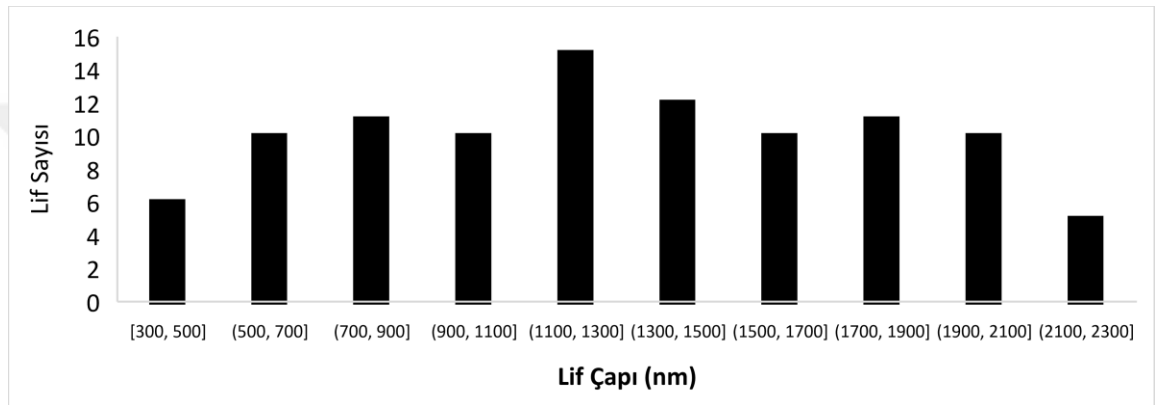
Çizelge 4.4'ün Devamı

Örnek Kodu	Gerilim (kV)	Akış Hızı (mL/h)	Mesafe (cm)	Sonuç
L250510	25	0,5	10	Lif oluşumu gözlenmedi
L251010		1	10	
L251510		1,5	10	
L252010		2	10	Lif formasyonu gözlemlendi çözücü yeteri kadar buharlaşmadığı için oluşan lifler polimer damlacıkları arasına hapsoldü
L252510		2,5	10	
L300510	30	0,5	10	Lif formasyonu gözlemlendi Polimer jeti devamlılık sağlamadı
L301010		1	10	Kusursuz lif formasyonu gözlemlendi homojen lif dağılımı gözlemlenmedi
L301510		1,5	10	
L302010		2	10	
L302510		2,5	10	
L350510	35	0,5	10	Lif formasyonu gözlemlendi Polimer jeti devamlılık sağlamadı
L351010		1	10	Lif formasyonu gözlemlendi Polimer jeti devamlılık sağlamadı
L351510		1,5	10	Kusursuz ve homojen dağılımlı lif formasyonu gözlemlendi
L352010		2	10	
L352510		2,5	10	

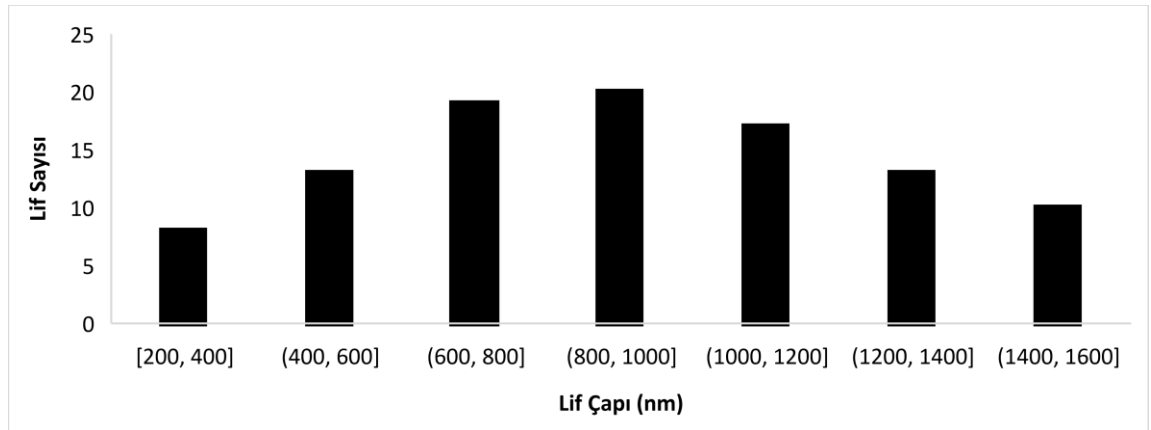
Kusursuz ve homojen dağılıma sahip lif oluşumu sadece ağırlıkça (a/a) %4 kitosan konsantrasyonunda gözlemlendiğinden cihaz optimizasyon işlemleri bu konsantrasyon baz alınarak yapılmıştır. Uygulanan potansiyel ve akış hızına bağlı olarak lif oluşumuna dair sonuçlar Çizelge 4.4'te sunulmuştur. Akış hızının belirlenmesinin ardından akış hızı 1,75 mL/h olarak sabit tutulmuş ve uygulanan potansiyel ve toplayıcı-iğne arasındaki mesafenin lif çapı ve gözenekli yapıya olan etkisi çalışılmış ve Çizelge 4.5'te verilen sonuçlar elde edilmiş ve Şekil 4.4-6'daki istatistiksel dağılım grafikleriyle de desteklenmiştir.

Çizelge 4.5 Uygulanan gerilim ve toplayıcı – iğne arası mesafenin ortalama lif çapına etkisi

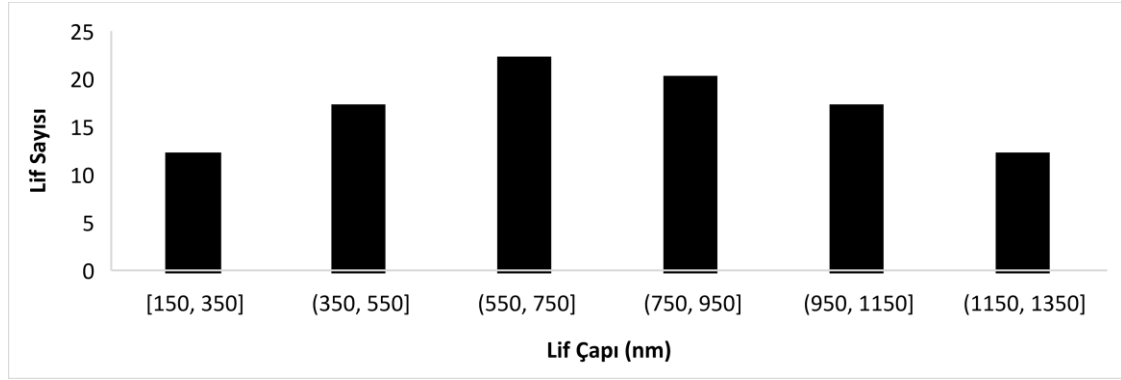
Örnek Kodu	Gerilim (kV)	Mesafe (cm)	Ortalama Lif Çapı (nm)
L3017510	30	10	1500
L3017515		15	1350
L3017520		20	900
L3517510	35	10	1300
L3517515		15	950
L3517520		20	750



Şekil 4.4. Örnek L3517510'un lif çapı dağılım grafiği



Şekil 4.5. Örnek L3517515'in lif çapı dağılım grafiği



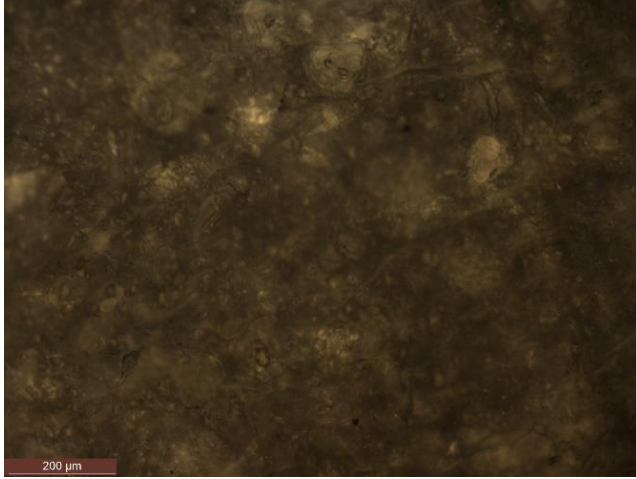
Şekil 4.6. Örnek L3517520'nin lif çapı dağılım grafiği

Ortalama lif çapını belirlemek amacıyla SEM görüntüleri kullanılmıştır. Farklı bölgelerden rastgele seçilen 100 farklı fiberin çapları Image Plus SEM analiz programı yardımıyla ölçülmüş ve ölçümlerin ortalaması alınmıştır.

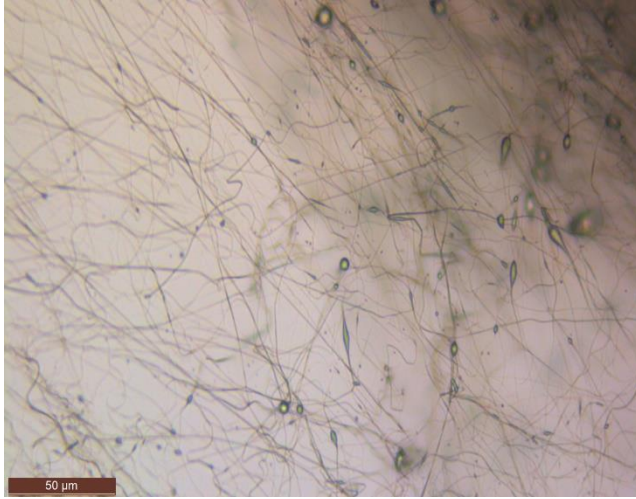
Sonuçlar göstermektedir ki uygulanan gerilimin lif oluşumunda çok önemli bir yeri bulunmaktadır. Uygulanan gerilimin iğne ucunda oluşan polimer damlacığını parçalayabilmesi için gerilimin oluşturduğu elektrik alan kuvvetinin polimer damlasının yüzey geriliminden daha büyük olması gerekmektedir. Ayrıca çözelti akış hızının lif oluşumu ve lif yapısına önemli ölçüde etki ettiği gözlemlenmiştir. Akış hızının optimal değer aralığının çok altında kaldığında polimer damlacıkları yeteri kadar büyüyemeden patladıkları için yüzeyde lif oluşturamamışlardır. Kesintisiz lif üretiminin sağlanabilmesi için akış hızıyla uygulanan gerilim birbirleriyle uyumlu olmalıdır. Yüksek gerilim uygulamanın olumlu yanları gözlemlenmiş olsa da polimer jetinin sürekli olabilmesi için polimer akış hızının uygulanan gerilime uygun seçilmesi gerekmektedir. Polimer jetinin sürekliliği korunmak koşuluyla uygulanan gerilimin yükselmesi polimer damlası içerisindeki polimer zincirlerinin birbirlerinden ayrılmasını kolaylaştırdığı için lif çapında düşüş sağlamaktadır. Uygulama alanına bağlı olarak gözenek yoğunluğu yüksek olan sistemler gerektiğinde bu nokta göz önünde bulundurulmalıdır. İğne ve toplayıcı arasındaki mesafenin çok kısa olması durumunda elektrik yüklü polimer damlaları toplayıcı ve iğne arasında yük atlamasına sebep olarak kısa devre oluşturmaktadırlar. Bu sebeple toplayıcı ve iğne arasındaki mesafeye çok dikkat edilmelidir. Mesafenin arttırılması polimer damlasından oluşan jetlerin daha fazla elektrik alana maruz kalmalarını sağlamaktadır. Bu senaryo polimer zincirlerinin yolda ilerlerken tekrar tekrar ayrışmasını dolayısıyla lif çapını düşürerek daha gözenekli bir yapının oluşumunu sağlamaktadır. Mesafenin kontrolsüz arttırılması sonucunda polimer damlaları çok fazla parçalanma ve dağılmaya maruz kalacakları için toplayıcı üstündeki kimi bölgelerde lif, kimi bölgelerde ise film oluşumuna sebep olmaktadır. Bu durum homojen lif dağılımını engelleyerek istenilen durumdan uzaklaşılmasına sebep olmaktadır.

4.2.3. Üretilen Liflerin Optik Mikroskop Görüntüleri

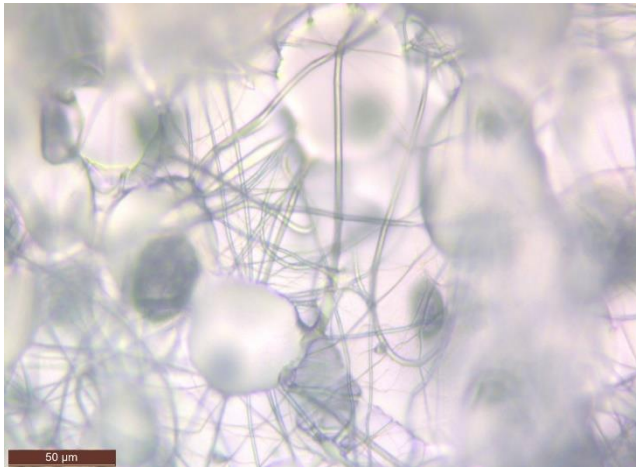
Üretilen tüplerin ve liflerin optik mikroskop ile 40 kat büyütülmüş görüntüleri alınmıştır. Bu görüntüler üretilen liflerin homojen dağılım ve lif kusurları gibi özelliklerin belirlenmesi ve gözlemlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu bölümde en iyi sonuç alınan 6 örnek ile lif oluşumunun gözlemlenmediği ve boncuklu lif oluşumunun belirlendiği örneklerin optik mikroskop görüntüleri Şekil 4.7 – 15'de verilmiştir.



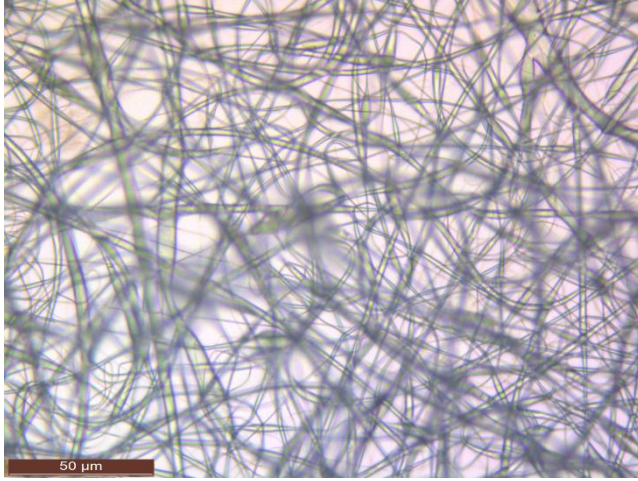
Şekil 4.7. Lif oluşumunun gözlemlenmediği örneklerin 10 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü



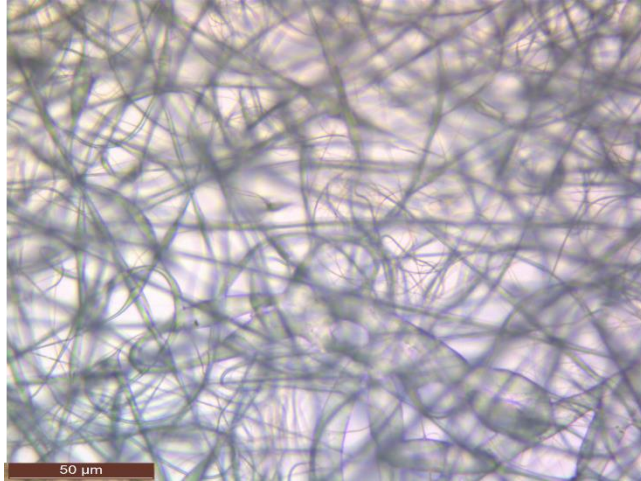
Şekil 4.8. Boncuklu lif yapısının 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü



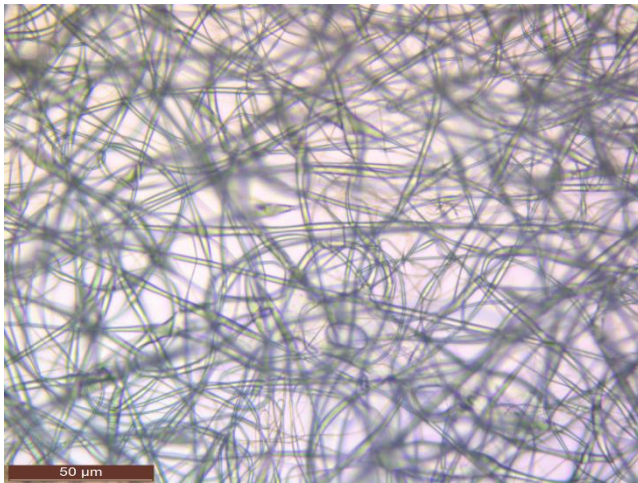
Şekil 4.9. Örnek L252010'un 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü



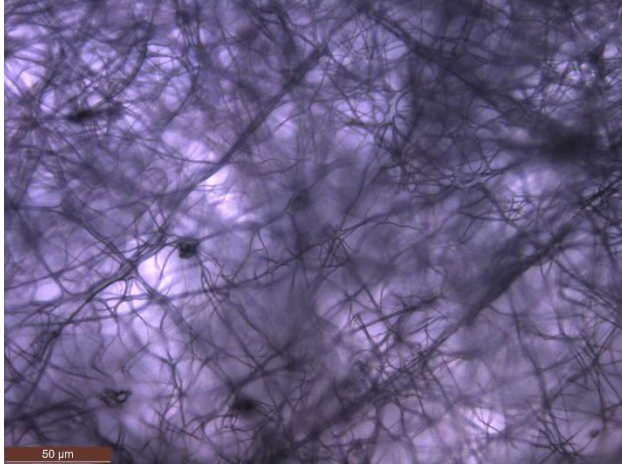
Şekil 4.10. Örnek L3012510'nun 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü



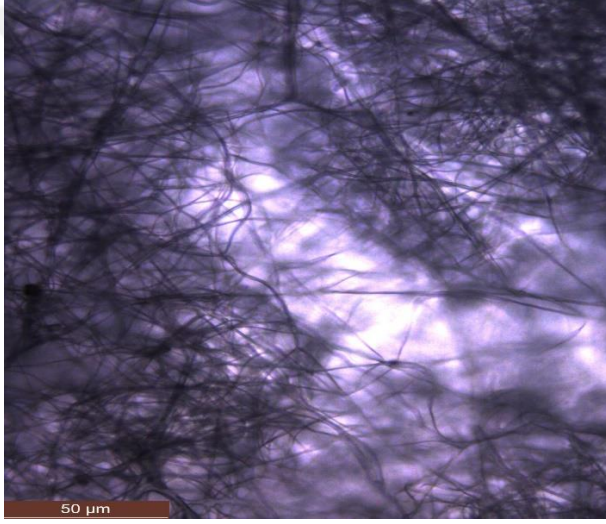
Şekil 4.11. Örnek L3012515'in 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü



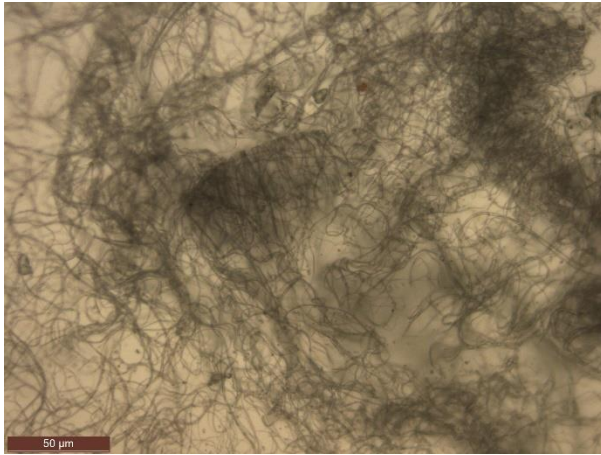
Şekil 4.12. Örnek L3012520'nin 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü



Şekil 4.13. Örnek L3517510'nun 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü



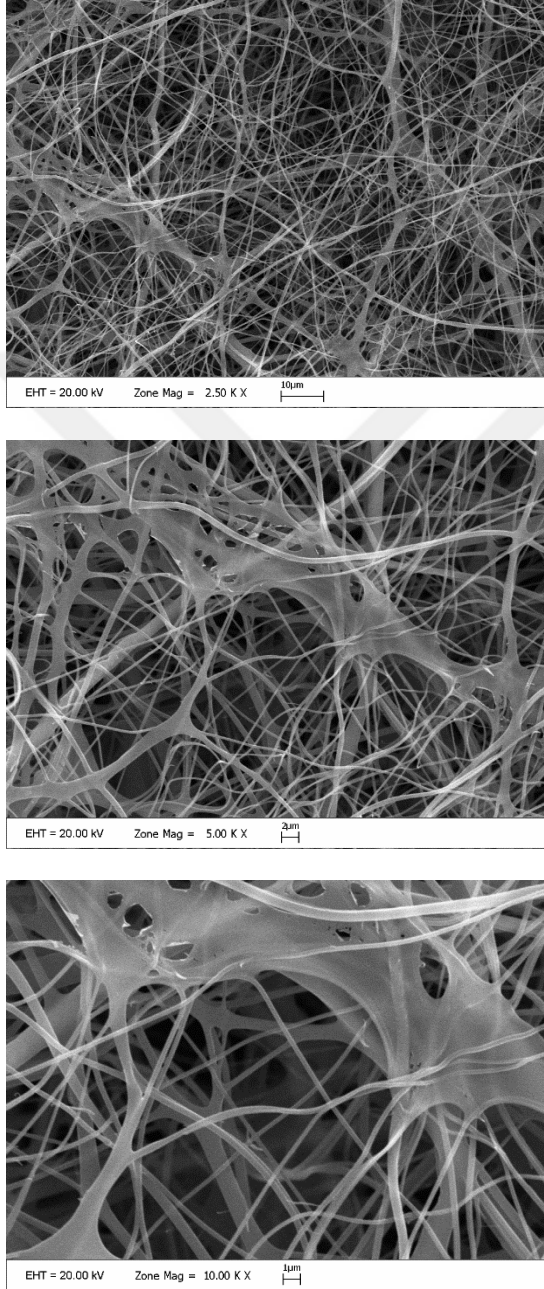
Şekil 4.14. Örnek L3517515'in 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü



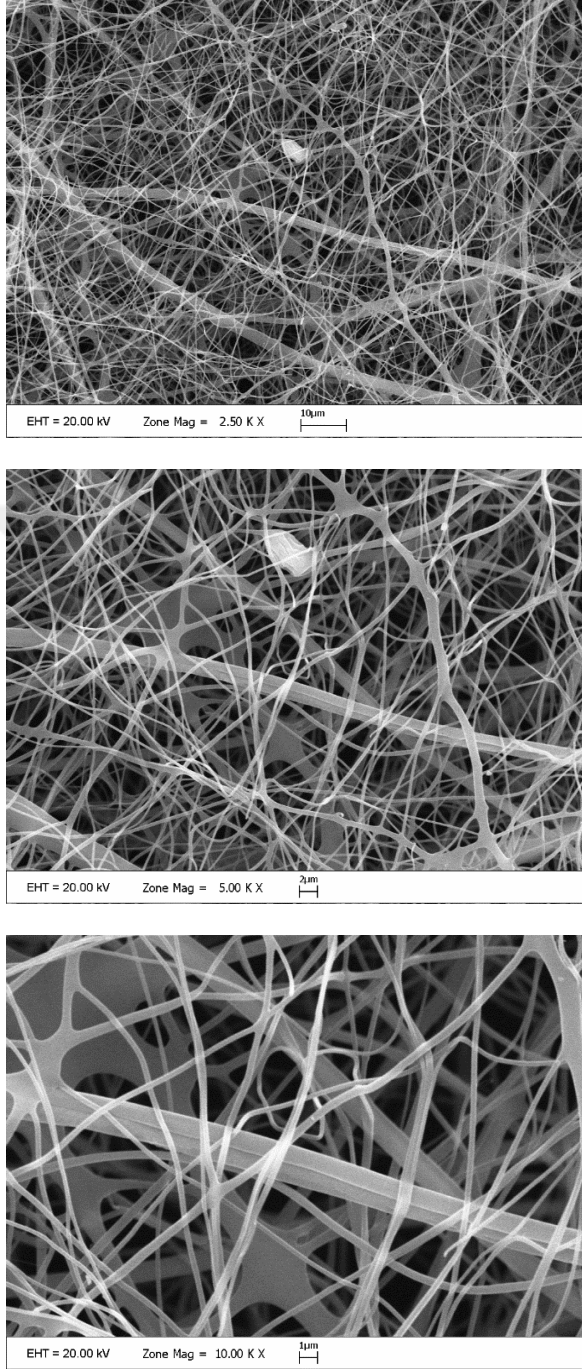
Şekil 4.15. Örnek L3517520'nin 40 kat büyütme oranlı optik mikroskop görüntüsü

4.2.4. Üretilen Liflerin SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Görüntüleri

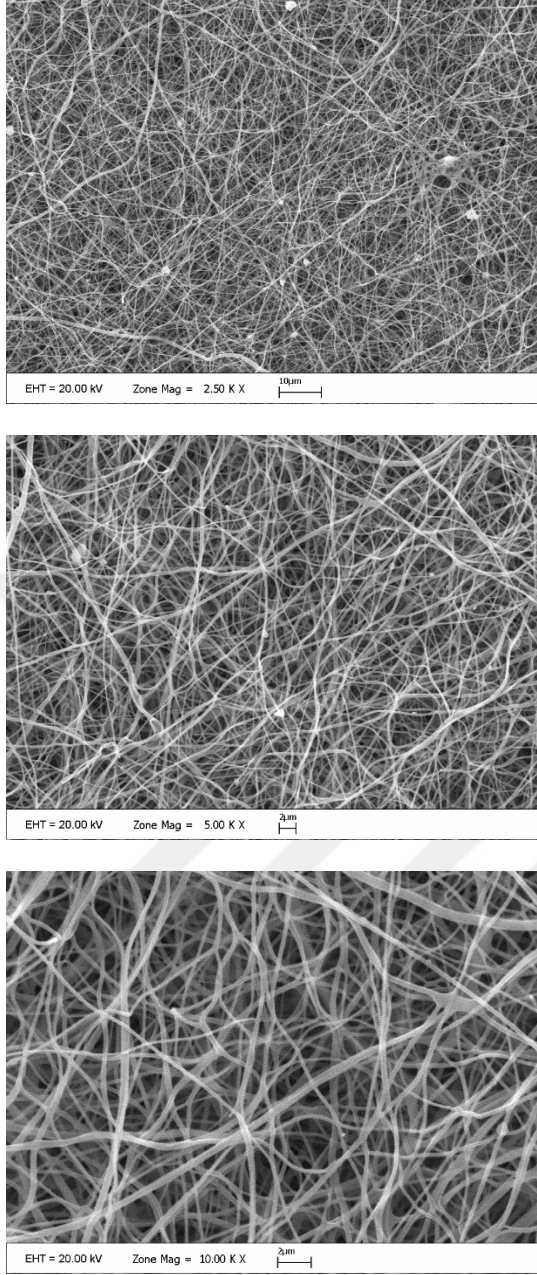
Üretilen liflerin lif çaplarının belirlenmesi ve gözenek dağılımlarının daha ayrıntılı gözlemlenebilmesi için SEM görüntüleri büyük önem taşımaktadır. Aşağıda tüp üretiminde kullanılan liflerin SEM görüntüleri verilmiştir. (Şekil 4.16 – 18)



Şekil 4.16. Örnek L3517510'un sırasıyla 2500 X, 5000 X ve 10000 X büyütme oranlı SEM görüntüleri



şekil 4.17. Örnek L3517515'in sırasıyla 2500 X,5000 X ve 10000 X büyütme oranlı SEM görüntüleri

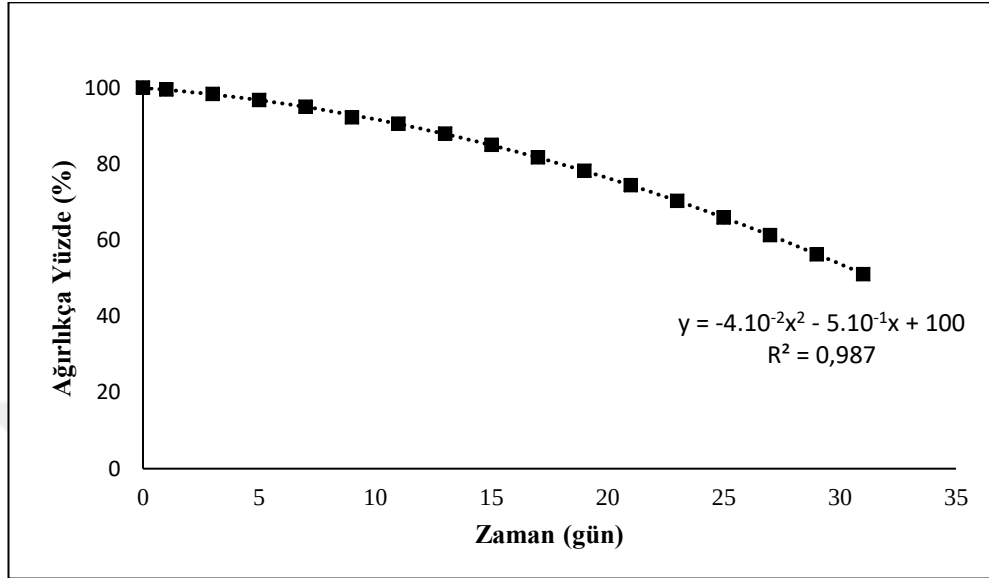


şekil 4.18. Örnek L3517520'nin sırasıyla 2500 X,5000 X ve 10000 X büyütme oranlı SEM görüntüleri

SEM görüntüleri, uygulanan gerilim ve akış hızının sabit olması koşuluyla iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafenin artışının lif çapının düşmesi, gözenek oranının yükselmesi, daha homojen lif ve gözenek dağılımı oluşumu üzerinde olumlu etkisi olduğu kabulünü desteklemiştir. Bu durum BDNF katkılama işlemi için avantaj oluşturmuş ve BDNF proteinin gözenekler arasına yerleşmesini kolaylaştırmıştır.

4.3. Kitosan Tüplerin Bozunma Testi Sonuçları

Yapılan testler sonucunda bozunmadan kalan kitosan yüzdesinin geçen zamana bağlı değişimi Şekil 4.19’da verilmiştir.



Şekil 4.19. Kalan kitosan kütlesinin zamana bağlı değişimi

Grafikte toplanan verilerin veri analizi yapıldığında ikinci dereceden bir polinom denklemine yaklaştığı ve bu denklemin apsisler eksenini kestiği noktanın 90. gün civarında olduğu hesaplanmıştır. Bu bilgi ile üretilen tüplerin canlı organizma içerisinde 90 günlük tedavi süresi oluşturabileceği öngörülmektedir.

4.4. BDNF Yüklü Kitosan Tüplerin Protein Miktarlarının Belirlenmesi

BDNF yüklü kitosan tüpler ve yüklü olmayan kitosan tüplerin içerdikleri azot miktarlarının kütlece yüzdeleri Çizelge 4.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Örneklerdeki azot miktarının kütlece yüzdeleri

	% Azot
Katkısız Kitosan Tüp	0,646
BDNF Katkılı Kitosan Tüp	1,232

Çizelge 4.6’da görülmektedir ki BDNF katkılama işlemi sonrasında örneklerin azot oranları arasında %0,586’lık bir fark oluşmuştur. Bu değer 6,25 olan azot – protein dönüşüm faktörü ile çarpıldığında üretilen katkılı tüplerin kütlece %3,67 oranında BDNF içerdiği sonucuna ulaşılmıştır. Katkılama işlemi için 22 mg/L derişimdeki çözeltiden 10 mL kullanılmış ve toplam 5 mg kitosan tüp kullanılmıştır. Bu durumda çözelti içerisindeki 0,22 mg BDNF’in 0,19 mg kadarının tüplere katkılандığı sonucuna varılmıştır.

4.4. Hayvan Deneylerinin Sonuçları

Deneklerin video tabanlı görüntü analizleri yardımıyla elde edilen vibrisseal kılların protraksiyon ve retraksiyon açıları arasındaki farkların büyüklükleri hesaplanmış ve Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Vibrisseal kılların motor performansının biyometrik analizi

Deney Grupları	Açı Farkı Büyüklüğü (°)
Grup 1	61,3±10,7
Grup 2	60,1±5,8
Grup 3	18,4±5,3
Grup 4	15,9±4,2
Grup 5	29,5±2,1

Deney gruplarına ait vibrisseal kılların protraksiyon ve retraksiyon açıları arasındaki farkların büyüklükleri karşılaştırıldığında Grup 1 (Kontrol Grubu), Grup 2 (Sham Grubu)’de büyüklük değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı ($p>0.05$); Grup 3 (primer tamir grubu) ve Grup 4 (kitosan tüp ile tamir grubu) karşılaştırıldığında ise primer tamir (Grup 3) grubunda kitosan tüp ile tamir (Grup 4) grubuna göre büyüklük değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı (ANOVA, *posthoc*: Tukey test, $p>0.05$) tespit edilmiştir. Grup 3 (primer tamir grubu) ve Grup 4 (kitosan tüp ile tamir grubu) ile Grup 5 (BDNF katkılı kitosan tüp ile tamir grubu) karşılaştırıldığında ise her iki grup çifti ile arasında istatistiksel olarak anlamlı seviyede bir artışa sahip olduğu tespit edilmiştir (ANOVA, *posthoc*: Tukey test, $p>0.05$). Kontrol grubuna yaklaşan protraksiyon ve retraksiyon açıları arasındaki fark değeri ile BDNF katkılı kitosan tüplerin fasiyal sinir yenilenmesini kolaylaştırarak iyileşme sürecini hızlandırdığı sonucuna ulaşılmıştır.

6. SONUÇLAR

Yapılan çalışmada karides kabukları kullanılarak kitosan polimeri üretilmiş ve üretilen kitosanın deasetilasyon derecesi ve ortalama molekül ağırlığı belirlenerek elektro lif çekim işlemine tabi tutulmuştur. Elektro lif elde etme işleminin başarılı olması için gerekli koşullar saptanmış ve bu koşulların lif yapısı ve kalitesini nasıl etkilediği incelenme fırsatı bulunmuştur. Sentez koşullarının üretilen kitosanın kalitesine ve kimyasal özelliklerine olan etkisi gözlemlenmiş gerek kitosan çözeltisinin konsantrasyonu gerekse de üretim yapılan cihazın proses parametrelerinin lif yapısı ve de lif kalitesi üzerinde önemli etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir.

- Üretilen kitosan polimerinin ortalama molekül ağırlığı viskozite yardımıyla hesaplanmış ve ortalama molekül ağırlığının 160 kDa olduğu görülmüştür.
- Kitinin deasetile edilerek kitosana dönüşmesi sırasında proses süresinin son derece önemli olduğu görülmüş, proses süresi uzadıkça deasetilasyon derecesinin yükseldiği gözlemlenmiştir. 20 dakikalık deasetilasyon işlemi sonucunda deasetilasyon derecesi %85 olan kitosan polimeri elde edilmiştir.
- Deasetilasyon sırasında yapıdan ayrılan asetil gruplarının molekül ağırlığı yapıya eklenen amin gruplarının molekül ağırlığından daha yüksek olduğu için deasetilasyon işlemi aynı zamanda molekül ağırlığında da düşüşe sebep olmaktadır. Bu sebeple deasetilasyon işlemi çok dikkatlice yapılmalıdır. Her ne kadar doku iskeleti olarak kullanılan kitosan için yüksek molekül ağırlıkları çok fazla istenmese de bozunma süresi molekül ağırlığına doğrudan bağlı olduğu için bu işlemler kontrollü bir şekilde ilerletilmelidir.
- Kitosan çözeltisi kullanarak lif üretebilmek için çözelti konsantrasyonunun belirli limit değerler arasında olması gerekmektedir. Bu limit değerlerinin dışına çıkıldığında lif oluşumu gözlemlenmemiş ya da homojenlik kaybolmuştur.
- Kitosan derişiminin ağırlıkça (a/a) %4'ten küçük ve kitosan : PEO oranının 3:1 olduğu durumda çözeltinin viskozite ve yüzey gerilimi değerlerinin çok düşük olmasından dolayı polimer jeti oluşturmak yerine sprey oluşturarak yüzey kaplama gerçekleşmiştir.
- Kitosan derişiminin ağırlıkça (a/a) %4 ve kitosan : PEO oranının 3:1 olduğu durumda uygulanan gerilim çözeltinin yüzey gerilimini yenmekte başarılı olmuş ve elektrik alan kaynaklı kuvvet polimer zincirlerinin birbirinden ayrılmasını sağlamıştır. Bu durum boncuksuz ve homojen dağılımlı lif oluşumunu sağlamıştır.
- Kitosan derişiminin ağırlıkça %5'ten büyük ve kitosan : PEO oranının 3:1 olduğu koşullarda PEO yüzey gerilimini düşürücü etki yapmış olsa da kitosan kaynaklı viskozitenin baskın gelmesi sebebiyle uygulanan gerilim yüzey geriliminden kaynaklanan zorlayıcı kuvvetleri yenememekte ve polimer damlacığının parçalanarak jet oluşturması engellenmiş olmaktadır.
- Kitosan derişiminin ağırlıkça (a/a) %5 ve kitosan : PEO oranının 3:1 olduğu durumda polimer damlacıkları parçalanabilmiş ve jet oluşturarak lif formasyonu kazanmışlardır. Fakat çözelti viskozitesi optimal değerden daha yüksek olduğu için polimer zincirler tam olarak birbirlerinden ayıramamış ve boncuklu yani kusurlu lif oluşumu gözlemlenmiştir.
- Optimum konsantrasyonda polimer damlacıklarının parçalanarak jet oluşturması için uygulanan gerilimin en az 25 kV olması gerektiği görülmüştür. Artan gerilimin lif

çapını düşürdüğü literatür taramalarında raporlanmış ve SEM görüntüleriyle de bu durum kanıtlanmıştır. Bu sebeple uygulanan gerilim kademeli olarak arttırılmış ve en düşük lif çapı ile en yüksek gözenek yoğunluğunun olduğu durumun 35 kV gerilim altında olduğu görülmüştür.

- Çözelti akış hızının optimal değerlerden daha yüksek olması durumunda polimer damlacıkları olması gerekenden daha büyük olmuş ve uygulanan gerilim damlacıkların tam olarak parçalanması için yeterli olmamıştır. Bu durum çözücünün sistemden uzaklaşmasını kısıtlayarak oluşan liflerin akması, ya da polimer damlacıkları içerisine hapsolmasına sebep olmuştur. Akış hızı optimum değere yaklaştıkça toplayıcıda oluşan ıslaklık azalmış ve biriken polimer damlacıkları küçülerek boncuk dediğimiz kusurlara dönüşmüştür.
- Çözelti besleme hızının 1,5 mL/h – 2,5 mL/h aralığında olduğu durumda homojen dağılımlı hatasız lifler oluşmuş ve süreklilik sağlanmıştır. Sürecin kontrolünün daha kolay olması amacıyla akış hızı ortalama değere yakın olan 1,75 mL/h olarak belirlenmiştir.
- Uygulanan gerilimin 35 kV olduğu durumda iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafenin 10 cm olduğu durumda lif oluşumu gözlemlenmiş fakat polimer jeti devamlılık göstermediği için homojen lif dağılımı gözlemlenememiştir. Mesafenin artmasıyla beraber polimer jeti devamlılık sağlamış ve oluşan liflerin çaplarının kademeli olarak azaldığı görülmüştür. En düşük lif çapının toplayıcı ile iğne ucu arasındaki mesafenin 20 cm olduğu durumda gözlemlenmiştir.
- Tüp üretimi için kullanılan tüplerin yıkanması ile gözenekler genişletilmiş ve BDNF'in yapıya girmesi kolaylaştırılmıştır. Ayrıca tüplerin vakum ortamında bekletilerek gözenekler arasına hapsolmuş havanın alınması BDNF için ekstra alan oluşturmuştur.
- Yapılan hesaplamalar sonucunda çözelti içerisindeki BDNF miktarının neredeyse tamamının tüpler tarafından emildiği görülmüştür.

Hayvan deneylerinin sonuçlarını aşağıdaki gibi özetlemek mümkündür.

- Primer tedavi uygulanan deneklerde 2 aylık süreç içerisinde beklenen yenilenme ve tedavi gözlemlenmemiştir.
- Kitosan tüp tek başına sinir rejenerasyonu için yeterli olmamaktadır. Katkısız kitosan tüp ile tedavi edilmek istenen deneklerin sunduğu veriler göstermektedir ki primer tedavi ile katkısız kitosan tüp ile uygulanan tedavi arasında belirgin bir fark gözlemlenmemektedir.
- BDNF proteinin sinir hücrelerinin büyüme ve yenilenme hızı üzerindeki etkisi, katkılama yapılan tüplerde etkisini göstermiş ve BDNF katkılı kitosan tüplerle yapılan tedavi primer tedavi ve katkısız kitosan tüp ile yapılan tedavilere göre daha etkin ve başarılı olduğu belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir.

Elde edilen bulgular sonucunda üretilen BDNF katkılı kitosan tüp yapısının fasiyal sinir kesisi tedavisi için uygun bir aday olduğu sonucuna varılmaktadır. Kitosan lifler ile oluşturulan tüp yapısı sinir ana gövdesi için klavuz görevi üstlenmiş, yanlış sinapslar oluşturarak sinir hücresinin yanlış dokulara aşılmasını ya da fasiyal sinir gövdesinin başka sinir demetlerine aşılmasını engelleyen iskelet yapısı oluşturmuştur. BDNF proteinin sinir rejenerasyonu ve koadaptasyonunu hızlandırıcı etkisi tedavi sürecini hızlandırmıştır. BDNF ile kitosan tüp yapısının birleşmesiyle fasiyal sinirin dallanması

engellenecek, dallanma sonucu oluşabilecek yeni uzantıların sebep olduğu değişken göz kırpma refleksleri, konuşma güçlükleri ve istemsiz kas seğirmeleri gibi yan etkilerin önüne geçilebilecek, yüz felci, tat alma duyusunda azalma ya da körelme, istemsiz yüz refleksleri ya da kontrolsüz mimik oluşumu gibi durumlar engellenerek hızlı bir tedavi imkanı sunulacaktır. Ekonomik, estetik deformasyon sebebiyle ortaya çıkabilecek psikolojik sorunların önüne geçilerek hem toplumsal refaha hem de literatüre katkılarda bulunulacaktır.



7. KAYNAKLAR

- Abdou, E. S., Nagy, K. S. A., & Elsabee, M. Z. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99(5), 1359-1367.
- Ahmed, A., Hearn, J., Abdelmagid, W., & Zhang, H. (2012). Dual-tuned drug release by nanofibrous scaffolds of chitosan and mesoporous silica microspheres. *Journal of Materials Chemistry*, 22(48), 25027-25035.
- Amiel, G. E., & Atala, A. (1999). Current and future modalities for functional renal replacement. *Urologic Clinics of North America*, 26(1), 235-246.
- Apel, P. J., Garrett, J. P., Sierpinski, P., Ma, J., Atala, A., Smith, T. L., Koman, L. A., & Van Dyke, M. E. (2008). Peripheral Nerve Regeneration Using a Keratin-Based Scaffold: Long-Term Functional and Histological Outcomes in a Mouse Model. *The Journal of Hand Surgery*, 33(9), 1541-1547.
- Bedian, L., Villalba-Rodríguez, A. M., Hernández-Vargas, G., Parra-Saldivar, R., & Iqbal, H. M. N. (2017a). Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 837-846.
- Bedian, L., Villalba-Rodríguez, A. M., Hernández-Vargas, G., Parra-Saldivar, R., & Iqbal, H. M. N. (2017b). Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 837-846.
- Bhardwaj, N., Nguyen, Q. T., Chen, A. C., Kaplan, D. L., Sah, R. L., & Kundu, S. C. (2011). Potential of 3-D tissue constructs engineered from bovine chondrocytes/silk fibroin-chitosan for in vitro cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 32(25), 5773-5781.
- Bhattacharai, N., Edmondson, D., Veiseh, O., Matsen, F. A., & Zhang, M. (2005). Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials*, 26(31), 6176-6184.
- Bhattacharai, N., Ramay, H. R., Gunn, J., Matsen, F. A., & Zhang, M. (2005). PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. *Journal of Controlled Release*, 103(3), 609-624.
- Bizarria, M. T. M., d'Ávila, M. A., & Mei, L. H. I. (2014). Non-woven nanofiber chitosan/peo membranes obtained by electrospinning. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(1), 57-68.
- Campoccia, D., Montanaro, L., & Arciola, C. R. (2013). A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials*, 34(34), 8533-8554.

- Catledge, S. A., Clem, W. C., Shrikishen, N., Chowdhury, S., Stanishevsky, A. V., Koopman, M., & Vohra, Y. K. (2007). An electrospun triphasic nanofibrous scaffold for bone tissue engineering. *Biomedical Materials*, 2(2), 142–150.
- Cavello, I. A., Contreras-Esquivel, J. C., & Cavalitto, S. F. (2014). Immobilization of a keratinolytic protease from *Purpureocillium lilacinum* on genipin activated-chitosan beads. *Process Biochemistry*, 49(8), 1332-1336.
- Chatelet, C., Damour, O., & Domard, A. (2001). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, 22(3), 261-268.
- Chivangkul, T., Pengprecha, S., Padungros, P., Siraleartmukul, K., Prasongsuk, S., & Muangsin, N. (2014). Enhanced water-solubility and mucoadhesion of N,N,N-trimethyl-N-gluconate-N-homocysteine thiolactone chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 108, 224-231.
- Cho, Y.-W., Jang, J., Park, C. R., & Ko, S.-W. (2000). Preparation and Solubility in Acid and Water of Partially Deacetylated Chitins. *Biomacromolecules*, 1(4), 609-614.
- Cooper, A., Bhattarai, N., & Zhang, M. (2011). Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan–PCL fibers for nerve tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 85(1), 149-156.
- Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792.
- Czechowska-Biskup, R., Jarosińska, D., Rokita, B., Ulański, P., & Rosiak, J. M. (2012). Determination of degree of deacetylation of chitosan - comparison of methods. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 17, 16.
- Li, D., Ouyang, G., McCann, J. T., Xia, Y. (2005). *Collecting Electrospun Nanofibers with Patterned Electrodes*. American Chemical Society.
- Davoodbasha, M., Kim, S.-C., Lee, S.-Y., & Kim, J.-W. (2016). The facile synthesis of chitosan-based silver nano-biocomposites via a solution plasma process and their potential antimicrobial efficacy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 605, 49-58.
- Desai, K., Kit, K., Li, J., & Zivanovic, S. (2008). Morphological and Surface Properties of Electrospun Chitosan Nanofibers. *Biomacromolecules*, 9(3), 1000-1006.
- Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvão, M. R., & Rocha, J. (2002). An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31(1), 1-8.
- Dutta, P. K., Dutta, J., & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal Of Scientific And Industrial Research* 63, 12.

- El Knidri, H., Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A., & Lahsini, A. (2018). Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1181-1189.
- Exposito, J.-Y., Cluzel, C., Garrone, R., & Lethias, C. (2002). Evolution of collagens. *The Anatomical Record*, 268(3), 302-316.
- Fan, J., De bruyn, M., Budarin, V. L., Gronnow, M. J., Shuttleworth, P. S., Breeden, S., Macquarrie, D. J., & Clark, J. H. (2013). Direct Microwave-Assisted Hydrothermal Depolymerization of Cellulose. *Journal of the American Chemical Society*, 135(32), 11728-11731.
- Gazi, M., & Shahmohammadi, S. (2012). Removal of trace boron from aqueous solution using iminobis-(propylene glycol) modified chitosan beads. *Reactive and Functional Polymers*, 72(10), 680-686.
- Geng, X., Kwon, O.-H., & Jang, J. (2005). Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials*, 26(27), 5427-5432.
- Ghorbel-Bellaaj, O., Younes, I., Maâlej, H., Hajji, S., & Nasri, M. (2012). Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), 1196-1201.
- Guellec, D. (1991). Short Chain Collagens in Sponges Are Encoded by a Family of Closely Related Genes. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 21923 - 21928.
- Guibal, E., Vincent, T., & Navarro, R. (2014). Metal ion biosorption on chitosan for the synthesis of advanced materials. *Journal of Materials Science*, 49(16), 5505-5518.
- Haaparanta, A.-M., Järvinen, E., Cengiz, I. F., Ellä, V., Kokkonen, H. T., Kiviranta, I., & Kellomäki, M. (2014). Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(4), 1129-1136.
- Haastert-Talini, K., Geuna, S., Dahlin, L. B., Meyer, C., Stenberg, L., Freier, T., Heimann, C., Barwig, C., Pinto, L. F. V., Raimondo, S., Gambarotta, G., Samy, S. R., Sousa, N., Salgado, A. J., Ratzka, A., Wrobel, S., & Grothe, C. (2013). Chitosan tubes of varying degrees of acetylation for bridging peripheral nerve defects. *Biomaterials*, 34(38), 9886-9904.
- Harish Prashanth, K. V., & Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: Modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in Food Science & Technology*, 18(3), 117-131.
- Hayes, B. L., Corporation, C. (2004). Recent Advances in Microwave- Assisted Synthesis. 12.

- Hu, X., Liu, S., Zhou, G., Huang, Y., Xie, Z., & Jing, X. (2014). Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, 185, 12-21.
- Huang, M., Khor, E., & Lim, L.-Y. (2004). Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 344-353.
- Huang, Z.-M., Zhang, Y.-Z., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63(15), 2223-2253.
- Hubbell, J. A. (1999). Bioactive biomaterials. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(2), 123-129.
- Illy, N., Benyahya, S., Durand, N., Auvergne, R., Caillol, S., David, G., & Boutevin, B. (2014). The influence of formulation and processing parameters on the thermal properties of a chitosan–epoxy prepolymer system. *Polymer International*, 63(3), 420-426.
- Jayakumar, R., Menon, D., Manzoor, K., Nair, S. V., & Tamura, H. (2010). Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 227-232.
- Jia, Z. (2002). Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid. *Carbohydrate Polymers*, 49(4), 393-396.
- Kannan, R. Y., Hills, A., Shelley, M. J., Bisase, B., Kapoor, K., Norris, P., & Nduka, C. (2020). Immediate compared with late repair of extracranial branches of the facial nerve: A comparative study. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 58(2), 163-169.
- Kasaai, M. R. (2008a). A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 71(4), 497-508.
- Kasaai, M. R. (2008b). A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 71(4), 497-508.
- Kasaai, M. R., Arul, J., Charlet, G. (2000). Intrinsic viscosity–molecular weight relationship for chitosan. *Journal of Polymer Science*. 38(19). 2591-2598.
- Kim, B., & Mooney, D. (1998). Engineering smooth muscle tissue with a predefined structure. *Journal of biomedical materials research*, 41 2, 322-32.
- Kim, B. S., Mooney, D. J. (1998). Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 16(5), 224-230.

- Kim, I.-Y., Seo, S.-J., Moon, H.-S., Yoo, M.-K., Park, I.-Y., Kim, B.-C., & Cho, C.-S. (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 26(1), 1-21.
- Ko, F., Gogotsi, Y., Ali, A., Naguib, N., Ye, H., Yang, G. L., Li, C., & Willis, P. (2003). Electrospinning of Continuous Carbon Nanotube-Filled Nanofiber Yarns. *Advanced Materials*, 15(14), 1161-1165.
- Kofuji, K., Qian, C.-J., Nishimura, M., Sugiyama, I., Murata, Y., & Kawashima, S. (2005). Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. *European Polymer Journal*, 41(11), 2784-2791.
- Kohmura, E., Yuguchi, T., Yoshimine, T., Fujinaka, T., Koseki, N., Sano, A., Kishino, A., Nakayama, C., Sakaki, T., Nonaka, M., Takemoto, O., & Hayakawa, T. (1999). BDNF atelocollagen mini-pellet accelerates facial nerve regeneration. *Brain Research*, 849(1-2), 235-238.
- Kulikov, S. N., Lisovskaya, S. A., Zelenikhin, P. V., Bezrodnykh, E. A., Shakirova, D. R., Blagodatskikh, I. V., & Tikhonov, V. E. (2014). Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: Molecular weight–activity relationship. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 74, 169-178.
- Kurita, K., Kaji, Y., Mori, T., & Nishiyama, Y. (2000). Enzymatic degradation of β -chitin: Susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*, 42(1), 19-21.
- Lee, J. H., Lee, J.-Y., Yang, S. H., Lee, E.-J., & Kim, H.-W. (2014). Carbon nanotube-collagen three-dimensional culture of mesenchymal stem cells promotes expression of neural phenotypes and secretion of neurotrophic factors. *Acta Biomaterialia*, 10(10), 4425-4436.
- Lertwattanaseri, T., Ichikawa, N., Mizoguchi, T., Tanaka, Y., & Chirachanchai, S. (2009). Microwave technique for efficient deacetylation of chitin nanowhiskers to a chitosan nanoscaffold. *Carbohydrate Research*, 344(3), 331-335.
- Li, L., Zhou, G., Wang, Y., Yang, G., Ding, S., & Zhou, S. (2015). Controlled dual delivery of BMP-2 and dexamethasone by nanoparticle-embedded electrospun nanofibers for the efficient repair of critical-sized rat calvarial defect. *Biomaterials*, 37, 218-229.
- Liu, D., Wei, Y., Yao, P., & Jiang, L. (2006). Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. *Carbohydrate Research*, 341(6), 782-785.
- Liu, N., Chen, X.-G., Park, H.-J., Liu, C.-G., Liu, C.-S., Meng, X.-H., & Yu, L.-J. (2006). Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers*, 64(1), 60-65.

- Liu, X. F., Guan, Y. L., Yang, D. Z., Li, Z., & Yao, K. D. (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 79(7), 1324-1335.
- Marler, J. J., Upton, J., Langer, R., & Vacanti, J. P. (1998). Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 33(1-2), 165-182.
- Martinou, A., Kafetzopoulos, D., & Bouriotis, V. (1995). Chitin deacetylation by enzymatic means: Monitoring of deacetylation processes. *Carbohydrate Research*, 273(2), 235-242.
- Matsumoto, I., Kaneko, M., Oda, M., & Watanabe, G. (2010). Repair of intra-thoracic autonomic nerves using chitosan tubes. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 10(4), 498-501.
- McGregor, C. E., & English, A. W. (2019). The Role of BDNF in Peripheral Nerve Regeneration: Activity-Dependent Treatments and Val66Met. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 522.
- Mizani, A. M., & Aminlari, B. M. (2007). A New Process for Deproteinization of Chitin from Shrimp Head Waste. *European Congress of Chemical Engineering, Copenhagen*. 16-20
- Mohammed, M. H., Williams, P. A., & Tverezovskaya, O. (2013). Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 166-171.
- Mourya, V. K., & Inamdar, N. N. (2008). Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive and Functional Polymers*, 68(6), 1013-1051.
- Muzzarelli, R. A. A. (2009). Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 167-182.
- Muzzarelli, R. A. A., & Rocchetti, R. (1985). Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 5(6), 461-472.
- Neamark, A., Rujiravanit, R., & Supaphol, P. (2006). Electrospinning of hexanoyl chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 66(3), 298-305.
- Niu, L., Jiao, K., Wang, T., Zhang, W., Camilleri, J., Bergeron, B. E., Feng, H., Mao, J., Chen, J., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2014). A review of the bioactivity of hydraulic calcium silicate cements. *Journal of Dentistry*, 42(5), 517-533.
- Noishiki, Y., Ito, H., Miyamoto, T., & Inagaki, H. (1982). Application of Denatured Wool Keratin Derivatives to an Antithrombogenic Biomaterial. *Kobunshi Ronbunshu*, 39(4), 221-227.

- Okamoto, Y., Kawakami, K., Miyatake, K., Morimoto, M., Shigemasa, Y., & Minami, S. (2002). Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 49(3), 249-252.
- Ozawa, T., Yamada, K., & Ishitani, Y. (2014). Hippocampal BDNF treatment facilitates consolidation of spatial memory in spontaneous place recognition in rats. *Behavioural Brain Research*, 263, 210-216.
- Pandis, C., Madeira, S., Matos, J., Kyritsis, A., Mano, J. F., & Ribelles, J. L. G. (2014). Chitosan-silica hybrid porous membranes. *Materials Science and Engineering: C*, 42, 553-561.
- Park, P.-J., Je, J.-Y., Jung, W.-K., Ahn, C.-B., & Kim, S.-K. (2004). Anticoagulant activity of heterochitosans and their oligosaccharide sulfates. *European Food Research and Technology*, 219(5), 529-533.
- Pasinli, A. (2004). Biyomedikal Uygulamalarda Kullanılan Biyomalzemeler. *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi*. 25-34.
- Pellá, M. C. G., Lima-Tenório, M. K., Tenório-Neto, E. T., Guilherme, M. R., Muniz, E. C., & Rubira, A. F. (2018). Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 196, 233-245.
- Pelletier, A., Lemire, I., Sygusch, J., Chornet, E., & Overend, R. P. (1990). Chitin/chitosan transformation by thermo-mechano-chemical treatment including characterization by enzymatic depolymerization. *Biotechnology and Bioengineering*, 36(3), 310-315.
- Pischedda, A., Tosin, M., & Degli-Innocenti, F. (2019). Biodegradation of plastics in soil: The effect of temperature. *Polymer Degradation and Stability*, 170, 109017.
- Ponder, K. P., Gupta, S., Leland, F., Darlington, G., Finegold, M., DeMayo, J., Ledley, F. D., Chowdhury, J. R., & Woo, S. L. (1991). Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(4), 1217-1221.
- Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.-E., Lim, T.-C., & Ma, Z. (2005). An Introduction to Electrospinning and Nanofibers. *World Scientific*.
- Rao, S. B., & Sharma, C. P. (1997). Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of Biomedical Materials Research*, 34(1), 21-28.
- Ratner, B. D. (2011). The Biocompatibility Manifesto: Biocompatibility for the Twenty-first Century. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 4(5), 523-527.

- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.
- Roldo, M., Hornof, M., Caliceti, P., & Bernkop-Schnürch, A. (2004). Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery: Synthesis and in vitro evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 115-121.
- Rong Huei Chen, Jaan Rong Chang, & Ju Shii Shyur. (1997). Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan. *Carbohydrate Research*, 299(4), 287-294.
- Rouse, J. G., & Van Dyke, M. E. (2010). A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications. *Materials*, 3(2), 999-1014.
- Schwab, I. R. (1999). Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 97, 891-986.
- Shahidi, F., & Abuzaytoun, R. (2005). Chitin, chitosan, and co-products: Chemistry, production, applications, and health effects. *Advances in Food and Nutrition Research*, 49, 93-135.
- Sharma, C., Dinda, A. K., Potdar, P. D., Chou, C.-F., & Mishra, N. C. (2016). Fabrication and characterization of novel nano-biocomposite scaffold of chitosan–gelatin–alginate–hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 64, 416-427.
- Shrestha, B. K., Mousa, H. M., Tiwari, A. P., Ko, S. W., Park, C. H., & Kim, C. S. (2016). Development of polyamide-6,6/chitosan electrospun hybrid nanofibrous scaffolds for tissue engineering application. *Carbohydrate Polymers*, 148, 107-114.
- Subramanian, A., Vu, D., Larsen, G. F., & Lin, H.-Y. (2005). Preparation and evaluation of the electrospun chitosan/PEO fibers for potential applications in cartilage tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 16(7), 861-873.
- Sugiura, H., Yunoki, S., Kondo, E., Ikoma, T., Tanaka, J., & Yasuda, K. (2009). In Vivo Biological Responses and Bioresorption of Tilapia Scale Collagen as a Potential Biomaterial. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(10), 1353-1368.
- Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), 145-171.
- Tanaka, N., Matsumoto, I., Suzuki, M., Kaneko, M., Nitta, K., Seguchi, R., Ooi, A., & Takemura, H. (2015). Chitosan tubes can restore the function of resected phrenic nerves. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 21(1), 8-13.

- Tang, Y., Du, Y., Li, Y., Wang, X., & Hu, X. (2009). A thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogel containing hydroxyapatite for protein delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91A(4), 953-963.
- Torgbo, S., & Sukyai, P. (2020). Biodegradation and thermal stability of bacterial cellulose as biomaterial: The relevance in biomedical applications. *Polymer Degradation and Stability*, 109232.
- Van Phu, D., Du, B. D., Tuan, L. N. A., Hung, L. T., Hiet, H. D., & Hien, N. Q. (2019). Preparation and Antifungal Activity Investigation of Oligochitosan-Zn²⁺ on *Colletotrichum truncatum*. *International Journal of Polymer Science*, 2019, 1-6.
- Vleggeert-Lankamp, C. L. a. M., de Ruiter, G. C. W., Wolfs, J. F. C., Pêgo, A. P., Feirabend, H. K. P., Lakke, E. a. J. F., & Malessy, M. J. A. (2005). Type grouping in skeletal muscles after experimental reinnervation: Another explanation. *The European Journal of Neuroscience*, 21(5), 1249-1256.
- Vögelin, E., Baker, J. M., Gates, J., Dixit, V., Constantinescu, M. A., & Jones, N. F. (2006). Effects of local continuous release of brain derived neurotrophic factor (BDNF) on peripheral nerve regeneration in a rat model. *Experimental Neurology*, 199(2), 348-353.
- Wang, B., Li, J., Zhang, J., Li, H., Chen, P., Gu, Q., & Wang, Z. (2013). Thermo-mechanical properties of the composite made of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and acetylated chitin nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 100-106.
- Wang, W., Itoh, S., Matsuda, A., Ichinose, S., Shinomiya, K., Hata, Y., & Tanaka, J. (2008). Influences of mechanical properties and permeability on chitosan nano/microfiber mesh tubes as a scaffold for nerve regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84A(2), 557-566.
- Whistler, R. L. (1993). Introduction To Industrial Gums. Academic Press, Inc., San Diego/New York/Boston/London/Sidney/Tokyo/Toronto. *Acta Polymerica.*, 44: 172-172.
- Wilhelm, J. C., Xu, M., Cucoranu, D., Chmielewski, S., Holmes, T., Lau, K., Bassell, G. J., & English, A. W. (2012). Cooperative Roles of BDNF Expression in Neurons and Schwann Cells Are Modulated by Exercise to Facilitate Nerve Regeneration. *Journal of Neuroscience*, 32(14), 5002-5009.
- Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941-2953.
- Xu, J., Zhang, J., Gao, W., Liang, H., Wang, H., & Li, J. (2009). Preparation of chitosan/PLA blend micro/nanofibers by electrospinning. *Materials Letters*, 63(8), 658-660.

- Yamane, S., Iwasaki, N., Majima, T., Funakoshi, T., Masuko, T., Harada, K., Minami, A., Monde, K., & Nishimura, S. (2005). Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 26(6), 611-619.
- Yamauchi, K., Maniwa, M., & Mori, T. (1998). Cultivation of fibroblast cells on keratin-coated substrata. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 9(3), 259–270.
- Yamauchi, K., Yamauchi, A., Kusunoki, T., Kohda, A., & Konishi, Y. (1996). Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physiochemical and biodegradational properties of films. *Journal of Biomedical Materials Research*, 31(4), 439-444.
- Yannas, I. V., Burke, J. F., Orgill, D. P., & Skrabut, E. M. (1982). Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin. *Science*, 215(4529), 174-176.
- Yarım, G , Kazak, F . (2015). Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör . *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 10 (2) , 120-129
- Yen, M.-T., Yang, J.-H., Tseng, Y.-H., Li, R.-C., & Mau, J.-L. (2011). Quality of Fungal Chitin Bread. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(5), 708-713.
- Yetiser, S., & Kahraman, E. (2008). An analysis of time-dependent changes of neurotrophic factors (BDNF, CNTF) in traumatic facial nerve injury of a nerve-cut and nerve-crush model in rats. *American Neurology Society*, 29(3), 392-396.
- Yi, H., Wu, L.-Q., Bentley, W. E., Ghodssi, R., Rubloff, G. W., Culver, J. N., & Payne, G. F. (2005). Biofabrication with Chitosan. *Biomacromolecules*, 6(6), 2881-2894.
- Yuan, Y., Chesnutt, B. M., Haggard, W. O., & Bumgardner, J. D. (2011). Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures. *Materials*, 4(8), 1399-1416.
- Zhang, H., & Neau, S. H. (2001). In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: Effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 22(12), 1653-1658.
- Zhang, Y., & Zhang, M. (2001). Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55(3), 304-312.
- Zhou, F.-L., & Gong, R.-H. (2008). Manufacturing technologies of polymeric nanofibres and nanofibre yarns. *Polymer International*, 57(6), 837-845.

Zhu, L., Liang, K., & Ji, Y. (2015). Prominent reinforcing effect of chitin nanocrystals on electrospun polydioxanone nanocomposite fiber mats. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 44, 35-42.



ÖZGEÇMİŞ

TUNÇ EREN AKAY
erenakay@akdeniz.edu.tr



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2017-2020	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü, Antalya
Lisans 2012-2016	TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Mühendisliği Bölümü, Ankara

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi 2017-Devam Ediyor	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Antalya
--	---

ESERLER

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1- Akay T.E., Hoda N., 2020, "Adsorption of Methylene Blue Dye onto Activated Carbon Cloth", 2. International Environmental Chemistry Congress (Envirochem), Antalya, TÜRKİYE.
- 2- Kara K., Semiz L., Akay T.E., Aydın E., Sankır N. D., Sankır M., 2016, "Influence of Fluorine Incorporation of Directly Disulfonated Copolymer Membranes on the Vanadium Redox Flow Battery (VRFB) Performance" 2016 MRS Spring Meeting, Phoenix, Arizona, USA.