

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KIKIRDAK DOKU HASARI TEDAVİSİNDE
KULLANILMAK ÜZERE LİF KABAĞI KATKILI
İPEK-KİTOSAN HİDROJEL DOKU
İSKELELERİNİN ÜRETİMİ

İbrahim Erkut ÖZER

Aralık, 2019

İZMİR

**KIKIRDAK DOKU HASARI TEDAVİSİNDE
KULLANILMAK ÜZERE LİF KABAĞI KATKILI
İPEK–KİTOSAN HİDROJEL DOKU
İSKELELERİNİN ÜRETİMİ**

**Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı**

İbrahim Erkut ÖZER

Aralık, 2019

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

İBRAHİM ERKUT ÖZER, tarafından **DOÇ. DR. AYLİN ZİYLAN** yönetiminde hazırlanan **“KIKIRDAK DOKU HASARI TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE LİF KABAĞI KATKILI İPEK-KİTOSAN HİDROJEL DOKU İSKELELERİNİN ÜRETİMİ”** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Aylin ZİYLAN

Yönetici

Dr. Öğr. Üyesi Funda Ali Arzen

Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Ahmet AYKAG

Jüri Üyesi



Prof. Dr. Kadriye ERTEKİN

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin ortaya çıkmasını sağlayan, her aşamasında beni destekleyen, çalışma disiplini kazandıran, güleryüzü ve ilgisiyle rol model olarak benimsediğim danışmanım Doç. Dr. Aylin ZİYLAN'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca benden bilgi ve desteklerini esirgemeyen gayriresmi danışmanım Arş. Gör. Oylum GÜNEŞ'e teşekkürlerimi sunarım.

Dinamik mekanik analizi çalışmaları için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Makine Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Metin Tanoğlu ve Arş. Gör. Mehmet Deniz GÜNEŞ'e, basma testi çalışmaları için Dokuz Eylül Üniversitesi Biyomekanik Bölümü doktora öğrencileri Reşit Buğra HÜSEMOĞLU ve Gizem BAYSAN'a teşekkür ederim.

Son olarak ilgi ve desteklerini esirgemedi her daim yanımda bulunarak hayatımı güzelleştiren babam Necdet ÖZER'e, annem Semiha BİLGİN'e, kardeşim İsmail Aykut ÖZER'e ve Şeyma YOLDAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında desteklenmiştir (Proje No. 2016.KB.MLT.002).

İbrahim Erkut ÖZER

KIKIRDAK DOKU HASARI TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE LİF KABAĞI KATKILI İPEK-KİTOSAN HİDROJEL DOKU İSKELELERİNİN ÜRETİMİ

ÖZ

Kıkırdak dokunun kendini yenileme özelliğinin düşük seviyede olmasından dolayı, dokudaki hasarın giderilmesinde güncel olarak kullanılan yöntemler sınırlı başarıya sahiptir. Son yıllarda, alternatif bir tedavi yöntemi olarak kullanılan doku mühendisliği yaklaşımı olumlu sonuçlar vermektedir. Bu çalışmada, kıkırdak doku hasarını gidermek için lif kabağı katkılı ipek-kitosan hidrojel doku iskeleleri üretilmiştir. Çalışmada biyouyumlu ve biyobozunur özellikteki ipek ve kitosan polimerleri, doğal kaynaklardan elde edilen ve toksin olmayan genipin ile çapraz bağlanmıştır. Hidrojel doku iskelelerinin mekanik özelliklerini güçlendirmek için, katkı elemanı olarak lif kabağı kullanılmıştır. Kitosan ve ipek çözeltilerinin eşit oranda karıştırılıp, lif kabağının eklenmesi ardından, yapıya dondurarak kurutma işlemi uygulanmıştır. Dondurarak kurutulmuş doku iskeleleri farklı genipin konsantrasyonları kullanılarak çapraz bağlanmıştır. Genipin konsantrasyonu değişiminin ve lif kabağı katkısının doku iskelesi özellikleri üzerinde etkisi incelenmiştir. Morfolojik ve kimyasal özelliklerinin karakterizasyonunda sırasıyla, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometresi (FTIR) kullanılmıştır. Doku iskelelerinin şişme davranışının belirlenmesi için fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi içerisinde şişme testi gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan doku iskelelerinin viskoelastik ve mekanik özelliklerinin karşılaştırılması için doku iskelelerine dinamik mekanik analiz (DMA) ve basma testi uygulanmıştır. Çalışma sonucunda, üretilen lif kabağı katkılı kompozit doku iskelelerinden L-CSG3 örneği, basma mukavemeti ve tan delta değerleri göz önüne alındığında, insan kıkırdak mekanik özelliklerine en yakın sonuçları vermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kıkırdak doku mühendisliği, hidrojel, doku iskelesi, lif kabağı, kitosan, ipek

PRODUCTION OF LUFFA CYLINDRICA REINFORCED SILK FIBROIN/CHITOSAN HYDROGEL SCAFFOLDS FOR CARTILAGE TISSUE DEFECTS

ABSTRACT

Current therapies for the treatment of cartilage defects are limited due to the low self-healing capacity of cartilage. In recent years, tissue engineering has been proposed as a promising approach for cartilage regeneration. In this study, silk fibroin-chitosan hydrogels reinforced with *Luffa cylindrica* were prepared for cartilage tissue defects. Biocompatible, biodegradable silk fibroin and chitosan polymers were cross-linked with genipin which is a natural and nontoxic crosslinking agent. In order to improve the mechanical properties of hydrogel scaffolds, *Luffa cylindrica* was used as the reinforcement. Scaffolds were prepared by mixing chitosan and silk fibroin solutions at a volume of 1: 1 followed by adding *Luffa cylindrica* and freeze-drying. Then, the freeze-dried scaffolds were crosslinked with genipin at different concentrations. The influence of genipin concentration and addition of the *Luffa cylindrica* on the scaffold properties were evaluated. The morphologies and chemical structures of the scaffolds were characterized by scanning electron microscope (SEM) and Fourier-transformed infrared spectroscopy (FTIR), respectively. The swelling ratio test of the scaffolds was carried out in phosphate buffered saline (PBS) solution. Furthermore, the viscoelastic and mechanical properties of the scaffolds were examined by dynamic mechanic analysis (DMA) and compression test. As a result of the study, among the *Luffa cylindrica* reinforced composite tissue scaffolds, L-CSG3 showed similar properties with the human cartilage tissue in terms of compressive modulus and tan delta values.

Keywords: Cartilage tissue engineering, hydrogel, scaffold, *Luffa cylindrica*, chitosan, silk fibroin

İÇİNDEKİLER

Sayfa

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZ	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi

BÖLÜM BİR - GİRİŞ.....	1
-------------------------------	----------

BÖLÜM İKİ - TEORİK BİLGİ	2
---------------------------------------	----------

2.1 Doku Mühendisliği Hakkında Genel Bilgiler	2
2.2 Biyouyumluluk ve Biyobozunurluk	4
2.3 Yüzey Özellikleri	4
2.3.1 Islatılabilirlik.....	5
2.3.2 Yüzey Pürüzlülüğü	5
2.3.3 Yüzey Sertliği ve Yumuşaklığı.....	6
2.3.4 Yüzey Gözenekliliği	6
2.4 Eklem Kıkırdağı Hakkında Genel Bilgiler.....	6
2.4.1 Eklem Kıkırdağı Hasarını Gidermek İçin Kullanılan Yöntemler.....	8
2.5 Hidrojeller Hakkında Genel Bilgiler	10
2.5.1 Hidrojellerin Sınıflandırılması.....	11
2.5.1.1 Kaynağına Göre	11
2.5.1.2 Polimerik Kompozisyonuna Göre.....	11
2.5.1.3 Konfigürasyona Göre	12
2.5.1.4 Çapraz Bağlanma Türüne Göre	12
2.5.1.5 Fiziksel Görünüşüne Göre	12

2.5.2 Hidrojellerde Çapraz Bağlanma	12
2.5.3 Hidrojellerde Şişme Davranışı.....	13
2.6 Çalışmada Doku İskelesi Üretilirken Kullanılan Malzemeler Hakkında Genel Bilgi	14
2.6.1 Lif Kabağı (Luffa Cylindrica)	14
2.6.2 Kitosan.....	15
2.6.3 İpek	17
2.6.4 Genipin	18
BÖLÜM ÜÇ – LİTERATÜR ÇALIŞMASI	20
BÖLÜM DÖRT – DENEYSEL ÇALIŞMALAR	22
4.1 Malzeme	22
4.2 Doku İskelesi Üretim Aşamaları	22
4.2.1 Lif Kabağının Hazırlanması	22
4.2.2 İpek Çözeltilisinin Hazırlanması.....	23
4.2.3 Kitosan Çözeltilisinin Hazırlanması	23
4.2.4 Lif Kabağı Takviyeli Kompozit Süngerlerin ve Lif Kabaksız Kontrol Grubunun Üretilmesi.....	24
4.2.5 Hidrojel Doku İskelelerinin Elde Edilmesi.....	24
4.3 Hidrojel Doku İskelelerinin Karakterizasyonu.....	25
4.3.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	25
4.3.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	25
4.3.3 Şişme Testleri	26
4.3.4 Dinamik Mekanik Analiz (DMA)	26
4.3.5 Mekanik Analiz (Basma Deneyi)	27
4.3.6 Termogravimetrik ve Diferansiyel Termal Analiz (DTA/TGA)	27

BÖLÜM BEŞ – DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR 28

5.1 Doku İskelelerinin Hazırlanması.....	28
5.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	29
5.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	32
5.4 Şişme Testi	34
5.5 Dinamik Mekanik Analiz	35
5.6 Termal Gravimetrik Analiz (TGA)–Diferansiyel Termal Analiz (DTA)	40
5.7 Mekanik Analiz (Basma Deneyi)	43

BÖLÜM ALTI – GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER 45

KAYNAKLAR 45

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Doku mühendisliği bileşenleri.....	3
Şekil 2.2 Yüksek kontak açısı (A) ve düşük kontak açısı (B).....	5
Şekil 2.3 Sağlıklı bir eklem kıkırdığı kesitinin şematik gösterimi: Eklem kıkırdığı katmanlarında hücresel yapı (A); kolajen fiber yapısı (B).....	7
Şekil 2.4 Kitosan ve ipeğin, genipin kullanılarak çapraz bağlanması.....	13
Şekil 2.5 Luffa cylindrica bitkisinin görünümü a) meyvesi b) dışarıdan görünen kabuk kısmı c) kabuğu soyulmuş lif kabağı görünümü d) liflerin içerisindeki çekirdekli yapı e) Lif kabağından ara kesit görünümü f) lif kabağının fibriler yapısı g) NaOH ile farklı sürelerde işlem görmüş lif kabağının SEM görüntüsü.....	15
Şekil 2.6 Kitosanın kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.7 Kitinin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.8 İpek lifi proteini ve serisin tabakasının taramalı elektron fotoğrafı.....	17
Şekil 2.9 Genipinin üretim şeması.....	18
Şekil 2.10 Genipin ile amin gruplarının çapraz bağlanma mekanizmaları.....	19
Şekil 4.1 Lif kabağının hazırlanma aşamaları (a) Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi içerisinde bekletme (b) Saf su ile yıkama (c) Kesme ve kurutma.....	23
Şekil 5.1 12 (a), 24 (b), 48 (c) saatlik çapraz bağlanma sonrasında doku iskeleleri...	29
Şekil 5.2 Genipin ile çapraz bağlanmış kontrol grubu (a) ve lif kabağı katkılı kitosan-ipek (b) sünger örneklerine ait fotoğraflar.....	29
Şekil 5.3 Kontrol grubuna ait ATR-FTIR analizleri.....	31
Şekil 5.4 Kompozit doku iskelelerine ait ATR-FTIR analizleri.....	31
Şekil 5.5 Kontrol grubunun SEM görüntüleri.....	33
Şekil 5.6 Kompozit doku iskelelerinin SEM görüntüleri.....	34
Şekil 5.7 Doku iskelelerinin şişme oranları.....	35
Şekil 5.8 Kontrol grubuna ait depolama modülü (E'), kayıp modülü (E'')-logaritmik frekans eğrileri.....	37
Şekil 5.9 Kompozit doku iskelelerine ait depolama modülü (E') , kayıp modülü (E'')-logaritmik frekans eğrileri.....	38

Şekil 5.10 Kompozit doku iskeleleri ve kontrol grubuna ait tan delta–logaritmik frekans eğrileri.....	38
Şekil 5.11 Kontrol grubuna ait tan delta–logaritmik frekans eğrileri (0-40 Hz frekans aralığı).....	39
Şekil 5.12 Kompozit doku iskelelerine ait tan delta–logaritmik frekans eğrileri (0-40 Hz frekans aralığı).....	40
Şekil 5.13 Çapraz bağlanmamış kontrol grubu doku iskelesine (CS) ait TGA-DTA eğrisi.....	41
Şekil 5.14 Çapraz bağlanmamış kompozit doku iskelesine (L-CS) ait TGA-DTA eğrisi.....	41
Şekil 5.15 Kontrol grubuna ait TGA eğrileri.....	42
Şekil 5.16 Kompozit doku iskelelerine ait TGA eğrileri.....	43
Şekil 5.17 Doku iskelelerinin basma modülleri.....	44

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 4.1 İlave edilen genipin konsantrasyonları ve içeriğe göre doku iskelelerinin isimlendirilmesi.....	25
Tablo 5.1 Doku iskelelerinin şişme oranları.....	35
Tablo 5.2 Doku iskelelerinin 1 Hz frekans değerinde depolama modülü (E'), kayıp modülü (E'') ve tan delta değerleri.....	36
Tablo 5.3 Diferansiyel Termal Analiz (DTA) sonuçları.....	43
Tablo 5.4 Üretilen doku iskelelerinin ortalama basma modülleri.....	44

BÖLÜM BİR

GİRİŞ

Travma ve kronik dejeneratif hastalıklar sonucu, kıkırdak doku yüzeyinde yapısal olarak hasarlar meydana gelmektedir. Kıkırdak dokunun avasküler ve göreceli olarak düşük hücresel metabolik aktivite özellikleri nedeniyle, oluşan hasar sonrası kendini yenileme kapasitesi sınırlıdır. (Yan ve diğer., 2010)

Kıkırdak doku hasarını gidermek konusunda, cerrahi yaklaşımların yanında ortopedi alanında doku mühendisliği yaklaşımı bir alternatif oluşturmuştur. Kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarının temel prensibi kondrosit veya kök hücrelerin biyouyumlu ve biyobozunur doku iskelesine ekilmesi ve hücre-doku iskelesi yapısının eklem hasarı bölgesine yerleştirilmesidir. Kullanılan doku iskeleleri kıkırdak hücre dışı matris yapısını taklit ederek hasarın giderilmesinde etkin rol oynar.

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmada, kıkırdak doku hasarının giderilmesinde kullanılmak üzere mekanik özellikleri geliştirilmiş, hidrojel yapıya sahip bir kompozit doku iskelesi üretilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada doku mühendisliği ve ortopedi alanında sıkça kullanılan ipek ve kitosan polimerleri, doğal kaynaklardan elde edilen ve toksik etkisi olmayan genipin ile çapraz bağlanmış, hidrojel yapıdaki bu doku iskelelerinin mekanik özelliklerini güçlendirmek için, katkı elemanı olarak lif kabağı kullanılmıştır.

BÖLÜM İKİ

TEORİK BİLGİ

Çalışmanın bu bölümünde doku mühendisliği ve hidrojel kavramlarından bahsedilip, eklem kıkırdağı özellikleri hakkında bilgi verilmiştir. Eklem kıkırdağı hasarının giderilmesinde kullanılan yöntemler ve bu yöntemlere bir alternatif olan doku mühendisliği yaklaşımı karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Canlı dokulara yapısal ve bileşen olarak benzer işlevde üretilebilmesi nedeni ile doku mühendisliği alanında tercih edilen hidrojellerde aranılan mekanik ve kimyasal özelliklerden bahsedilmiştir.

2.1 Doku Mühendisliği Hakkında Genel Bilgiler

IUPAC (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) tanımına göre, doku mühendisliği, doku hasarını gidermek ya da dokunun tamamını yenilemek için, hücreler, mühendislik metotları ve uygun biyokimyasal ve fizyokimyasal faktörlerin kombinasyonu kullanılarak, biyolojik fonksiyonların geliştirilmesi ya da yenilenerek yerlerinin alınmasıdır (Vert ve diğer., 2012).

Doku mühendisliği, tıp, biyomühendislik ve biyomalzeme bilimini, hücre biyolojisini, hücre-malzeme ilişkilerini ve yüzey karakterizasyonunu kapsayan interdisipliner bir alandır. Bu alanın amaçları doku fonksiyonlarını onarmak, korumak ya da geliştirmektir. Ayrıca bir hastalık ya da kaza sonrası işlevini kaybetmiş doku ve organları yenilemeyi amaçlar. Doku mühendisliği Şekil 2.1’de gösterildiği gibi genel olarak 3 ana bileşenden oluşur. Bunlar; a) hücreler, b) hücre fonksiyonları, tutunması ve nakli için bir platform olarak görev yapacak doğal ya da sentetik biyomalzemedan üretilmiş doku iskelesi, c) biyosinyal moleküllerdir (Arıkan, 2013).

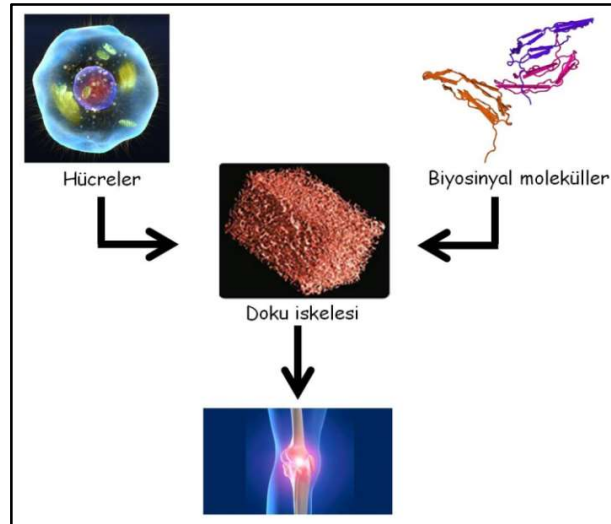
Dokuları ve organları yenilemek için kullanılan birkaç yaklaşım vardır. En yaygın kullanılan yaklaşım, hastadan biyopsi yoluyla alınan doku hücrelerinin *in vitro* ortamda yetiştirilmesidir. İzole edilmiş hücreler, hedef dokunun doğal hücre dışı ya

da bir başka deyişle hücre dışı matris yapısının (ECM) fonksiyonunu yerine getirebilen üç boyutlu doku iskelesi üzerine ekilip, yayılarak gelişirler.

Doku iskelesi tasarımı birkaç önemli gereksinimi karşılaması gerekmektedir. İdeal doku iskelesinin:

- a) Biyouyumlu olması,
- b) Hücre ekilmesini, gelişmesini, farklılaşmasını ve besin difüzyonunu destekleyecek düzeyde uygun gözenekli yapıya sahip olması,
- c) Yeni doku oluşumu için uygun çevreyi sağlayacak yeterli mekanik kararlılığa sahip olması,
- d) Hücre büyümesine izin verecek bozunma (degradasyon) hızına sahip olması ve bozunma ürünlerinin toksik olmaması,
- e) Hücre tutunması ve fonksiyonları için uygun yüzey kimyasına sahip olması gerekmektedir.

Hücre ekilmiş doku iskelesi, enjekte yoluyla ya da cerrahi olarak hastanın istenilen bölgesine yerleştirilir.



Şekil 2.1 Doku mühendisliği bileşenleri (Arıkan, 2013)

Uygun özellikteki bir doku iskelesini üretmek daha önce de belirtildiği gibi doku mühendisliği için kilit rodedir. Son yıllarda kıkırdak mühendisliği uygulamalarında hidrojel doku iskeleler yapısal ve bileşen olarak hücre dışı matrise benzerlikleri ve

hücre çoğalması ve hayatta kalması için elverişli özellikleri yüzünden dikkat çekmektedir.

2.2 Biyouyumluluk ve Biyobozunurluk

Biyouyumluluk, biyomalzemenin doku mühendisliği uygulamalarında kullanımı için en önemli kriterdir. IUPAC tanımına göre, biyouyumluluk, olumsuz bir etki yaratmadan canlı bir sistemle temas halinde bulunabilme özelliğidir (Vert, ve diğer., 2012). Dokuyu oluşturan hücrelerin bir implanta vereceği tepki, kullanılan malzemenin kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikleri ya da şekli ve yapısı gibi birçok faktöre bağlıdır (Williams, 2018).

IUPAC tanımına göre biyobozunurluk bir maddenin canlı içinde ya da laboratuvar ortamında enzimler tarafından katalize edilmesidir. Polimerik biyomalzemelerde ise biyobozunurluk, polimer zincirlerinin hidrofilik veya enzimatik olarak kırılıp, malzemenin erozyona uğramasıdır. Biyobozunur malzemelerin, kimyasal, fiziksel, mekanik ve biyolojik özellikleri zamanla değişir. Ayrıca degradasyon sonucu oluşan ürünlerin de özellikleri dikkate alınmalıdır (Burg, Porter ve Kellam, 2000).

Doku iskeleleri geçici fonksiyonel kullanımı olan uygulamalar için üretilir. Bu yüzden yapı biyobozunur özellikte olmalı ve bozunma süresi hücrelerin kendi hücre dışı matrisini oluşturma süreciyle eşleşmelidir. Ayrıca, bozunma sonucu oluşan ürünlerin de toksik özellikte olmaması ve diğer organlarla etkileşmeden vücuttan atılabilmesi gerekmektedir (O'Brien, 2011).

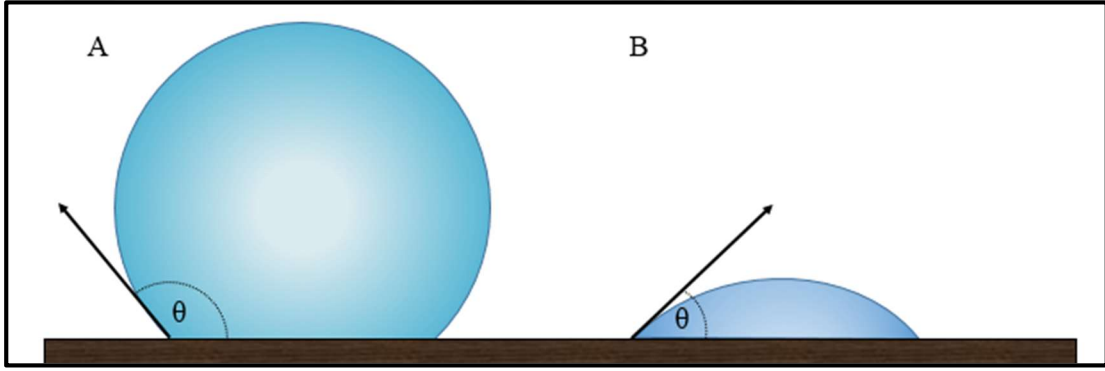
2.3 Yüzey Özellikleri

Doku iskelesinin yüzey topoğrafyası ve kimyası (ıslatılabilirlik, yumuşaklık ve sertlik, pürüzlülük), mikroyapısı (gözeneklilik, gözenek çapı, gözenek şekli, bağlantılı gözenekli yapıda olması) ve mekanik özellikleri üzerine ekilen hücrelerin tutunması, büyümesi ve farklılaşması gibi davranışlarını etkiler. Aynı zamanda,

yüzey özellikleri biyomalzemenin biyotanınırılığı ve biyouyumluluğunu belirler. Bundan dolayı malzeme yüzey özelliklerinin karakterize edilmesi önemlidir.

2.3.1 İslatılabilirlik

Yüzey hidrofobikliği/hidrofilikliği (yüzey ıslatılabilirliği) hücre davranışını etkileyen önemli faktörlerdendir. İslatılabilirlik, kontak açısı ölçülmesiyle belirlenebilir. Kontak açısı küçüldükçe yüzeyin hidrofilik özelliği artar. Yani düşük ıslatılabilirliğe sahip bir yüzey, yüksek kontak açısı sağlarken, yüksek ıslatılabilirliğe sahip bir yüzey düşük kontak açısı sağlar (Şekil 2.2). Yapılan çalışmalar, hidrofilik yüzeylerde hücrelerin daha çok yüzeye tutunup yayıldığını göstermektedir.



Şekil 2.2 Yüksek kontak açısı (A) ve düşük kontak açısı (B)

2.3.2 Yüzey Pürüzlülüğü

Yüzey pürüzlülüğü, hücre davranışını etkileyen bir başka önemli faktördür.

Lee ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada, polikarbonat (PC) membran yüzeyleri için MG63 osteoblast hücreleriyle hücre kültürü testlerini gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda yüzey pürüzlülüğü daha yüksek olan yüzeylerde daha fazla hücrenin tutunduğunu gözlemlemişlerdir (Lee ve diğer., 2004).

Bartolo ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada, pürüzsüz yüzeylerde nöronların daha çok geliştiğini göstermişlerdir (Bartolo ve diğer., 2008).

2.3.3 Yüzey Sertliği ve Yumuşaklığı

Katı formdaki dokuların sertliği, elastisite modül değeri (E) hesaplanarak karşılaştırılır.

Engler ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada, modül değeri düşük, yumuşak bir matriste, kök hücrelerin sinir hücrelerine farklılaşmasını, modül değeri yüksek, sert bir matriste ise kök hücrelerin kemik hücrelerine farklılaştığını belirlemişlerdir (Engler, Sen, Sweeney ve Discher, 2006).

2.3.4 Yüzey Gözenekliliği

Uygun gözeneklilik ve gözenek yapısı doku iskelesi üretiminde önemli bir faktördür. Yüksek gözeneklilik, hücre tutunma özelliğini etkilemezken, oksijen ve besin maddelerinin taşınmasını kolaylaştırır ve hücre büyümesini destekler.

Örneğin kemik doku iskelelerinde, kemik hücresi boyutu ve taşınımı göz önüne alındığında, en düşük gözenek çapı yaklaşık 100 µm olmalıdır. Ancak yeni kemik dokusu ve kılcal damar oluşumunu olumsuz yönde etkilememesi için kemik doku iskelelerinin 300 µm'den daha büyük gözenek çapına sahip olması önerilir (Karageorgiou ve Kaplan, 2005).

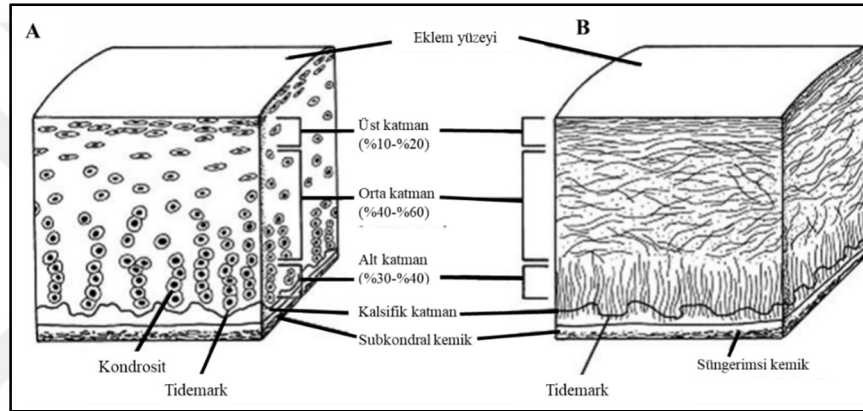
Han ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışmada, kıkırdak doku mühendisliği alanında kullanılması için ürettikleri farklı gözenek çaplarına sahip ipek doku iskelelerinde, gözenek çapları 90 µm–250 µm aralığında olan doku iskelelerinin kondrosit hücreleri için daha elverişli bir ortam oluşturduklarını belirlemişlerdir (Han ve diğer., 2015).

2.4 Eklem Kıkırdağı Hakkında Genel Bilgiler

Eklem kıkırdağı, eklem yüzeylerini kaplayan ince bir tabakadır. Genç ve normal bir eklemden, hyalin eklem kıkırdağı olarak adlandırılır. Kemik dokusunun

korunmasına katkı sağlayan bu özelleşmiş doku şok ve darbe emici özelliktedir. Eklem kıkırdağı içerisinde yapısal ve işlevsel olarak farkı özelliklere sahip katmanlar bulunur (Chuang, Chiang, Wong ve Chen, 2018).

Eklem kıkırdağı hacminin yüzde 10 ile 20'sini oluşturan üst katman, eklem kıkırdağının alt katmanlarını kayma gerilmelerinden korur. Bu katmandaki kolajen lifleri (tip I, tip II ve tip IX) sıkı bir düzende ve eklem kıkırdağı yüzeyine paralel olacak şekilde bulunurlar (Şekil 2.3). Üst katmanda diğer katmanlara göre daha fazla sayıda yassı şekile sahip kondrositler bulunmaktadır (Fox, Bedi ve Rodeo, 2009).



Şekil 2.3 Sağlıklı bir eklem kıkırdağı kesitinin şematik gösterimi: Eklem kıkırdağı katmanlarında hücre yapısı (A); kolajen fiber yapısı (B) (Fox ve diğer., 2009)

Proteoglikanları ve üst katmana göre daha kalın kolajen lifleri içeren orta katman, eklem kıkırdağı hacminin yüzde 40 ile 60'ını oluşturur. Bu katmandaki kondrositler küresel biçimde ve göreceli olarak daha az yoğunluktadır. Üst katman ve diğer alt katmanlar arasında anatomik ve fonksiyonel bir köprü vazifesi görür. Basma kuvvetlerine karşı mukavemeti sağlayan ilk katmandır (Fox ve diğer., 2009).

Basma kuvvetlerine karşı mukavemeti en çok güçlendiren alt katmanda ise göreceli olarak en kalın kolajen lifleri ve en çok miktarda proteoglikan bulunur. Diğer katmanlara göre daha mukavim olmasının nedeni bu katmandaki kolajen liflerinin eklem yüzeyine dik doğrultuda bulunmasıdır. Eklem kıkırdağı hacminin yüzde 30 ile 40'ını oluşturur (Fox ve diğer., 2009).

Kalsifik kıkırdak alt katmanda bulunan kolajen liflerinin subkondral kemiğe sabitlenmesini sağlar. Kalsifik kıkırdak ile alt katmanı ayıran sınıra tidemark adı verilir (Fox ve diğer., 2009).

Eklem kıkırdağının birincil amacı, temas eden eklem yüzeyinden kaynaklanan sürtünme ve gerilmeleri azaltıcı özellikte pürüzsüz ve kaygan bir yüzey sağlamaktır. Eklem kıkırdağında oluşmuş lezyonlar, kendiliğinden giderilip yenilenemez ve eklem fonksiyonlarını kısıtlar. İlerleyen zamanlarda kireçlenmeye (osteoarthritis) neden olabilir (Chuang ve diğer., 2018).

2.4.1 Eklem Kıkırdağı Hasarını Gidermek İçin Kullanılan Yöntemler

Eklem kıkırdak dokusunda görülen hasarlar hızlı bir şekilde giderilemez ve bu hasarı gidermek için uygulanan metotlar da sınırlıdır. Hafif düzeydeki hasarlar kıkırdak çevresi kasların fizyoterapi ile güçlendirilmesi ile tedavi edilebilir. Ayrıca bu düzeydeki hasarlarda ağrı ve oluşan şişme enfeksiyon giderici ilaçlar kullanılarak azaltılabilir (Ferrari, ve diğer., 2015). Ancak kıkırdak hasarı daha ciddi durumda ise cerrahi müdahale gerekli olabilir. Ağrı azaltma açısından artroskopik lavaj/debridman gibi yöntemler kullanılarak, doku temizlenebilir (Chuang ve diğer., 2018).

Mikrokırık yöntemi bahsi geçen tekniklerden biridir. Kemik yüzeyinde açılan küçük deliklerde kök hücre içeren hematoma geliştirilebilir. Hematoma içerisindeki kök hücrelerin kondrositlere farklılaşmasıyla yeni bir kıkırdak oluşturabilir. Bu metot diğerlerine göre göreceli olarak hızlı olsa da hematoma hasarı tamamen gideremez. Ayrıca mikrokırık yöntemi ile oluşan kıkırdak, fibroz kıkırdaktır ve bu kıkırdak tipi hiyalin kıkırdağa göre daha zayıf, yoğun ve düşük tokluğa sahiptir. Bu zayıf özellikler hasarın tekrarlanma olasılığını artırır (Furukawa, Eyre, Koide ve Glimcher, 1980).

İkinci metot olan, otolog osteokondral transplantasyon (mozaikplasti), hasarlı olan bölgeye, yük altında olmayan bir bölgeden kıkırdak transferini içerir. Fakat bu metot

sadece küçük hasarları gidermek için kullanılabilir çünkü uygun donör alanları kısıtlıdır. Yük altında olmayan bölgeden alınıp yük altında nakil edilen donör kıkırdak, burada hasar görmeye daha yatkındır, çünkü iki ayrı bölgedeki kıkırdağın yapısal özellikleri farklıdır. Bu problemin önüne geçmek için allogref osteokondral transplantasyonu yaklaşımı kullanılır. Ancak donör kadavradan alınan kıkırdak alıcının bağışıklık sisteminde risk ortaya çıkarabilir (Bentley ve diğer., 2012).

Üçüncü metot otolog kondrosit implantasyon tekniğidir. Bu teknik sağlıklı ve yük taşımayan kıkırdaktan elde edilmiş kondrositleri kullanır. Bu metot alıcı sistemin tedaviyi kabul etmeme riskini azaltır. Ancak metotun sonuç vermesi uzun süre alır ve hasta birkaç cerrahi operasyon geçirmek zorundadır (Hangody, Vásárhelyi, Hangody ve Sükösd, 2008).

Dördüncü metot total eklem protezi uygulamasıdır. Total eklem protezi, hasarlı eklem yüzeyinin sentetik malzemelerle değiştirilerek, eklem fonksiyon ve stabilitesini geri kazandırmayı ve mevcut ağrıları ortadan kaldırmayı amaçlamaktadır. Bu metot sadece tamir edilemeyecek boyutta hasarlı olan kıkırdaklar için kullanılır. Son yıllarda, bu tedavinin başarılı olma oranı %90 ve %95 aralığındadır. Yapay bir eklem sınırlı süre kullanım ömrüne sahiptir. Bu yüzden genç hastalar hayatları boyunca daha çok cerrahi müdahale göreceklerinden, yapacakları toplam medikal harcama miktarı artacaktır (Foran, Brown, Valle, Berger ve Galante, 2013).

Doku mühendisliği yaklaşımı ise kıkırdak doku hasarının giderilmesinde kullanılan yeni bir metottur. Kıkırdak hasarını gidermek için hücreler ve biyosinyal moleküller hidrojel doku iskelesi içerisinde konumlandırılır. Ancak doku mühendisliği yaklaşımı kullanılarak onarılmış kıkırdak yük altında yeterli mekanik özelliklere sahip değildir (Bhumiratana ve diğer., 2014). Bu konuda çalışmalar artan bir ivmeyle devam etmektedir.

Yapay kıkırdak değişimi için, hidrojeller hasarlı dokunun yerini almak ya da yeni dokunun oluşumunu tetiklemek amacıyla oluşturulabilir. Hidrojeller otomatik olarak

uygun fiziksel özelliklerde kıkırdak dokuyu oluşturabilir ve etkin kütle transferine izin verirler.

Hidrojeller, hücre tutunmasını destekleyici yapıda üretilebilirler. Bu da kıkırdak doku hücre dışı matrisindeki gibi kondrositlerin tutunmasını kolaylaştıracak bir doku iskelesinin üretilmesine imkan sağlar. Aynı zamanda kondrositlere taşıma desteği verebilecek ve hayatta kalmalarını sağlayacak mekanik özellikleri sağlayabilirler.

Kıkırdağın yerini alması için ya da doku iskelesi olarak kullanılmak üzere üretilen hidrojellerin özelliklerini modifiye etmek için birçok geliştirme değişkeni vardır. Bu değişkenlerin en önemlileri polimerin tipi, çapraz bağlanma şekli ve metodu, biyobozunma davranışı, hücresel etkileşimi, üç boyutlu hidrojel içindeki hücre miktarı, ilaç salınım davranışdır.

2.5 Hidrojeller Hakkında Genel Bilgiler

Suda çözünen polimerlerden oluşan ve fiziksel ya da kimyasal yöntemlerle çapraz bağlanma sonrası suda çözünmeyen bir yapıda olması sağlanan, üç boyutlu hidrofilik polimer ağlarıdır. Hidrojeller doğal polisakkaritlerden, proteinlerden ya da sentetik polimerlerden oluşabilir. Sulu fazlarda, kendi ağırlıklarına kıyasla yüksek miktarda suyu yapılarında tutabilirler.

60 yıl önce yapılmış metakrilat tabanlı hidrojinin biyolojik uygulama çalışmalarından beri, hidrojeller ilaç taşıma sistemlerinde, kimyasal olarak modifiye edilmiş implantların biyolojik kullanımlarında, diagnostik amaçlarla kullanılmış cihazlarda ve doku mühendisliği alanında kullanılmıştır (Peppas, Hilt, Khademhosseini ve Langer, 2006).

Doku mühendisliği uygulamalarda, hidrojeller hasarlı dokunun yerini almak ya da yeni dokunun oluşumunu tetiklemek amacıyla kullanılırlar. Bu alanda kullanılacak hidrojellerin özelliklerini modifiye etmek için birçok geliştirme değişkeni vardır. Bu

değişkenlerin en önemlileri polimerin tipi, çapraz bağlanma şekli ve metodu, biyobozunurluğu, hücresel etkileşimi, üç boyutlu hidrojel içindeki hücre miktarıdır.

2.5.1 Hidrojellerin Sınıflandırılması

Hidrojeller, özelliklerinin farklı açılardan incelenmesi ile birkaç şekilde sınıflandırılabilir (Garg ve Garg, 2016).

2.5.1.1 Kaynağına Göre

Kaynakları göz önüne alındığında hidrojeller 2 ana grupta sınıflandırılabilirler. Bunlar doğal hidrojeller (örnek olarak; kitosan ve aljinat tabanlı hidrojeller) ve sentetik hidrojellerdir (örnek olarak; polivinil alkol (PVA) ve polietilen glikol (PEG)) (Zhao, Jin, Cong, Liu ve Fu, 2012).

2.5.1.2 Polimerik Kompozisyonuna Göre

- (a) Homopolimerik hidrojeller: Polimerik ağların en temel yapısal birimi monomerlerdir. Homopolimerik hidrojeller, yapılarında tek bir türden monomer içeren polimerik ağlardır (Iizawa ve diğer., 2006).
- (b) Kopolimerik hidrojeller: En az biri hidrofilik bileşen olmak üzere, iki ya da daha fazla farklı monomer çeşitinden oluşan hidrojellerdir (Yang, Chu ve Fix, 2002).
- (c) Çoklu polimer: Aynı zamanda iç içe geçen polimer ağı (IPN) olarak adlandırılan bu hidrojel sınıfı, birbirinden bağımsız, çapraz bağlanmış, doğal ve/veya sentetik bileşen ile oluşturulmuş polimer ağı formunu tanımlar. Yarı IPN hidrojellerde ise, bir bileşen çapraz bağlanmış polimer iken, diğeri çapraz bağlanmamış formdadır (Maolin, Jun, Min ve Hongfei, 2000).

2.5.1.3 Konfigürasyona Göre

Bu hidrojel sınıflandırması fiziksel yapıya ve kimyasal kompozisyona göre yapılır (Garg ve Garg, 2016).

- a) Amorf (kristal yapıda olmayan)
- b) Yarı kristalin yapı: Amorf ve kristalin fazlar içeren bir kompleks karışım.
- c) Kristalin

2.5.1.4 Çapraz Bağlanma Türüne Göre

Çapraz bağlanma noktalarındaki kimyasal ya da fiziksel davranışa göre hidrojeller iki grupta incelenebilir. Kimyasal çapraz bağlanmış sistemler kalıcı bağlar içerirken, fiziksel çapraz bağlanmış sistemler, polimer zincirlerin iç içe girmesi, hidrojen bağları, iyonik ya da hidrofobik etkileşimler gibi fiziksel etkileşimler sonucu oluşan geçici bağlar içerir (Garg ve Garg, 2016).

2.5.1.5 Fiziksel Görünüşüne Göre

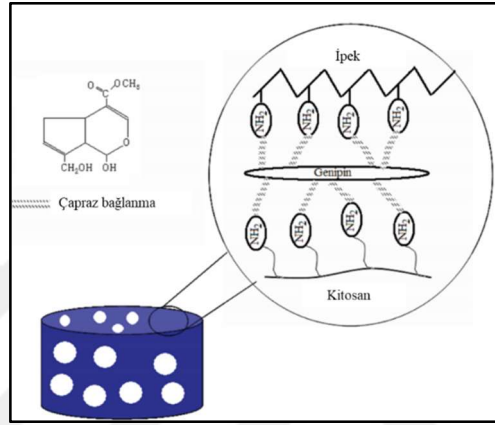
Hidrojel oluşturma işleminde kullanılmış polimerizasyon prosedürüne göre hidrojeller matris, film ya da mikroküre şeklinde üretilir. Ayrıca hidrojeller çapraz bağlanmış zincirlerdeki elektriksel yük varlığına göre iyonik olmayan (nötr), anyonik ya da katyonik hidrojeller olarak 3 temel grupta incelenebilir (Garg ve Garg, 2016).

2.5.2 Hidrojellerde Çapraz Bağlanma

Hidrojellerde çapraz bağlanma birçok yaklaşım ile elde edilebilir. Kullanılan işlemleri iki ana kategori ile sınıflandıracak olursak, ilki zincirler arasında ikincil kimyasal etkileşimler ya da iyonik etkileşimler ile gerçekleşen fiziksel çapraz bağlanma olur. İkinci kategori, kovalent bağlı hidrojellerin oluşturduğu kimyasal

çapraz bağlanmadır. Bu işlem, ultraviyole ışınlama, ısıtma ya da çapraz bağlayıcı kullanarak gerçekleştirilebilir (Garg ve Garg, 2016).

Bu çalışmada, lif kabağı ile güçlendirilmiş ipek ve kitosan hidrojel eldesi için, toksik etkisinin az olması nedeniyle tercih edilen genipin çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Şekil 2.4’de kitosan ve ipeğin, genipin kullanılarak çapraz bağlanması ve oluşan hidrojel şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.4 Kitosan ve ipeğin, genipin kullanılarak çapraz bağlanması (Silva ve diğer., 2008)

2.5.3 Hidrojellerde Şişme Davranışı

Hidrojeller sıvı ortamda şişen çapraz bağlanmış polimer sistemleridir. Su içerisinde şişerek kuru ağırlıklarının binlerce katına ulaşabilirler. Kuru haldeki hidrojel suyu emmeye başladığında, başlangıçtaki su molekülleri matris içerisinde polar gruplar ile etkileşerek birincil bağlı su oluştururlar. Polar gruplar su ile birleştikçe, hidrojel şişer ve hidrofobik gruplar ortaya çıkar. Su molekülleri ile etkileşim devam ettikçe hidrofobik olarak bağlanmış su, diğer bir değişle ikincil bağlı su oluşur. Birincil ve ikincil bağlı su ifadeleri çoğu zaman birleştirilerek toplam bağlı su olarak kullanılır (Garg ve Garg, 2016).

Hidrojellerin şişme oranı, kuru ağırlığının (w_0) ve şiştikten sonraki yaş ağırlığının (w_s) ölçülmesi ardından, ağırlık farkının kuru ağırlığa oranı hesaplanarak ölçülebilir (Garg ve Garg, 2016).

$$\text{Şişme oranı (\%)} = \frac{W_s - W_o}{W_o} \times 100 \quad (2.1)$$

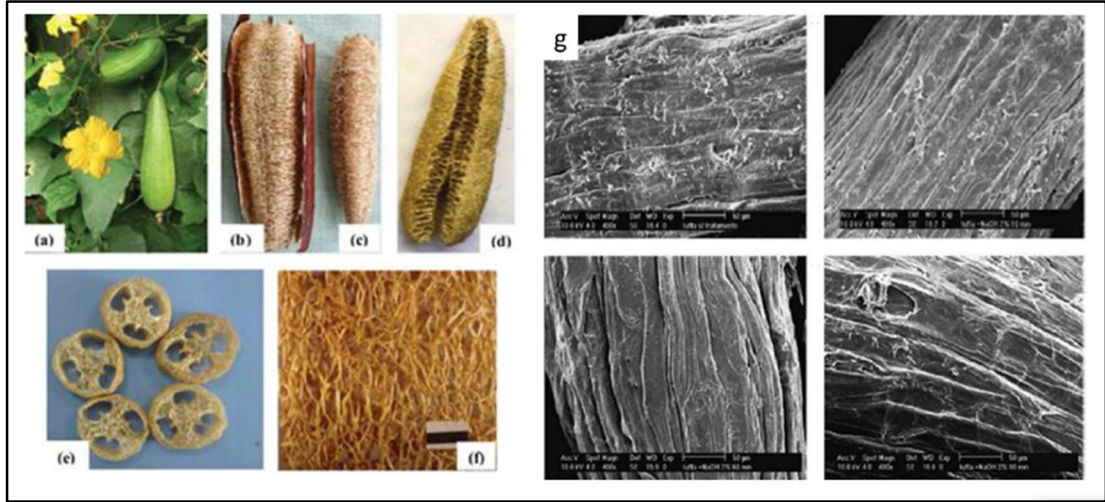
Hidrojel numunelerinin şişme özelliklerinin değerlendirilmesi kritik bir analizdir. Bu analiz aynı zamanda hidrojinin çapraz bağlanma derecesi, mekanik özellikleri ve bozunma oranı gibi birçok özelliğini değerlendirmek için bir kriterdir. Birçok hidrojel için, çapraz bağlanma sonrası şişme oranı ve şişmiş durum kararlılığını incelemek kolay, güvenli ve en ucuz metottur (Garg ve Garg, 2016).

2.6 Çalışmada Doku İskelesi Üretilirken Kullanılan Malzemeler Hakkında Genel Bilgi

2.6.1 Lif Kabağı (*Luffa Cylindrica*)

Sünger kabağı olarak da bilinen lif kabağı lifsi yapıda bir bitkidir. Latince adı *Luffa cylindrica*'dır (Tanobe, Sydenstricker, Munaro ve Amico, 2005). Kabakgiller (Curcubitacea) ailesinin bir üyesi olan lif kabağı bitkisinin meyvesi Şekil 2.5'de gösterilmektedir (Tanobe, Sydenstricker, Munaro ve Amico, 2005). Kalın bir kabuğa ve doğal bir mat içeren çok yönlü bir lif dizisine sahip olan olgunlaşmış meyvenin iç kısmında çekirdekleri bulunmaktadır. 15-25 cm ile 120-150 cm arasında değişebilen uzunluklara sahip olabilirler (Boynard ve Almeida, 2010). Meyvenin olgunlaşması sırasında hücre duvarları lignin ve selüloz çökmesi sonrasında modifikasyona uğrar ve gözenekli yapı bu şekilde oluşur (Sinnott ve Bloch, 1943). Oluşan gözenekli yapı Şekil 2.5.e'de gösterilmektedir.

Düşük maliyetli ve doğal malzemelere olan ilginin artması ile birlikte lif kabağı gibi bitki liflerine olan yönelim gittikçe artmaktadır. Ana kullanım alanı temizlik sektörü olan lif kabağı, kimyasal kompozisyonu ve bulunacağı yapının mekanik özelliklerine katkısının öngörülmesi dolayısıyla biyomalzeme uygulamalarında kullanılmak istenilmektedir. İçeriğinde 4,2 protein, %1,08 lipid, %55.78 fiber ve %37.81 karbonhidrat bulunmaktadır (Oladoja, Aboluwoye ve Akinkugbe, 2009).



Şekil 2.5 Luffa cylindrica bitkisinin görünümü a) meyvesi b) dışarıdan görünen kabuk kısmı c) kabuğu soyulmuş lif kabağı görünümü d) liflerin içerisindeki çekirdekli yapı e) Lif kabağından ara kesit görünümü f) lif kabağının fibriler yapısı (Tanobe, Sydenstricker, Munaro ve Amico, 2005) g) NaOH ile farklı sürelerde işlem görmüş lif kabağının SEM görüntüsü (Medina, 1959)

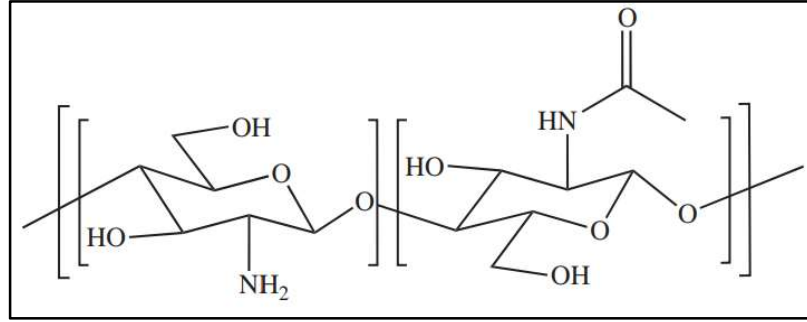
Lif kabağının kullanılması öncesinde birtakım işlemlerden geçmesi gerekmektedir. Bu işlemlerdeki amaç lif kabağındaki istenmeyen kalıntıların giderilmesidir. NaOH işlemi öncesi ve sonrası lif kabaklarına ait Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri Şekil 2.5.g’de gösterilmektedir (Medina, 1959). Sol üstteki görüntü işlenmemiş lif kabağının, diğerleri sırasıyla 10-60-90 dakika işlem görmüş lif kabaklarının görüntüleridir.

Son yıllarda lif kabağı, doğal ağısı yapısı nedeniyle biyo-immobilizasyon ve kompozit malzeme uygulamalarında tercih edilmiştir (Cecen, Kozacı, ve Yüksel, 2017).

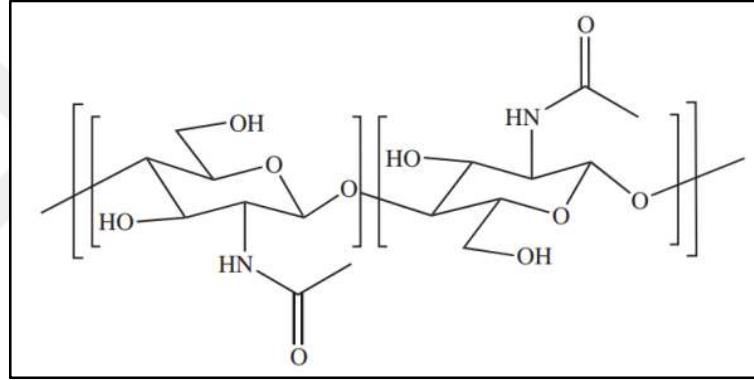
2.6.2 Kitosan

Farklı oranda bağlanmış 2-asetamido-2-deoksi- β -D-glukan ve 2-amino-2-deoksi- β -D-glukan birimlerinin β (1,4) bağı ile bağlanması sonucu kopolimer yapısında oluşan lineer, yarı kristalin bir polisakkarittir. Kitosan polimerinin kimyasal yapısı Şekil 2.6’de gösterilmiştir. Kitosan polimeri doğal bir polimer olan kitinin (Şekil 2.7) kısmi deasetilasyonu ile kolayca elde edilebilir. Kitosanın deasetilasyon derecesi

deasetile edilmiş amin gruplarının sayısının, asetamido gruplarının sayısına oranı olarak tanımlanır. Kitinin kitosan olarak adlandırılması için deasetilasyon derecesinin en az %60 olması gerekmektedir (Croisier ve Jérôme, 2013).



Şekil 2.6 Kitosanın kimyasal yapısı (Croisier ve Jérôme, 2013)



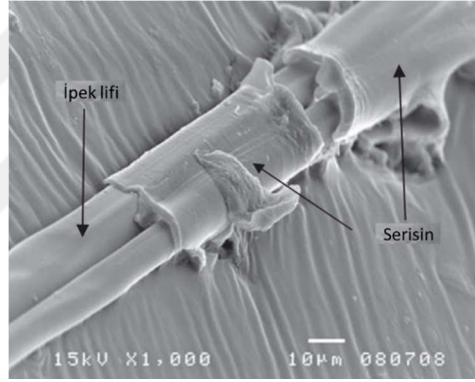
Şekil 2.7 Kitinin kimyasal yapısı (Croisier ve Jérôme, 2013)

Kitin selülozdan sonra doğada en çok bulunan biyopolimerdir. Genellikle kabuklular, böcekler gibi omurgasızlardan elde edildikleri gibi, mantar ve alglerden de elde edilebilir. Kitosan biyoyumlu, toksik etkisi olmayan bir biyomalzemedir. Hidrojen bağlarıyla kuvvetli moleküller arası bağlara sahip olan ve birçok çözücünde çözilemeyen kitin benzeri selülozun aksine pH 6.0'ın altındaki seyreltik asidik çözeltilerde çözülebilir (Croisier ve Jérôme, 2013).

Biyoyumluluğu ve antibakteriyel özelliği nedeniyle ortopedik/periodontal kompozitlerin üretiminde, ilaç salınımı sistemlerinde, yara örtüsü ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır (Arıkan, 2013).

2.6.3 İpek

İpek, tekstil ürünlerinde yüzyıllardan beri kullanılan bir doğal polimerdir. Aynı zamanda yüksek mukavemet ve biyouyumluluk özellikleri sayesinde medikal ve doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmektedir. Doğada ipek, yapışkan özellikte olan ve ipek kozasının yapısını korumasını sağlayan serisin proteini ile kaplı halde bulunur. İpeğin saflaştırılması için serisinin uzaklaştırılması gerekir. İpeğin biyomalzeme olarak kullanıldığı uygulamalarda serisin bağışıklık sistemi tepkisine neden olabilir (Liu ve diğer., 2007). Yapışkan serisin proteini, ipek kozalarını tuzlu suda kaynatarak kolayca giderilebilir. Şekil 2.8’da serisin ile kaplı ipek proteininin taramalı elektron fotoğrafı gösterilmektedir.

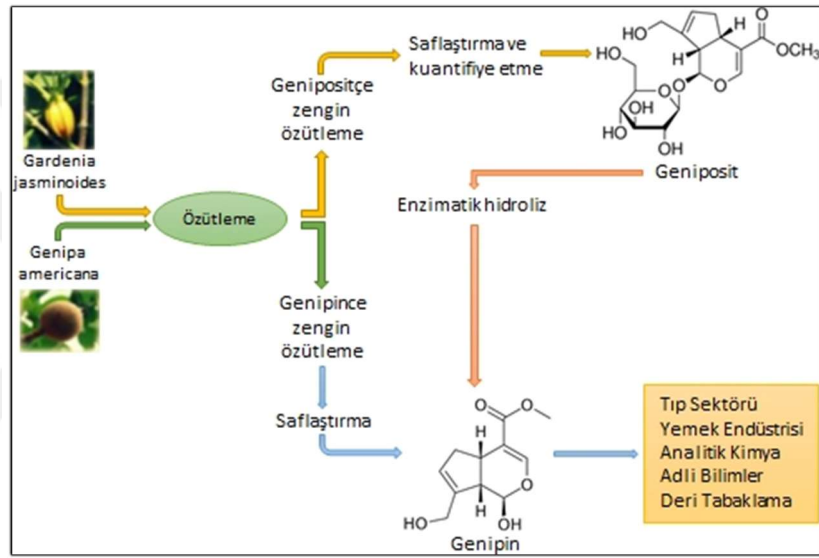


Şekil 2.8 İpek lifi proteini ve serisin tabakasının taramalı elektron fotoğrafı (Aramwit, 2016)

Yapı, serisin katmanı ile kaplı ve 2 parçadan oluşan fibroin proteininden oluşur (Pérez-Rigueiro, Elices, Llorca, ve Viney, 2001). İpek yapısı, birbirine disülfür bağı ile bağlı olarak bulunan ağır ve hafif zincirleri (350 kDa ve 25 kDa) içerir (Nagarkar ve diğer., 2009). İpek yapısı nötr pH değerinde negatif yüklenmiş bir protein olup, izoelektrik pH değeri 3.8 civarındadır (Nagarkar, Nicolai, Chassenieux, ve Lele, 2010). Hidrofobik etkileşimler protein yapısını α -düzensiz sarmal yapısından β -tabakalı yapısına değiştirir. Bu değişim ipeğin suda çözünürlüğünü azaltırken, çekme mukavemeti değerinde iyileşmeyi sağlar (Zhang, Yan ve Li, 2009).

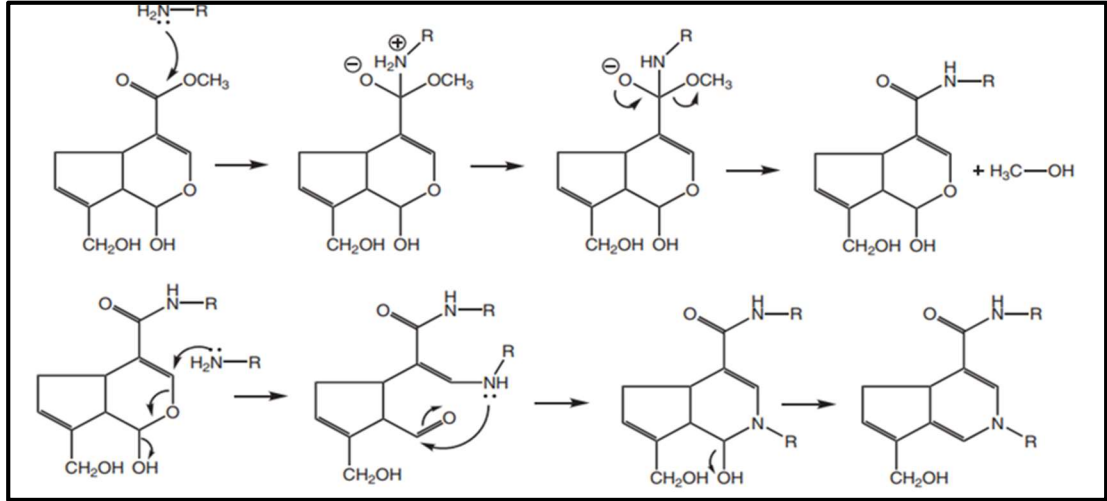
2.6.4 Genipin

Tıp ve gıda sektörü gibi farklı alanlarda kullanılan bir malzeme olan genipin, doğrudan *Genipa americana* veya *Gardenia jasminoides* bitkilerinden geniposit hidrolizinden sonra elde edilebilen doğal çapraz bağlama bileşiğidir (Tsai, Westly, Lee ve Chen, 1994) (Ramos-de-la-Peña, Renard, Montañez , García-Cerda ve Contreras-Esquivel, 2014). Genipin üretim şeması Şekil 2.9’de gösterilmektedir (Ramos-de-la-Peña, Renard, Montañez ve Reyes-Vega, 2016).



Şekil 2.9 Genipinin üretim şeması (Ramos-de-la-Peña, Renard, Montañez ve Reyes-Vega, 2016)

Djerassi ve arkadaşları tarafından 1960'ların başlarında, doğal $C_{11}H_{14}O_5$ yapısı genipin olarak adlandırılmıştır (Nakano, James, Shoolery, Zalkow ve Eisenbraun, 1960). Genipin, kendiliğinden amino asitlerin, peptidlerin veya proteinlerin primer amin grupları ile reaksiyona girebilir.



Şekil 2.10 Genipin ile amin gruplarının çapraz bağlanma mekanizmaları (Renhe, Stringheta, Silva ve Oliveira, 2009)

Reaksiyon sırasında koyu mavi pigmentler oluştuğundan, renk değişimi gözlemlenir. Bu özelliği sebebiyle, gıda ve tekstil sektörlerinde renklendirici olarak kullanılmaktadır (Ueda ve Iwashashi, 1991). Genipin ile amino gruplarının çapraz bağlanma mekanizmaları Şekil 2.10'de gösterilmektedir (Renhe, Stringheta, Silva ve Oliveira, 2009).

BÖLÜM ÜÇ

LİTERATÜR ÇALIŞMASI

Yan ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada, kıkırdak doku tedavisinde kullanılması amacıyla dondurarak kurutma yöntemini kullanarak, farklı kitosan:kolajen oranlarına sahip (1:0; 9:1; 3:1; 1:1) ve genipin ile çapraz bağlanmış doku iskeleleri üretmişlerdir. Üretilen doku iskelelerinin fizikokimyasal özellikleri ve biyolojik performansları incelemişlerdir. Çalışmada üretilen doku iskelelerinde kitosan oranı ve genipin konsantrasyonu arttıkça, doku iskelelerinin bozunma oranları azalırken, depolama modül değerleri artmaktadır. Doku iskelelerinin tan delta değerleri ise benzer olup, her bir doku iskelesi için 0.2 ve 0.3 MPa aralığında belirlenmiştir (Yan ve diğer., 2010).

Bi ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada, farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonları kullanılarak (%0.1, 0.5, 1, 2), farklı çapraz bağlanma sıcaklıklarında (4, 20, 37 °C) ve sürelerinde (6, 12, 18, 24 saat) kitosan-kolajen doku iskeleleri üretmişlerdir. Genipin konsantrasyonunun %0.1-%1 arasındaki artışı ile doku iskelelerinin basma mukavemetleri yükselmiştir. Ancak %1'in üzerindeki genipin konsantrasyonu değerlerinde doku iskelelerinin basma mukavemetleri düşüşe geçmiştir. Aynı şekilde çapraz bağlanma sıcaklığının 4 °C'den 20 °C'ye yükseltilmesi ile basma mukavemeti yükselmiş, ancak 37 °C'ye ulaştığında düşmüştür. İki faktörün aksine çapraz bağlanma süresi arttıkça basma modülü sürekli olarak artmıştır. Gözenek çapı, bozunma hızı ve şişme oranı gibi diğer sonuçlar farklı çapraz bağlanma şartlarına göre farklılık göstermiştir. Çalışma sonucunda %1 genipin konsantrasyonu, 20 °C çapraz bağlanma sıcaklığı ve daha uzun çapraz bağlanma süresi önerilmektedir (Bi ve diğer., 2011).

Sionkowska ve Planecka 2013 yılında yaptıkları çalışmada, doku mühendisliği uygulamaları için uygun mekanik özelliklere ve iç içe geçmiş gözenekli yapıya sahip ipek kitosan süngerler üretmeyi amaçlamışlardır. Farklı oranlarda kitosan:ipek çözeltileri (80:20, 50:50, 20:80) ve sadece kitosan ya da ipekten oluşan kontrol grubu çözeltileri hazırlanıp, bu çözeltilerden dondurma kurutma yöntemi ile süngerler

üretmiştir. Çalışmada hidroksisüksinimid (NHS) içerisinde 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) kullanılarak kimyasal çapraz bağlanma sağlanmıştır. İpek, kitosan ve her ikisinden üretilen süngerlerin mikroyapısı, fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenmiştir. Yapılan TGA analizleri sonucunda kompozit yapısında, saf kitosan ve ipek yapılarına göre daha yüksek bozunma başlangıç sıcaklığı gözlemlenmiştir, yani üretilen süngerler, kontrol grubuna göre daha iyi termal stabiliteye sahiptir. Kitosana ipek katkısı ile yüzey gözenekliliği değerleri ve şişme oranlarında artış gözlemlenmiş olup, kitosan-ipek süngerlerin gözenek çapı 20 ila 150 µm aralığında değişmektedir. Gözenek çapı değerlerinin hücre büyümesi için uygun olduğu belirtilmiştir. Süngerlerde ipek konsantrasyonu arttıkça, süngerlerin basma modül değerleri azalmaktadır. Süngerlerin hem implantasyon ve hem de *in-vivo* yüklenmesine dayanıklı mekanik özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Sionkowska ve Planecka, 2013).

Dimida ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları çalışmada, kemik tedavisi ve yenilenmesinde kullanılmak amacıyla farklı genipin konsantrasyonlarıyla (ağırlıkça %3,75 ve %7 genipin) çapraz bağlanmış iki kitosan doku iskelesi, dondurarak kurutma yöntemi ile üretmiş ve doku iskelelerinin kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerini incelemişlerdir. Farklı genipin konsantrasyonlarının kullanılması doku iskelelerinin bozunma davranışını etkilerken, morfolojisini, porozitesini ve mekanik özelliklerini etkilememiştir. Çapraz bağlanma derecesinin artması, yapı içeresine enzimin nüfus etmesini azaltmış, bu da daha yüksek genipin konsantrasyonuna sahip olan doku iskelesinde daha düşük bozunma hızı görülmesine sebep olmuştur. Her iki yapı da hücre kültürü testleri sonucu toksik etki göstermemiş ve hücre büyümesini desteklemiştir (Dimida, Barca, ve Cancelli, 2017).

Cecen ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları çalışmada, kemik ve kıkırdak dokularının yenilenmesini desteklemek amacıyla, sırasıyla lif kabağı-PLLA-selüloz ve lif kabağı-PLLA-kitin içeriğine sahip doku iskeleleri üretmişlerdir. Hücre kültürü testleri ve morfolojik analizler sonucunda üretilen iki katmanlı doku iskelelerinin osteoblast ve kondrosit hücrelerinin tutunmasını, büyümesini ve farklılaşmasını desteklediğini belirlemişlerdir (Cecen, Kozacı, ve Yüksel, 2017).

BÖLÜM DÖRT

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Çalışmanın bu bölümünde kompozit doku iskelelerinin üretimi ve yapısal ve kimyasal özelliklerinin karakterizasyonu için kullanılan yöntemler incelenmiştir.

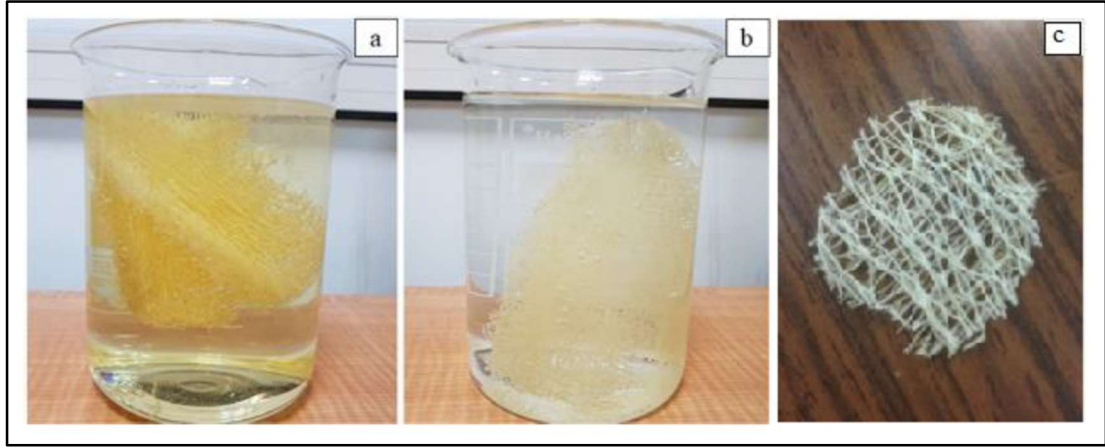
4.1 Malzeme

Çalışmada kullanılan kitosan (deasetilasyon derecesi ≥ 75 ve yüksek moleküler ağırlıklı), asetik asit ve ipek çözeltisinin saflaştırılması sırasında kullanılan selüloz membran Sigma-Aldrich şirketinden satın alınmıştır. Bombyx mori ipek kozaları ve lif kabağı Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyetinden tedarik edilmiştir. İpek çözeltisini hazırlamak için kullanılan, sodyum karbonat (Na_2CO_3), kalsiyum klorür (CaCl_2) ve lif kabaklarının hazırlanmasında kullanılan sodyum hidroksit (NaOH) Merck şirketinden satın alınmıştır. Doku iskelelerinin çapraz bağlanması işleminde kullanılan genipin ise Wako Chemicals şirketinden satın alınmıştır.

4.2 Doku İskelesi Üretim Aşamaları

4.2.1 Lif Kabağının Hazırlanması

Lif kabaklarının hazırlanma aşamaları Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Çekirdekleri temizlenip, makas yardımı ile kesilerek parçalara ayrılan lif kabakları, içerisindeki yapışkan kısmın (serisin proteini) giderilmesi için ağırlıkça %2’lik sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi içerisinde 2 saat bekletilmiştir. Ardında, nötral pH değeri elde edilene kadar saf su ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Bu işlem sonrasında lif kabakları doku iskelelerinin üretileceği cam şişelerin taban çapı boyutunda (yaklaşık 20 mm çapında) kesilmiştir. Kesilen lif kabakları 60 °C sıcaklıkta vakum etüvünde 24 saat boyunca kurutulmuştur.



Şekil 4.1 Lif kabağının hazırlanma aşamaları (a) Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi içerisinde bekletme (b) Saf su ile yıkama (c) Kesme ve kurutma (Kişisel arşiv, 2018)

4.2.2 İpek Çözeltisinin Hazırlanması

İpek çözeltisi, Bombyx mori ipek kozalarından elde edilmiştir. İlk olarak, 1 x 1 cm boyutunda kesilen ham ipek kozaları, üzerindeki serisin adı verilen yapışkan maddenin giderilmesi için 0.01 M sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi içerisinde 70 °C’de 3 saat karıştırılarak “degumming” adı verilen bir işleme tabi tutulmuştur. Bu işlem, üç kez tekrarlanmış ve ardından saf su ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, serisinden arındırılmış ipek lifleri $\text{CaCl}_2/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ üçlü çözeltisi içerisinde (1/2/8 molar oranı) 70 °C’de 6 saat boyunca çözündürülmüştür. Elde edilen ipek çözeltisi, filtreleme işlemine tabi tutulmuş ve ardından saf su içerisinde selüloz membran yardımı ile 3 gün boyunca diyalize tabi tutulmuştur. Sonuç olarak hacimde ağırlıkça %2’lik ipek çözeltisi elde edilmiştir. Doku iskelesinin üretiminde %2’lik ipek çözeltisi seyreltilerek, hacimde ağırlıkça %1’lik ipek çözeltisi kullanılmıştır.

4.2.3 Kitosan Çözeltisinin Hazırlanması

Kitosan çözeltisi, %2’lik asetik asit çözeltisi içerisinde ağırlıkça %1 kitosan olacak şekilde 50 °C sıcaklıkta 3 saat karıştırılarak hazırlanmıştır. Homojen bir çözelti elde etmek için karıştırma işlemi oda sıcaklığında gece boyunca devam ettirilmiştir.

4.2.4 Lif Kabağı Takviyeli Kompozit Süngerlerin ve Lif Kabaksız Kontrol Grubunun Üretilmesi

Lif kabaksız kontrol grubunun üretilmesi için, oluşturulan kitosan ve ipek çözeltileri hacimce 1:1 oranında karıştırılıp, -60 °C sıcaklık ve 0.1 mbar basınç altında 2 gün boyunca dondurarak kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Dondurarak kurutulmuş süngerlerde ipeğin çözünebilen α -düzensiz sarmal yapısından çözünmeyen β -tabakalı yapısına dönüşmesinin sağlanması için 1 saat metanol çözeltisi içinde tutulmuştur. Daha sonra süngerler, yapıları içerisinde hapsolmuş asetik asitten kurtulmak için, giderek azalan etanol oranlı (%80, %60, %40, %20 ve %0 etanol) etanol-su karışımlarıyla yıkanmıştır.

Lif kabağı takviyeli kompozit süngerlerin üretilmesi için, lif kabakları hacimce 1:1 oranındaki kitosan–ipek çözeltisi içerisine eklenerek gece boyu bekletilmiştir. Sonrasında kontrol grubuna uygulanan dondurarak kurutma işlemi, β -tabakalı yapısına dönüştürme ve yıkama işlemleri aynı şekilde kompozit süngerler için de tekrarlanmıştır.

4.2.5 Hidrojel Doku İskelelerinin Elde Edilmesi

Hidrojel yapıda doku iskelelerinin elde edilmesi için çapraz bağlayıcı olarak genipin kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki genipin çözeltileri (%0,1, 0,3 ve 0,5 ağırlık/hacim oranlarında), genipinin fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında çözünmesi ile elde edilmiştir.

Kontrol grubuna ve hazırlanan lif kabağı takviyeli kompozit süngerlere 5 ml genipin çözeltisi ilave edilip, 72 saat gözlem sonucunda çapraz bağlanma süresi optimize edilmiştir. Bütün süngerler için genipin ile çapraz bağlanma sonucu gerçekleşen renk değişimi 48 saat sonunda tamamlanmıştır. Tablo 4.1’de süngerlerin isimlendirilmeleri ve ilave edilen genipinin konsantrasyonları verilmektedir.

Tablo 4.1 İlave edilen genipin konsantrasyonları ve içeriğe göre doku iskelelerinin isimlendirilmeleri

Doku iskelesi isimlendirmesi	Doku iskelesi içeriği	Genipin konsantrasyonu (ağırlıkça yüzde(w/v))
CS	Kitosan-İpek	-
CSG1	Kitosan-İpek	0,1
CSG3	Kitosan-İpek	0,3
CSG5	Kitosan-İpek	0,5
L-CS	Kitosan-İpek-Lif kabağı	-
L-CSG1	Kitosan-İpek-Lif kabağı	0,1
L-CSG3	Kitosan-İpek-Lif kabağı	0,3
L-CSG5	Kitosan-İpek-Lif kabağı	0,5

4.3 Hidrojel Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

4.3.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Üretilen doku iskelelerinin kimyasal yapı analizleri ATR ünitesi eklentili Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) (Perkin Elmer Spectrum BX) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. FTIR analizleri her örnek için $4000-650\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlükte ve 25 tarama ile yapılmıştır.

4.3.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Doku iskelelerinin morfolojik analizleri için taramalı elektron mikroskobu (SEM, JEOL JSM-6060) kullanılmıştır. Bütün doku iskeleleri görüntüleme öncesinde sputter coater cihazı (Quorum Technologies, SC7620) kullanılarak altın/paladyum ince film tabakasıyla kaplanmıştır. Örneklerden görüntüler, 5-10 kV hızlandırma voltajı altında, 50, 100, 250 ve 500 büyültmelerde alınmıştır.

4.3.3 Şişme Testleri

Şişme testleri fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanmış olan doku iskelelerinin kuru ağırlıkları (w_0) ölçüldükten sonra numuneler 37 °C’de 24 saat boyunca PBS çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Sıvı içerisinden çıkarılan doku iskeleleri üzerindeki fazla sıvının filtre kağıdı yardımıyla alınması ardından yaş ağırlıklarının (w_s) tespiti için ölçüm tekrarlanmıştır. Ölçümler sonrasında şişme oranını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = \frac{w_s - w_0}{w_0} \times 100 \quad (4.1)$$

4.3.4 Dinamik Mekanik Analiz (DMA)

Dinamik Mekanik Analiz (DMA), viskoelastik özelliklerin karakterizasyonunda kullanılan, dinamik yükleme altında gerçekleştirilen, frekans veya sıcaklık taraması modunun da kullanılabildiği bir metottur. Viskoelastik bir malzeme depolama ve kayıp modül değerleri ile karakterize edilebilir. Depolama modülü, E' , malzemenin elastik tepkisini, enerji depolama kabiliyetini ifade ederken, kayıp modülü, E'' , malzemenin enerji dağıtma, yarma kabiliyetini ifade eder. Viskoelastik bir malzemenin kayıp modülü ile depolama modülü arasındaki oran tan delta ($\tan \delta$) değeri olarak tanımlanırken ve bu değer malzemenin enerji sönümleme kapasitesi hakkında bilgi verir. Depolama modülü, kayıp modülü ve faz açısı, δ , arasındaki ilişki Denklem 4.2’de gösterilmektedir.

$$\tan \delta = \frac{E''}{E'} \quad (4.2)$$

Doku iskelelerinin viskoelastik özelliklerinin tespiti için DMA cihazı (TA, Q800) kullanılmıştır. DMA analizleri yaklaşık 1 cm çapında dairesel şekilde kesilen numuneler kullanılarak 37 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada veriler, yetişkin bir insanın yürüme ve koşma adım frekans değerlerini de içine alan 0,1 Hz ve 100 Hz aralığında frekans taraması modunda toplanmıştır.

4.3.5 Mekanik Analiz (Basma Deneyi)

Doku iskelelerinin bası yüklenmeleri altındaki mekanik özelliklerinin tayini için basma testi uygulanmıştır. Numuneler dairesel olup, yaklaşık 1 cm çapta olacak şekilde hazırlanmıştır. Her bir numunenin kalınlığı mekanik test öncesinde ölçülmüştür. Mekanik analiz, aksiyel yük altında elektromekanik aktüatör (5 kN yük kapasiteli, AG-X; Shimadzu, Kyoto, Japan) ile gerçekleştirilmiştir. Deney hızı her numune için 0,5 mm/dk olarak seçilmiştir. Her numune için, gerilim-yüzde şekil değişimi grafiği elde edilmiş ve %7 ile %15 birim şekil değiştirme aralığındaki lineer bölgeden basma modül değerleri hesaplanmıştır.

4.3.6 Termogravimetrik ve diferansiyel termal analiz (DTA/TGA)

Lif kabaklı kompozit doku iskelelerinin ve lif kabaksız kontrol grubunun termal karakterizasyonu DTA/TGA cihazı kullanılarak (Shimadzu DTG-60H) azot gazı altında yapılmıştır. Analiz parametreleri olarak 10 °C/dak ısıtma hızı ve 25-700 °C sıcaklık aralığı belirlenmiştir. Bozunma başlangıç sıcaklıkları (T_d) ve kömürleşme verimi TGA eğrileri, enerji değişimleri ise DTA eğrileri kullanılarak saptanmıştır. Bozunma başlangıç ve maksimum bozunma sıcaklık değerleri doku iskelelerinin sterilizasyon işlemleri sırasında kısıt oluşturacağından termal analiz ile tetkikleri önem arz eder.

BÖLÜM BEŞ

DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

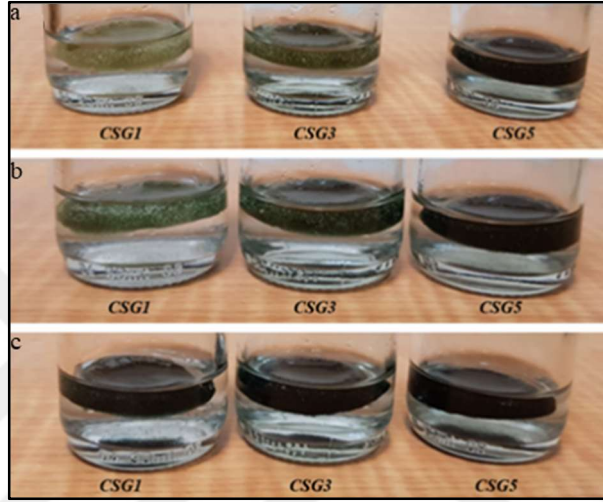
Biyolojik uygulamalarda kullanılmak üzere hazırlanan malzemelerin fiziksel, kimyasal, mekanik ve biyouyumluluk özelliklerinin kontrol edilip, araştırılması büyük önem taşır. Doku iskelesi olarak üretilen yapının uygun üç boyutlu özelliklere sahip olması ve hedef dokunun hücre dışı matrisini taklit edebilmesi gerekir. İşlevsel bir doku iskelesi, yeterli gözenekliliğe sahip olmalıdır. Gözenek boyutları, hücrelerin, besinlerin ve biyosinyal moleküllerin taşınabilmesi için yeterli büyüklükte olmalı ve doku gelişimi için gerekli alanı sağlamalıdır. Doku iskelesi implantasyon sırasında ve *in-vivo* ortamda maruz kalacağı yüklemelere dayanıklı olacak şekilde üretilmelidir. Ayrıca yeni dokunun gelişimi sürecine uyumlu olarak biyobozunur özelliğe sahip olmalıdır.

Bu tez kapsamında doğal ve biyouyumluluğu kanıtlanmış olan ipek, kitosan ve lif kabağı malzemelerinden kıkırdak doku hasarının tedavisinde kullanılmak amacıyla doku iskeleleri üretilmiştir. Her üç malzeme de doku mühendisliği alanındaki çalışmalarda daha önce yer almış olsa da, bu üç malzemeden oluşan kompozit yapı ilk kez üretilip özellikleri incelenmiştir.

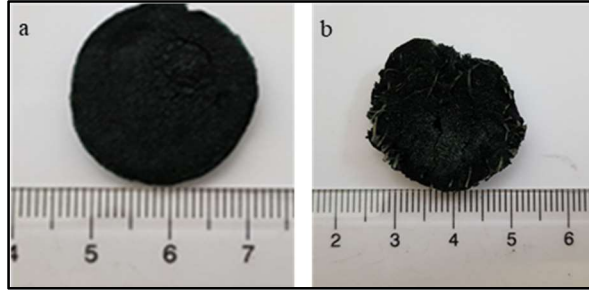
5.1 Doku İskelelerinin Hazırlanması

Doku iskeleleri kitosan-ipek polimerleri kullanılarak hazırlanmış, genipin çapraz bağlayıcısı kullanılarak hidrojel özellik kazandırılmıştır. İlave edilen genipin konsantrasyonları ve içeriğe göre doku iskelelerinin isimlendirilmeleri Tablo 4.1’de verilmektedir. Şekil 5.1’de bu çalışmanın kontrol grubu olan lif kabağı takviye edilmemiş kitosan-ipek süngerlerine çapraz bağlanma süreç optimizasyon çalışması gösterilmektedir. Çalışmada ilk olarak çapraz bağlanma süresi optimize edilmiştir. İlave edilen genipin çözeltisi sonrasındaki süngerlerin 12, 24 ve 48 saat sonundaki görüntüleri yer almaktadır. Genipin ile çapraz bağlanma reaksiyonu sonucunda doku iskeleleri koyu mavi bir renk almaktadır. Koyu mavi renk değişimi, kitosanın ve ipeğin amino grupları ile genipin arasında gerçekleşen kovalent çapraz bağlanma ile

ilişkilidir. Çapraz bağlayıcı konsantrasyonun artması ile çapraz bağlanma süresi azalmaktadır. 48 saat sonunda tüm süngerlerde renk değişiminin gerçekleşmesiyle, kovalent çapraz bağlanmalar tamamlanmıştır. Çapraz bağlanma reaksiyonuna katılmamış, fazla genipini uzaklaştırmak için süngerler saf su ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Hazırlanan lif kabağı katkılı ve katkısız, çapraz bağlanmış süngerlerin fotoğrafları Şekil 5.2’de gösterilmektedir. Üretilen süngerler yaklaşık 2 cm çapa sahiptir.



Şekil 5.1 12 (a), 24 (b), 48 (c) saatlik çapraz bağlanma sonrasında doku iskeleleri (Kişisel arşiv, 2018)



Şekil 5.2 Genipin ile çapraz bağlanmış kontrol grubu (a) ve lif kabağı katkılı kitosan-ipek (b) sünger örneklerine ait fotoğraflar (Kişisel arşiv, 2018)

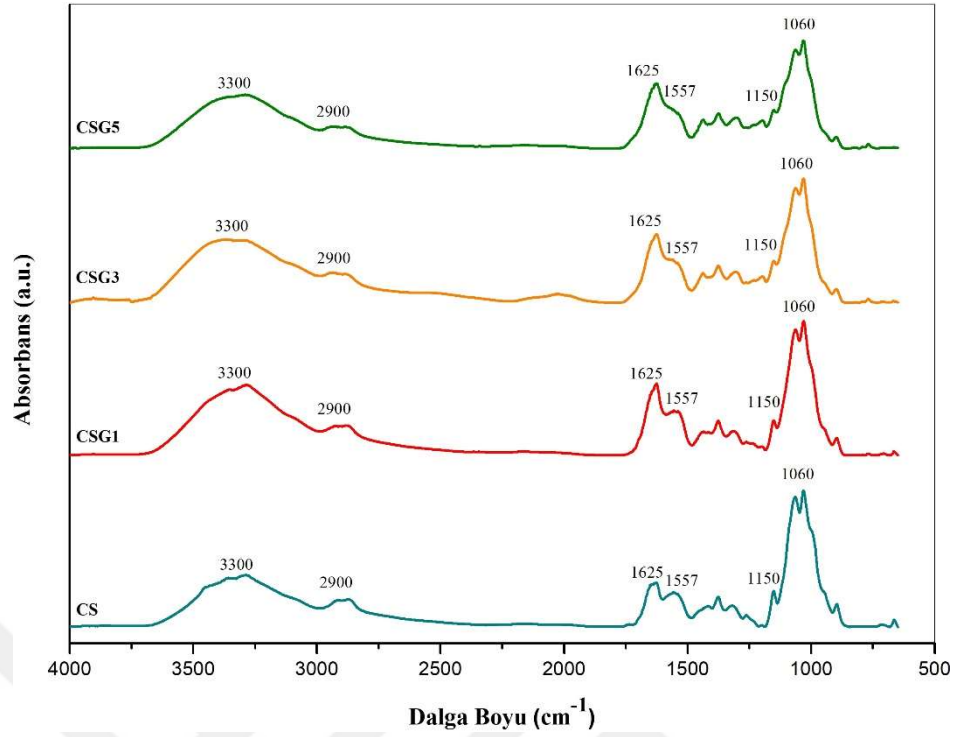
5.2 Fourier Dönüümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Lif kabağı takviyeli ya da takviyesiz olmak üzere, farklı genipin konsantrasyonlarında üretilmiş olan doku iskelelerinin, ipek konformasyonu ve çapraz bağlanma işlemleri sonrasındaki kimyasal karakterizasyonlarının yapılması amacıyla ATR-FTIR analizi gerçekleştirilmiştir.

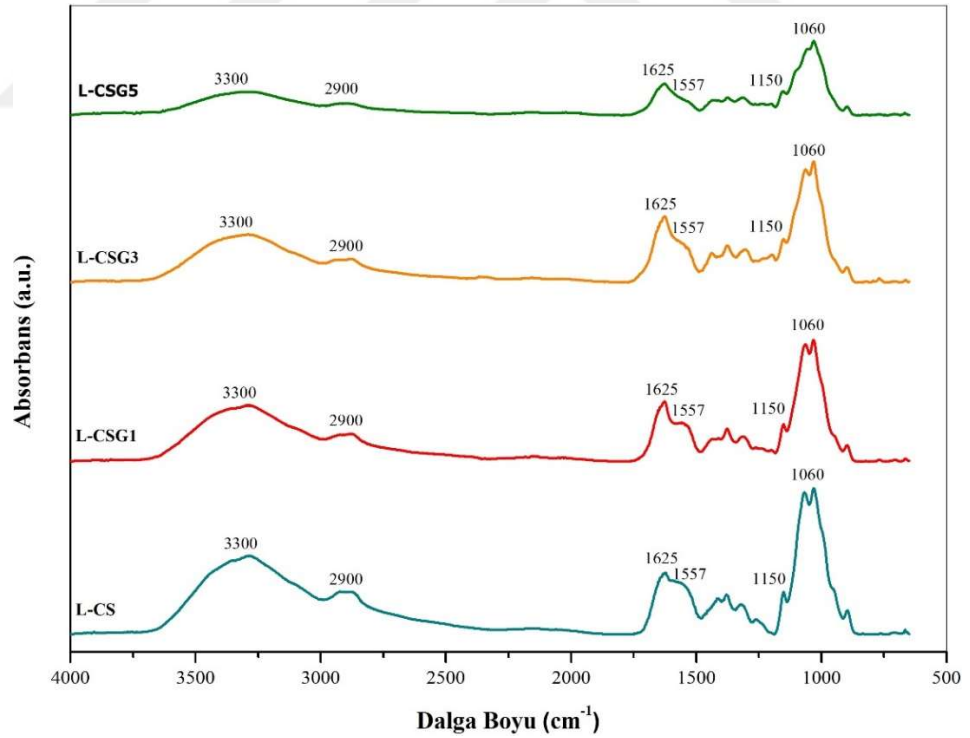
Şekil 5.3'te kontrol grubuna ve Şekil 5.4'te kompozit doku iskelelerine ait ATR-FTIR analiz sonuçları görülmektedir. 3400-3000 cm^{-1} (OH, NH gerilme), ~1640 cm^{-1} (amid, C=O gerilme), ~1560 cm^{-1} (NH gerilme) ve 1100-1000 cm^{-1} (C-O gerilme) pikleri, kitosanın karakteristik pikleri olup literatürde yer almaktadır (Li ve diğer., 2015) (Sionkowska ve Planecka, 2013). Genipine ait karakteristik pikler ise ~1680 cm^{-1} (ester, C=O gerilme), ~1620 cm^{-1} (C=C gerilme), ~1080 cm^{-1} (C-O gerilme) olarak belirtilmektedir. Kitosan ve genipin arasındaki reaksiyon, amid ve amin absorpsiyon bantları arasındaki yükseklik oranı artışıyla tespit edilebilir. Literatürde genipin ile kitosanın çapraz bağlanması sonucunda, 1640 cm^{-1} 'de amid bantlarına ait pikler gözlemlenirken, 1560 cm^{-1} 'de kitosana ait amin pikinin şiddetinin azaldığı belirtilmiştir (Li, ve diğer., 2015). Yapılan FTIR analizleri sonucunda, çapraz bağlanmış kontrol grubu örneklerinde, 1557 cm^{-1} 'de kitosana ait amin pikinin şiddetinin azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 5.3).

İpeğin α -düzensiz sarmal yapısı için literatürde amid I, II ve III bantlarına ait karakteristik pikler, sırasıyla 1643, 1530 ve 1240 cm^{-1} olarak belirtilmektedir. Metanol işlemi ardından α -düzensiz sarmal yapının β -konformasyonuna dönüşümü ile β -konformasyonuna ait ipeğin karakteristik FTIR pikleri 1625 ± 10 cm^{-1} (amid I) ve 1525 ± 10 cm^{-1} 'de (amid II) görülmektedir (Sionkowska ve Planecka, 2013) (Samal, ve diğer., 2014).

Kitosan-ipek doku iskelelerinin FTIR analizinde yaklaşık 1625 cm^{-1} dalga sayısında, ipek ve kitosana ait amid bantlarının ortak piki görülmektedir (Şekil 5.4). Genipin konsantrasyonu arttıkça kitosan-ipek doku iskelelerinin 1557 cm^{-1} 'deki amin pikinin şiddetinin azaldığı görülmektedir. Ayrıca 1060 cm^{-1} 'deki pikte daha yüksek dalga sayısına doğru genişleme vardır. Bunun nedeni genipin yapısında bulunan C-O gerilme bantlarının yapıya eklenmesidir.



Şekil 5.3 Kontrol grubuna ait ATR-FTIR analizleri



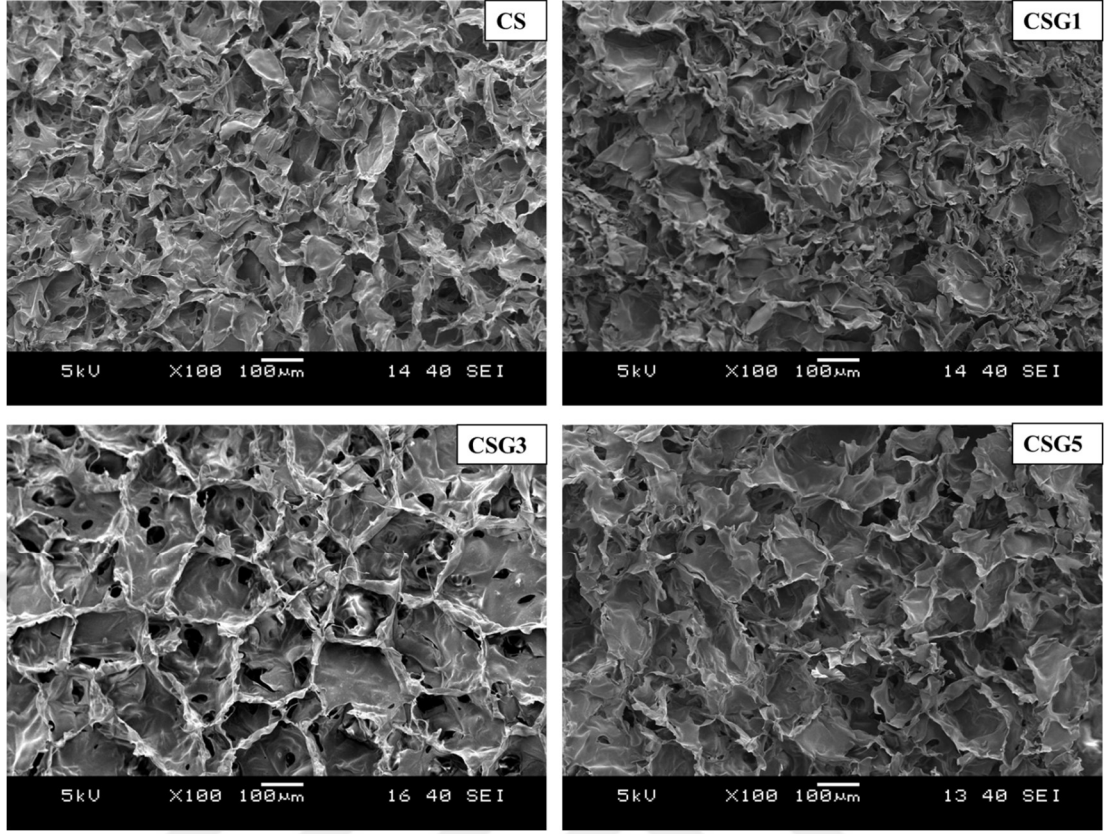
Şekil 5.4 Kompozit doku iskelelerine ait ATR-FTIR analizleri

5.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Biyomedikal alanında kullanılacak polimerik malzemeler için yüzey özellikleri büyük önem taşır. Bu alanda kullanılan herhangi bir malzemenin implantasyonu sonrasındaki ilk reaksiyonlar yüzeyde gerçekleşecektir. Üretilen doku iskelelerinin yüzey yapı özelliklerinin tayini için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır.

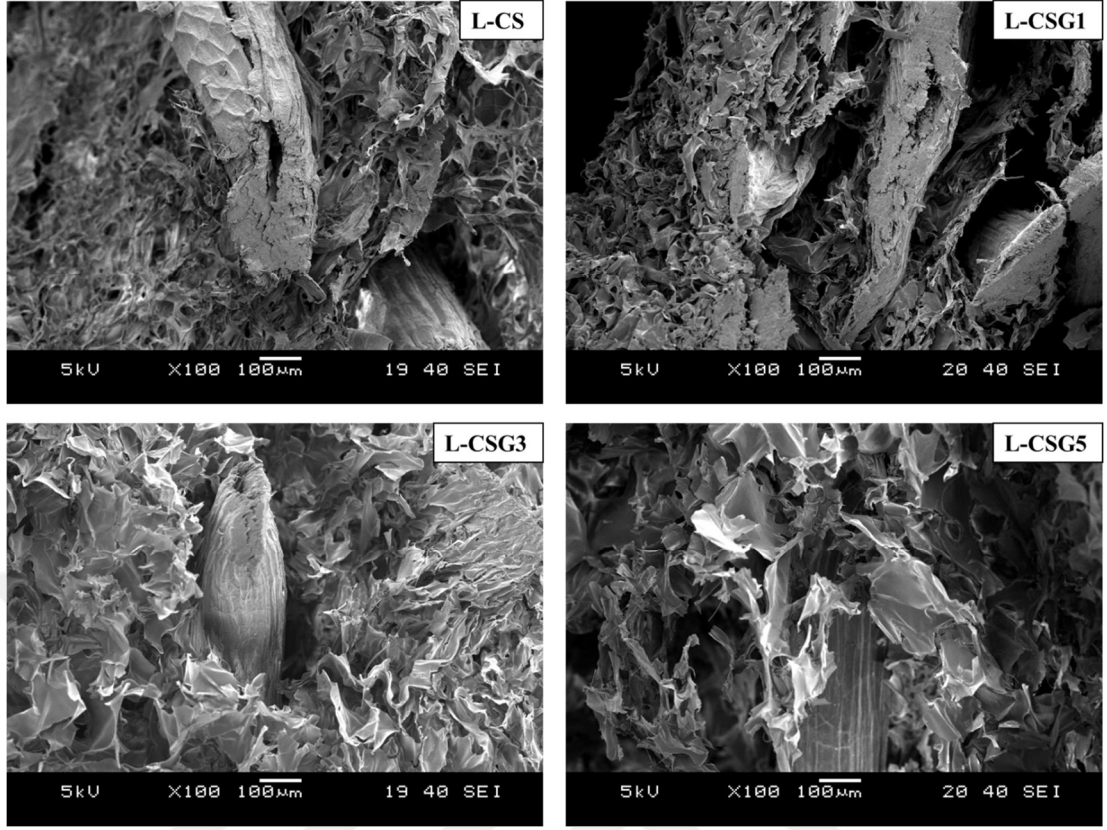
Hücre tutunması ve büyümesi açısından üretilmiş olan gözenekli doku iskelelerinde gözenek boyutu ve yapısı önem taşımaktadır. Uygulama alanı ve hedef hücre tipine göre istenilen gözenek boyutu büyüklüğü değişkenlik gösterebilirken, gözenek yapısının açık gözenekli olması gerekmektedir. Çalışmada üretilen kompozit doku iskeleleri ve kontrol grubunun SEM analizi sonuçları incelendiğinde, bütün doku iskelelerinin açık gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmektedir (Şekil 5.5 ve Şekil 5.6).

Şekil 5.5'te gösterilen kontrol grubuna ait SEM görüntülerinde %0.3 genipin çapraz bağlayıcı oranına sahip CSG3 doku iskelesinde göreceli olarak daha homojen bir gözenek yapısının elde edildiği görülmektedir. Yan ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada, eklem kırıkdağı hasarını gidermek için üretilmiş olan kitosan-kolajen doku iskelelerinin gözenek boyutları 100-200 µm aralığındadır (Yan ve diğer., 2010). Kontrol grubuna ait SEM görüntüleri, Image J programı kullanılarak incelenmiş ve gözenek boyutunun Yan ve arkadaşlarının çalışmasına benzer olarak 150-200 µm aralığında değiştiği belirlenmiştir.



Şekil 5.5 Kontrol grubunun SEM görüntüleri

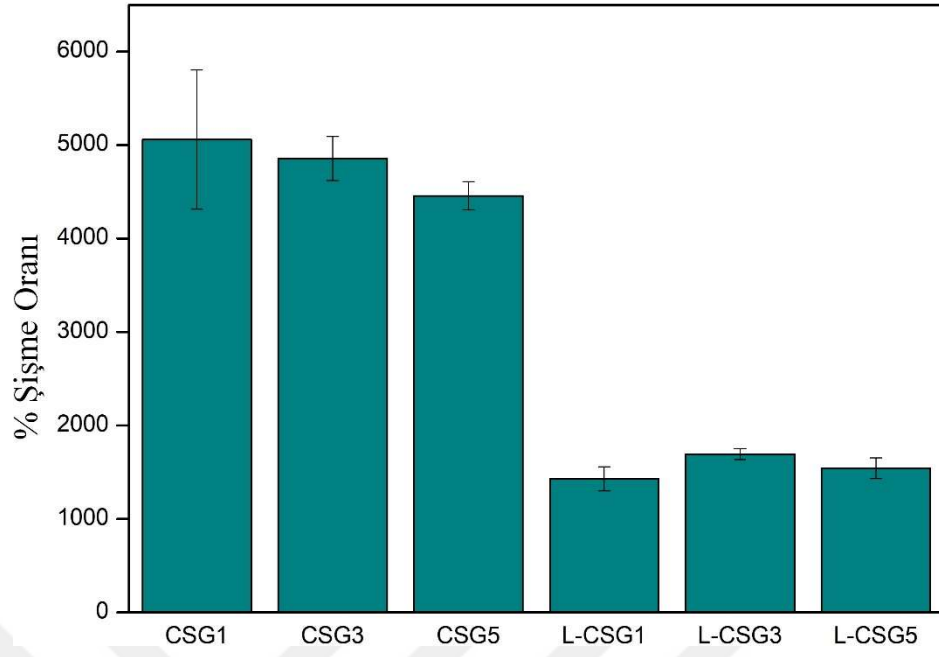
Üretilen kompozit doku iskelelerinde katkı elemanı olarak kullanılan lif kabağının, kitosan-ipek matrisiyle entegrasyonu sağlamak en önemli unsurdur. Farklı genipin konsantrasyonlarında üretilen dört farklı doku iskelesinin SEM görüntüleri incelendiğinde, lif kabağlarının kitosan-ipek yapısı içerisine gömüldüğü gözlemlenmiştir (Şekil 5.6). Yapı içerisindeki lif kabağlarının çapı 200-300 μm aralığındadır. Tanobe ve arkadaşlarının çalışmasındaki, NaOH işlemine tabii tutulmuş lif kabağlarının SEM görüntüleri (Şekil 2.5.g) ile karşılaştırıldığında, üretilen kompozit doku iskelelerindeki lif kabağlarının yapısı, boyut ve yapıya entegrasyonu açısından benzerdir (Tanobe, Sydenstricker, Munaro, ve Amico, 2005).



Şekil 5.6 Kompozit doku iskelelerinin SEM görüntüleri

5.4 Şişme Testi

Doku iskelelerinin şişme oranları Denklem 4.1'e göre hesaplanmıştır. Şişme oranları Şekil 5.7 ve Tablo 5.1'de verilmektedir. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan genipin konsantrasyonu arttıkça kontrol grubu doku iskelelerinin şişme oranlarında düşüş gözlemlenmiş ve şişme oranlarındaki standart sapma düşmüştür. Lif kabağı takviyesi kompozit doku iskelelerinin şişme oranı değerlerini kontrol grubuna kıyasla yaklaşık üçte biri oranında düşürmüştür.



Şekil 5.7 Doku iskelelerinin şişme oranları

Tablo 5.1 Doku iskelelerinin şişme oranları

Örnek Adı	Şişme Oranı (%)
CSG1	5059 ± 744
CSG3	4854 ± 235
CSG5	4456 ± 150
L-CSG1	1428 ± 129
L-CSG3	1692 ± 57
L-CSG5	1543 ± 110

5.5 Dinamik Mekanik Analiz

Gerçekleştirilen DMA analizi ile üretilen kompozit doku iskeleleri ve kontrol grubunun viskoelastik özellikleri ve eklem kıkırdağı uygulamalarına uygunluğu tartışılmıştır. Yetişkin bir insanın yürüme sırasındaki adım frekansı aralığı (dakikada 72 ila 131 adım), 0.6 ve 1.1 Hz frekans değerlerine denk gelir. Koşarken ise 1.5 Hz değerinin üzerine çıkar (Pietrzak , 2008). Bu nedenle bu çalışmada üretilen doku iskelelerinin depolama modülü, kayıp modülü ve tan delta değerleri yürüme ve koşma frekansları arasında kalan 1 Hz frekansında karşılaştırılmıştır. Üretilen doku iskelelerinin dinamik mekanik analiz sonuçları Tablo 5.2’de gösterilmektedir. 1 Hz

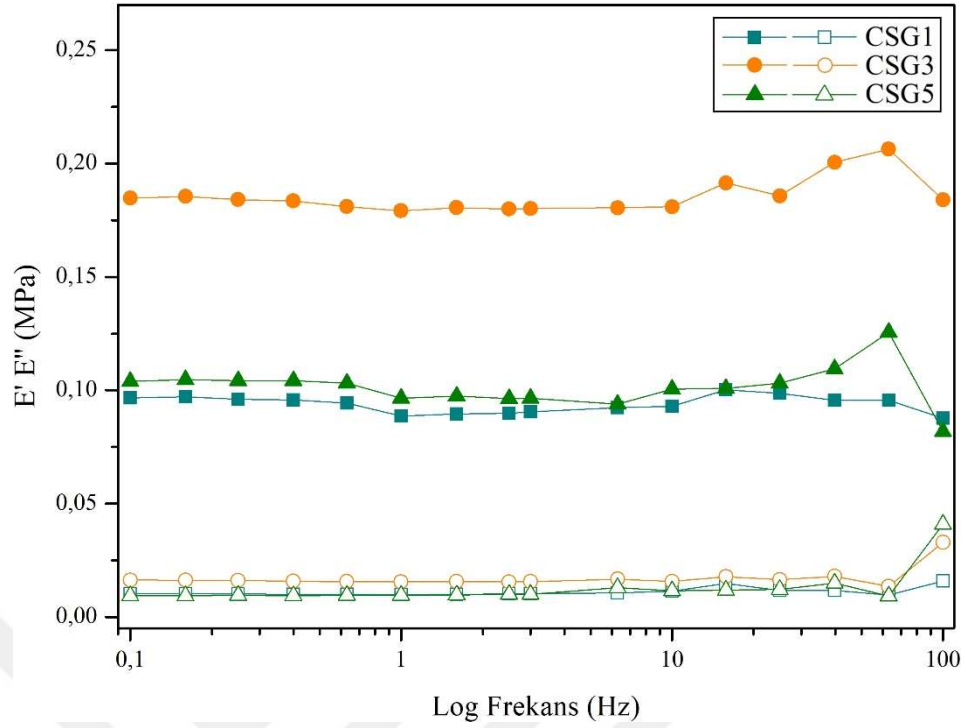
frekansında en yüksek depolama modül değeri CSG3 örneğine aitken lif kabağı katkısıyla depolama modül değerlerinde düşüş gözlemlenmiştir. En yüksek tan delta değeri ise L-CSG3'e aittir. Bu da bu örneğin enerji sönümleme kapasitesinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Tablo 5.2 Doku iskelelerinin 1 Hz frekans değerinde depolama modülü (E'), kayıp modülü (E'') ve tan delta değerleri

Örnek Adı	Frekans Değeri (Hz)	Depolama Modülü (MPa)	Kayıp Modülü (MPa)	Tan delta
CSG1	1	0,08859	0,00993	0,11214
CSG3	1	0,17921	0,01558	0,08693
CSG5	1	0,09651	0,00956	0,09903
L-CSG1	1	0,00311	0,000252	0,08134
L-CSG3	1	0,00205	0,000325	0,18365
L-CSG5	1	0,00398	0,000325	0,08156

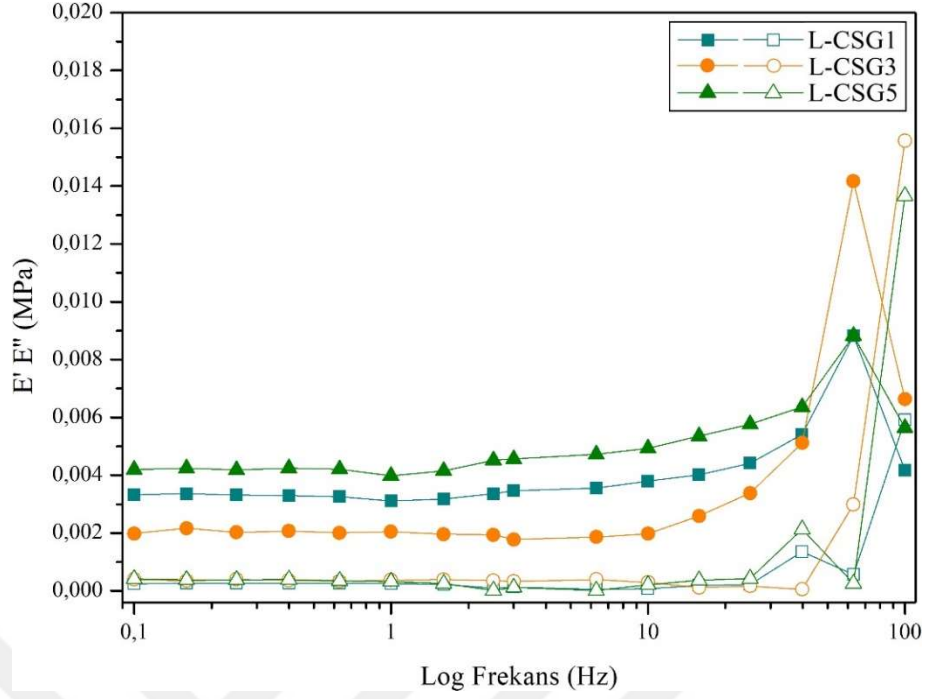
Kontrol grubuna ait hidrojel doku iskelelerinin depolama (E') ve kayıp (E'') modüllerinin frekans taraması modundaki değişimleri, Şekil 5.8'de gösterilmektedir.

DMA sonuçları incelendiğinde, depolama modüllerinin, kayıp modüllerinden daha yüksek değerlerde olduğu görülmektedir. Bu durum üretilen kontrol grubu doku iskelelerinin elastik davranışa sahip olduğunu göstergesidir. Çapraz bağlayıcı oranı arttıkça oluşturulan yapının daha yüksek depolama modülüne sahip olması beklenirken, en yüksek depolama modül değerine CSG3 örneğinde ulaşılmıştır. CSG1 ve CSG5 doku iskelelerinin depolama modül değerleri birbirine yakındır. Ayrıca, her üç örnekte kayıp modül değerleri benzerlik göstermektedir (Şekil 5.8).

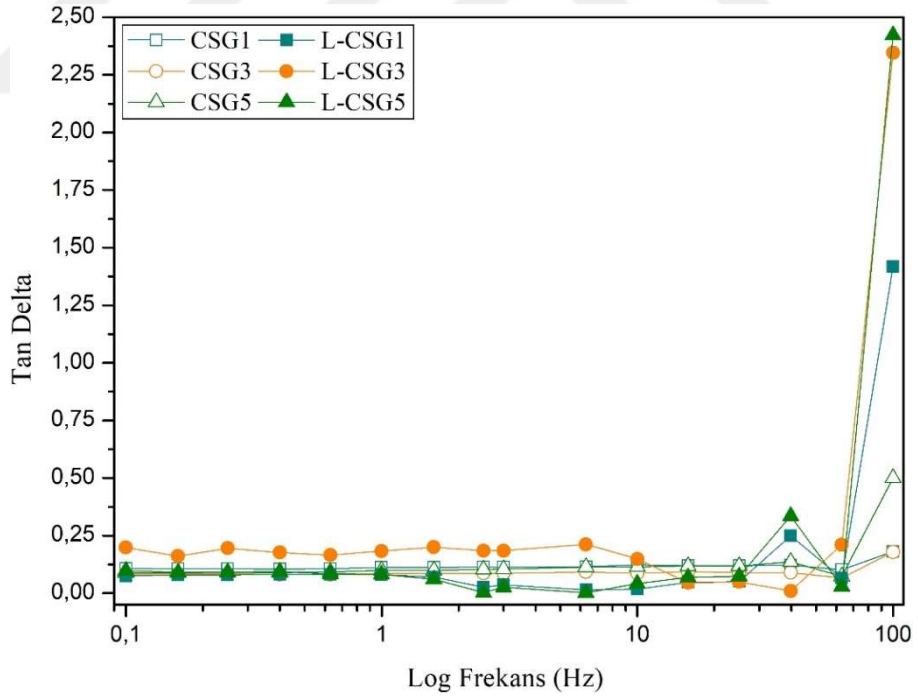


Şekil 5.8 Kontrol grubuna ait depolama modülü (E') , kayıp modülü (E'')–logaritmik frekans eğrileri

Kompozit doku iskelelerine ait depolama ve kayıp modüllerinin logaritmik frekansa göre değişim eğrileri Şekil 5.9'da gösterilmektedir. Bütün kompozit doku iskelelerinin depolama modül değerleri yükselen frekans ile artış göstermiştir. Bu da kompozit doku iskelelerinin viskoelastik davranış gösterdiğinin kanıtıdır. Lif kabağı katkısı ile, kompozit doku iskelelerinin depolama modül (E') değerleri kontrol grubuna kıyasla daha düşüktür (Şekil 5.9). Ayrıca, E' değerlerinde yüksek frekanslarda görülen keskin düşüşler, örneklerde muhtemel mikro hasarların oluştuğunun göstergesidir (Şekil 5.8. ve Şekil 5.9).



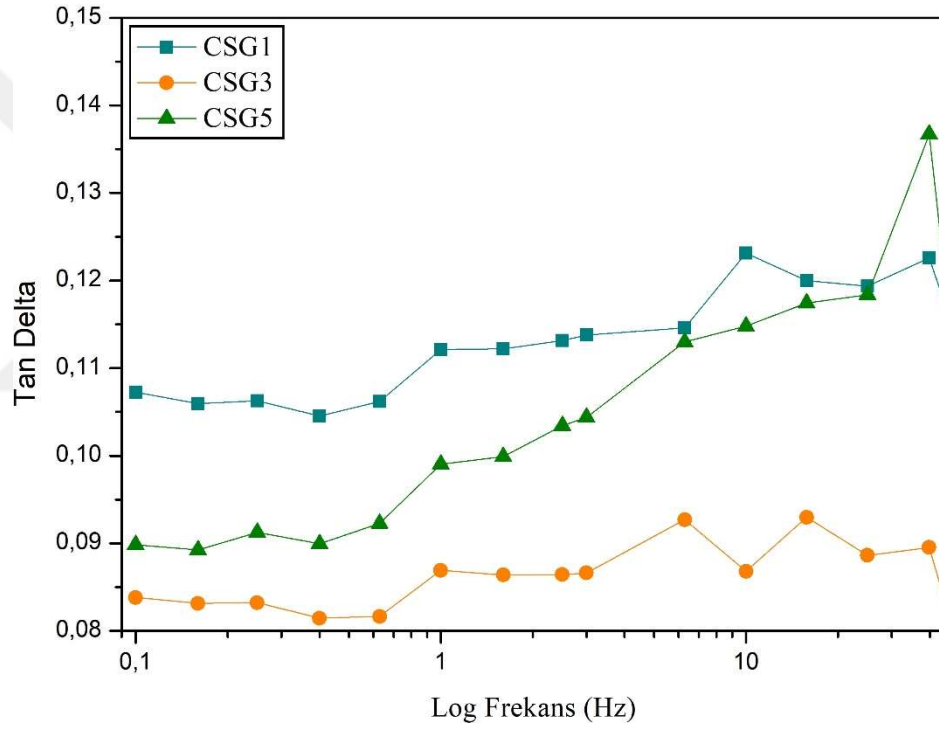
Şekil 5.9 Kompozit doku iskelelerine ait depolama modülü (E') , kayıp modülü (E'')–logaritmik frekans eğrileri



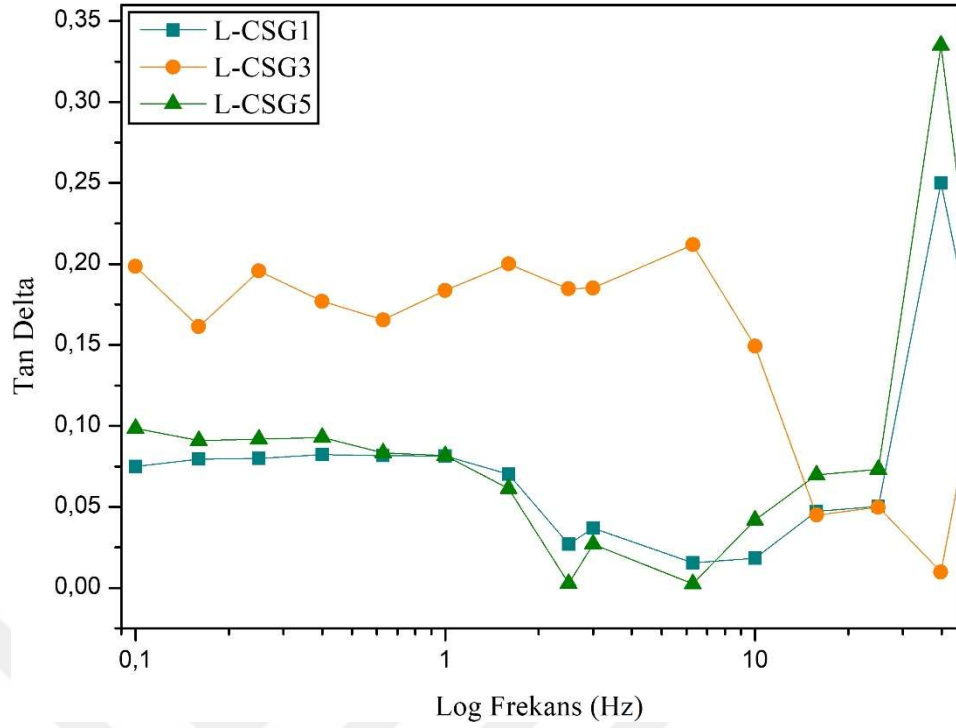
Şekil 5.10 Kompozit doku iskeleleri ve kontrol grubuna ait tan delta–logaritmik frekans eğrileri

Kontrol grubuna ve kompozit doku iskelelerine ait örneklerin tan delta-logaritma frekans eğrileri Şekil 5.10'da (0-100 Hz) verilmektedir. Tan delta değerlerindeki

değişimleri daha detaylı görülebilmesi için kontrol grubu ve kompozit doku iskeleleri için 0 ile 40 Hz arasındaki tan delta-logaritma frekans eğrileri sırasıyla, Şekil 5.11 ve Şekil 5.12’de verilmektedir. Tüm frekanslarda tan delta değerleri her numune için benzerlik göstermektedir. Yüksek frekanslarda tan δ değerlerinde görülen keskin artış, numunelerde meydana gelen mikro hasarların bir sonucu olarak depolama modül değerlerindeki düşüşe bağlıdır. Literatürde insan eklem kıkırdağının tan delta değeri, 0.266 olarak belirtilmiştir. Kontrol grubuna ait tan delta değerleri bu değerin altında kalmaktadır. Lif kabağı takviyeli kompozit doku iskelelerinde bu değere en çok yaklaşan örnek L-CSG3 olmuştur (Temple, Cederlung, ve Lawless, 2016).



Şekil 5.11 Kontrol grubuna ait tan delta–logaritmik frekans eğrileri (0-40 Hz aralığı)

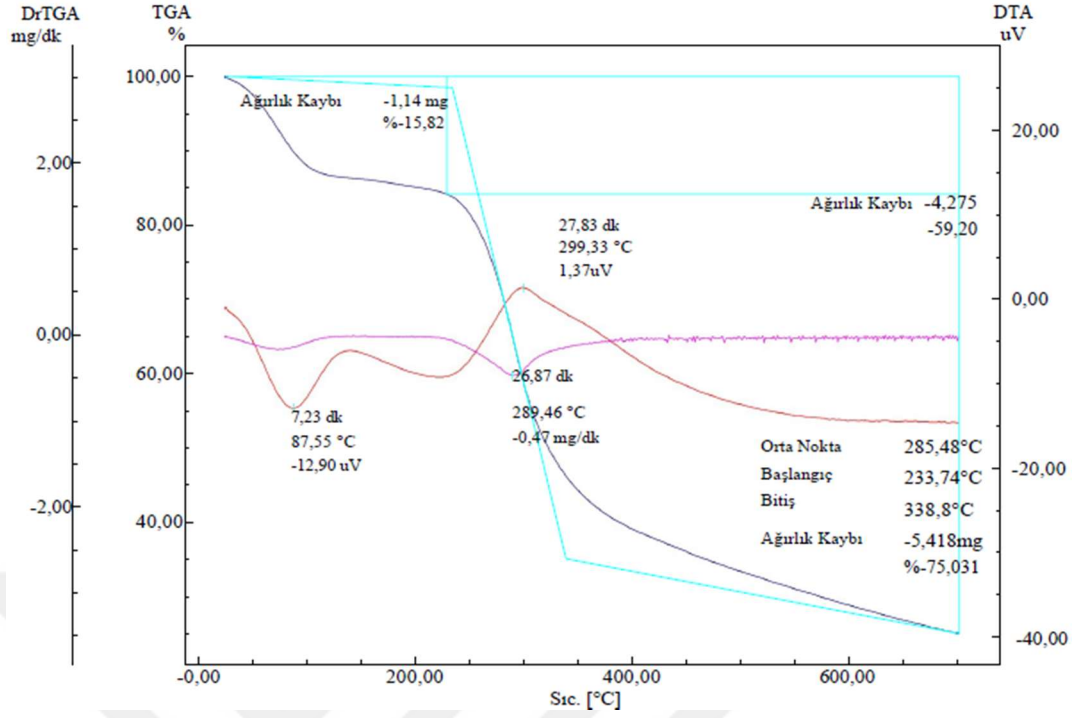


Şekil 5.12 Kompozit doku iskelelerine ait tan delta–logaritmik frekans eğrileri (0-40 Hz aralığı)

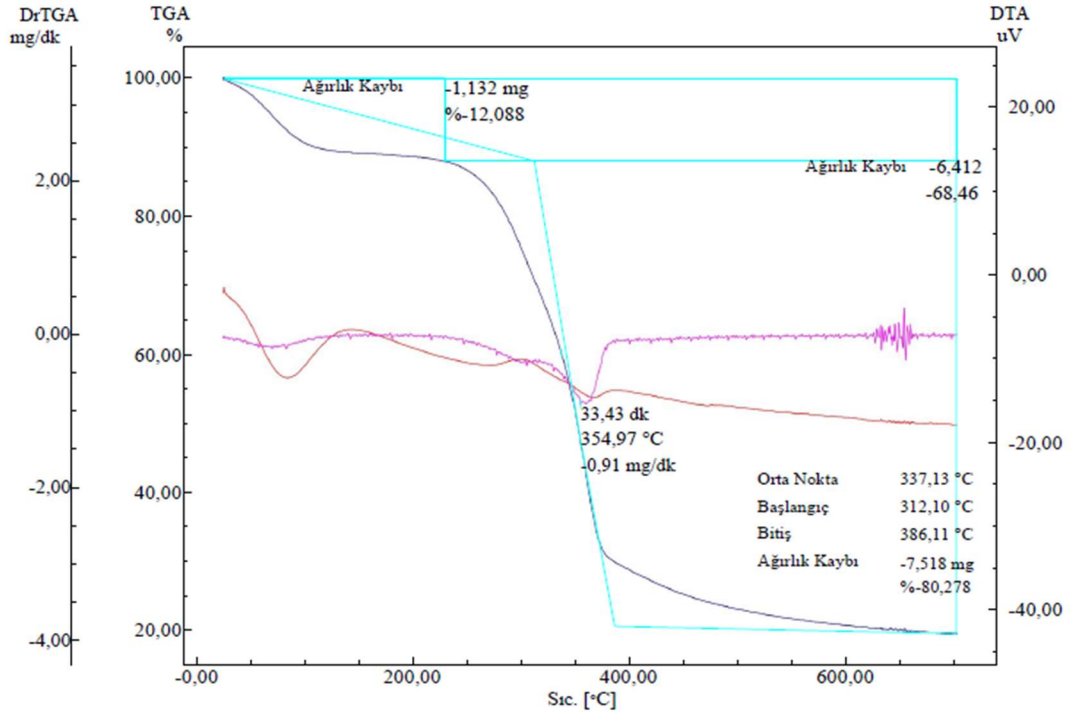
5.6 Termal Gravimetrik Analiz(TGA)–Diferansiyel Termal Analiz(DTA)

TGA-DTA analizleri kontrol gruplarının ve kompozit doku iskelelerinin termal davranışını araştırmak için gerçekleştirilmiştir.

Çapraz bağlanmamış kontrol grubu ve kompozit doku iskelelerine ait TGA-DTA eğrileri Şekil 5.13’te verilmektedir. Çapraz bağlanmamış kontrol grubu doku iskelesine (CS) ait TGA eğrisi incelendiğinde ilk olarak %15,8 ağırlık kaybına denk gelen adsorbe edilmiş suyun yapıdan uzaklaşması görülmektedir. İkinci aşamadaki %60’lık ağırlık kaybı organik yapının bozulmasını ifade eder. DTA eğrisi incelendiğinde ilk aşamanın endotermik, ikinci aşamanın ise ekzotermik olarak gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 5.13).



Şekil 5.13 Çapraz bağlanmamış kontrol grubu doku iskelesine (CS) ait TGA-DTA eğrisi

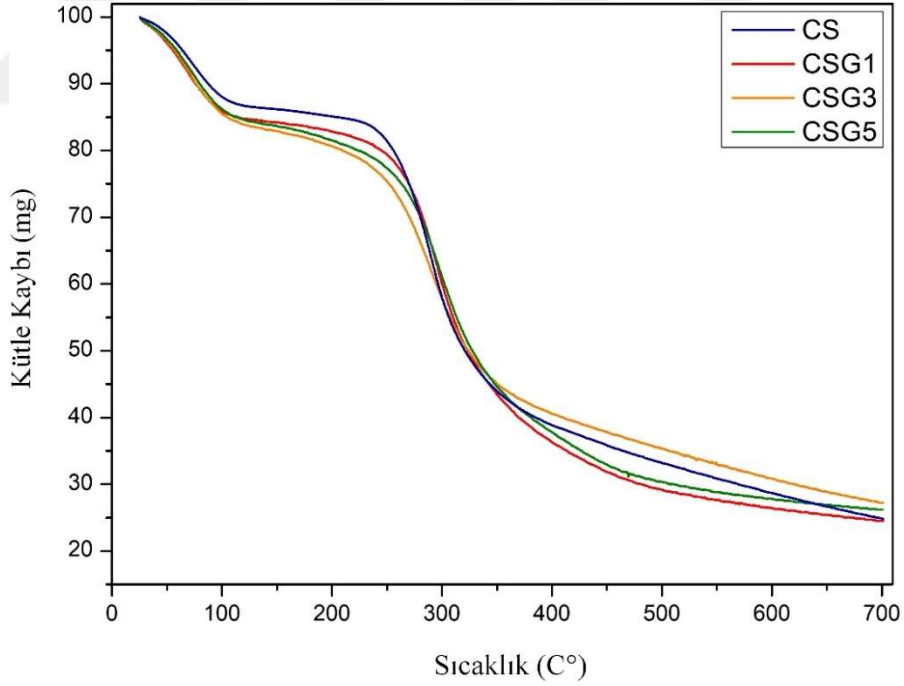


Şekil 5.14 Çapraz bağlanmamış kompozit doku iskelesine (L-CS) ait TGA-DTA eğrisi

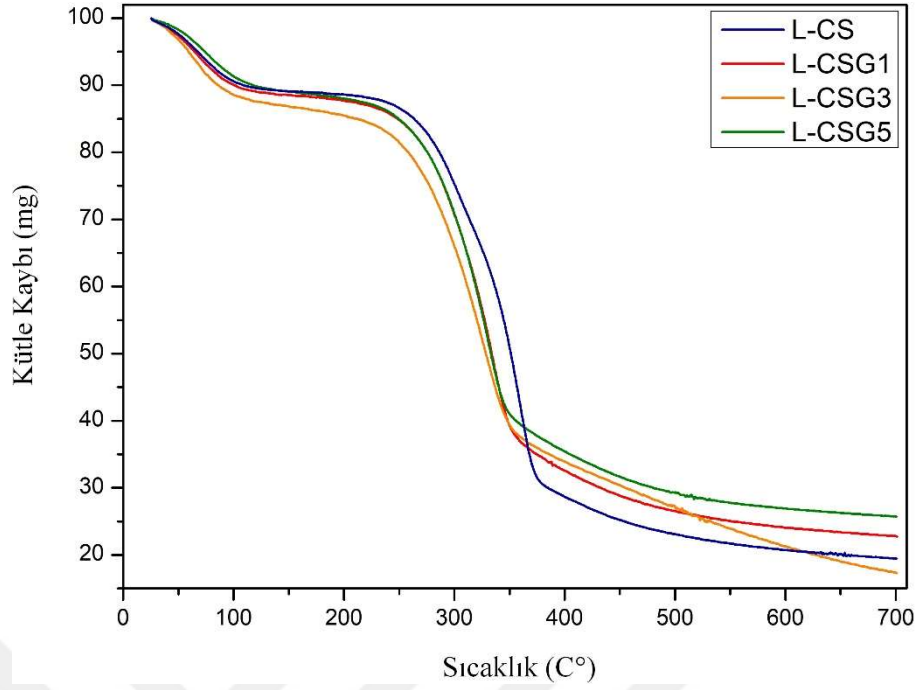
Çapraz bağlanmamış kompozit doku iskelesine (L-CS) ait TGA eğrisi incelendiğinde ise ilk aşamada %12'lik bir ağırlık kaybı gözlemlenirken, ikinci aşamada %68'lik ağırlık kaybı görülmektedir. DTA eğrisi incelendiğinde kontrol

grubundan farklı olarak lif kabağı katkısıyla, ikinci aşamanın endotermik olarak gerçekleştiği bulunmuştur (Şekil 5.14).

Çapraz bağlanmış ve bağlanmamış kontrol grubu ve kompozit doku iskelelerinin TGA analiz sonuçları sırasıyla Şekil 5.15 ve Şekil 5.16’te verilmektedir. Çapraz bağlanmış doku iskelelerinin termal bozunma süreçleri de iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama adsorblanan suyun yapıdan uzaklaşmasını ikinci aşama yapı içerisindeki organik bağların koparak bozunmasını ifade eder. Her doku iskelesi için bozunma başlangıç sıcaklığı (T_{onset}), maksimum bozunma sıcaklığı (T_d) değerleri ile kömürleşme verimleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 5.3’te verilmiştir. Lif kabağı katkısının bozunma başlangıç sıcaklığını artırarak kompozit doku iskelelerinin termal kararlılığını arttırdığı belirlenmiştir. Tüm örneklerde maksimum bozunma sıcaklıkları ve kömürleşme verimlerinde anlamlı bir değişim yakalanamamıştır. Kömürleşme verimleri %18-28 aralığındadır.



Şekil 5.15 Kontrol grubuna ait TGA eğrileri



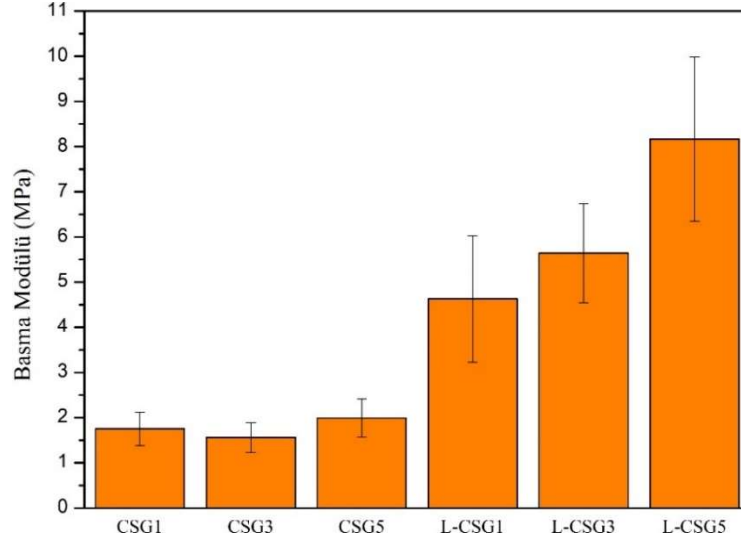
Şekil 5.16 Kompozit doku iskelelerine ait TGA eğrileri

Tablo 5.3 Diferansiyel Termal Analiz (DTA) sonuçları

Örnek Adı	Bozunma Başlangıç Sıcaklığı, T_{onset} (°C)	Maksimum Bozunma Sıcaklığı, T_d (°C)	Kömürleşme Verimi (%)
CS	233,74	338,80	24,97
CSG	247,22	352,98	25,10
CSG3	231,49	360,87	27,91
CSG5	243,16	366,44	26,83
L-CS	312,10	386,11	19,72
L-CSG1	272,35	329,38	26,08
L-CSG3	285,09	360,04	26,08
L-CSG5	267,56	365,86	17,55

5.7 Mekanik Analiz (Basma Deneyi)

Deneyler sonucunda elde edilen gerilim gerinim eğrilerinden her numune için %7 ve %15 birim şekil değiştirme aralığındaki lineer bölge kullanılarak basma modülleri hesaplanmıştır (Şekil 5.17).



Şekil 5.17 Doku iskelelerinin basma modülleri

Tablo 5.4'te görüldüğü üzere, lif kabaksız kontrol grubu numunelerinde genipin oranı değişimi ile basma modülünde anlamlı bir değişim gözlenmezken, lif kabağı takviyeli kompozit doku iskelelerinde genipin oranındaki artış ile basma modül değerleri artmaktadır.

Kontrol grubu numunelerinin ortalama basma modül değerleri yaklaşık 1-2 MPa iken, lif kabaklı kompozit doku iskelelerinde ise yaklaşık 5-9 MPa değerlerindedir. Lif kabağı takviyesi ile basma modül değerleri artmıştır (Tablo 5.4). Ayrıca, üretilen doku iskelelerinin basma modül değerleri, literatürde belirtilen insan eklem kırırdağının basma modül değeri ile (~1.75 MPa) (Bartnikowski, Wellard, Woodruff, ve Klein, 2015) uyumludur.

Tablo 5.4 Üretilen doku iskelelerinin ortalama basma modülleri

Örnek Adı	Ortalama Basma Modülü (MPa)
CSG1	1,75 ± 0,37
CSG3	1,56 ± 0,33
CSG5	1,99 ± 0,42
L-CSG1	4,63 ± 1,40
L-CSG3	5,64 ± 1,10
L-CSG5	8,17 ± 1,82

BÖLÜM ALTI

GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada ipek, kitosan ve lif kabağı doğal malzemelerinden kıkırdak doku hasarının tedavisinde kullanılmak amacıyla doku iskeleleri üretilmiştir. Her üç malzeme de doku mühendisliği alanındaki çalışmalarda yer almış olsa da, bu üç malzemeden oluşturulan kompozit yapı ilk kez üretilip özellikleri incelenmiştir.
- Üretilen doku iskelelerinde kararlı bir yapıyı sağlamak için çapraz bağlayıcı olarak toksik etkisi oldukça az olan genipin proteini kullanılmış, mukavemeti güçlendirmek için ise lif kabağının doğal diziliminden yararlanmak amaçlanmıştır.
- Üretim metodu olarak kullanılan dondurarak kurutma işlemi ile açık gözenekli yapıda lif kabağı katkılı kompozit doku iskeleleri ve lif kabağı katkısız kontrol grubu elde edilmiştir.
- Kullanılmış olan karakterizasyon yöntemleri sayesinde, üç farklı genipin konsantrasyonu ile üretilmiş kompozit doku iskeleleri ve kontrol grubunun özellikleri belirlenmiştir.
- Genipinin, kitosan ve ipeğin yapısında bulunan amin gruplarıyla kovalent çapraz bağlanması sonucunda yapıda koyu mavi renk dönüşümü gerçekleşmiştir. Çalışmada üretilen doku iskelelerinin çapraz bağlanma süresi 48 saat olarak optimize edilmiştir.
- FTIR analiz sonuçları kitosan, ipek ve lif kabağına ait karakteristik piklerini içermektedir. İpeğin β -konformasyonunun teyiti $1625 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ (amid I) ve $1525 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ (amid II) piklerinin varlığı ile (Sionkowska ve Planecka, 2013), lif kabağının yıkama işleminin başarılı olduğunun teyiti ise hemiselüloza ait C=O gerilme bandının gözlemlenmemesiyle sağlanmıştır.

Ayrıca doku iskelelerinin genipin konsantrasyonunun artması ile birlikte 1557 cm^{-1} 'deki amin piki şiddeti azalmakta ve 1060 cm^{-1} 'deki pik genişlemektedir. Bunun nedeni genipinin yapısındaki C-O gerilme bantlarının yapıya eklenmesidir.

- Şişme testi sonuçları incelendiğinde hem genipin konsantrasyonu oranı artışı hem de lif kabağı takviyesinin varlığı ile şişme oranları düşmüştür.
- Gözenek boyutu ve gözenek yapısı doku iskelelerinde hücre tutunmasını ve büyümesini destekleme açısından büyük önem taşır. Gözenek boyutu doku iskelesinin kullanılacağı alan ve hücre tipine göre değişiklik gösterirken, gözenek yapısının açık gözenekli olması gerekmektedir. Çalışmada üretilen bütün doku iskelelerinin SEM görüntüleri incelendiğinde açık gözenek yapısı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada üretilmiş kontrol grubu doku iskelelerinde $150\text{-}200\text{ }\mu\text{m}$ gözenek çapı gözlemlenmiştir. Gözenek çapı değerleri SEM görüntülerinin Image J programı kullanılarak incelenmesiyle belirlenmiştir. Daha güvenilir gözenek çapı tayini ve gözenek dağılımı için ilerleyen çalışmalarda cıva porozimetresi yöntemi kullanılabilir.
- Termal analizler sonucu elde edilen TGA eğrilerinde bozunmanın iki aşamadan meydana geldiği belirlenmiştir. İlk aşamada adsorbe edilen suyun uzaklaşması gözlemlenirken, ikinci aşamada yapı içerisindeki organik grupların bozunması görülmektedir. Kontrol grubuna ait DTA eğrilerinde yapısal bozunma sırasında reaksiyon ekzotermik iken, kompozit doku iskelelerine ait DTA eğrilerinde yapının endotermik bozunma gösterdiği tespit edilmiştir.
- Kompozit doku iskelelerinin depolama modülü (E') değerleri, kontrol grubunun sonuçlarına kıyasla daha düşük olarak bulunmuştur. Bu da kompozit doku iskelelerinin daha az elastik yapıda olduğunu göstermiştir. Çapraz bağlayıcı yoğunluğu arttıkça oluşturulan yapının daha yüksek depolama modülüne sahip olması beklenirken, en yüksek modül değerine

CSG3 örneğinde ulaşılmıştır. Doku iskelelerinin enerji sönümleme kabiliyetini gösteren tan delta sonuçları incelendiğinde L-CSG3 örneğinde en iyi sonuç alınmıştır.

- Kompozit doku iskelelerinin basma modülleri kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olarak bulunmuştur. Kontrol grubu numunelerinde genipin oranı değişimi ile basma modül değerlerinde anlamlı bir değişim gözlenmezken, kompozit doku iskelelerinde genipin oranındaki artış ile beklenildiği gibi basma modül değerleri yükselmiştir.
- Sonuç olarak, üretilen L-CSG3 örneği, insan kıkırdağının basma mukavemeti ve tan delta değerlerine en yakın sonuçları vermiştir. Üretilen bu malzemenin doku iskelesi olarak kullanılabilmesi için *in-vitro* ve *in-vivo* ortamda biyouyumluluk testlerinin yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Aramwit, P. (2016). Introduction to biomaterials for wound healing. M.S. Ågren, (Ed), *Wound Healing Biomaterials* (2) içinde (3-38). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Arıkan, A. (2013). *Doku iskelelerinin süperkritik karbondioksit ortamında hazırlanması ve karakterizasyonu*. Yüksek Lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Bartnikowski, M., Wellard, R. M., Woodruff, M. A. ve Klein, T. J. (2015). Tailoring hydrogel viscoelasticity with physical and chemical crosslinking. *Polymers*, 7, 2650-2669.
- Bartolo, L. D., Rende, M., Morelli, S., Giusi, G., Salerno, S., Piscioneri, A., ve diğer. (2008). Influence of membrane surface properties on the growth of neuronal cells isolated from hippocampus. *Journal of Membrane Science*, 325, 139–149.
- Bentley, G., Biant, L. C., Vijayan, S., Macmull, S., Skinner, J. A., ve Carrington, R. W. (2012). Minimum ten-year results of a prospective randomised study of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for symptomatic articular cartilage lesions of the knee. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 94 (4), 504-509.
- Bhumiratana, S., Eton, R. E., Oungoulıan, S. R., Wan, L. Q., Ateshian, G. A., ve Vunjak-Novakovic, G. (2014). Large, stratified, and mechanically functional human cartilage grown in vitro by mesenchymal condensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (19), 6940-6945.
- Bi, L., Cao, Z., Hu, Y., Song, Y., Yu, L., Yang, B., ve diğer. (2011). Effects of different cross-linking conditions on the properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22 (1), 51-62.

- Boynard, C. A., ve Almeida, J. R. (2010). Morphological characterization and mechanical behavior of sponge gourd (*luffa cylindrica*) - polyester composite materials. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 39 (3) 489-499.
- Burg, K. J., Porter, S. ve Kellam, J. F. (2000). Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 21 (23), 2347-2359.
- Cecen, B., Kozacı, L. D., Yüksel, M., Kara, A., Ersoy, N., Bağrıyanık A., ve diğer. (2017). Two layered scaffolds (loofah/PLLA/cellulose/chitin) for repair of osteochondral defect. *Journal of Tissue Science & Engineering*, 8 (3), 1-7.
- Chuang, E. Y., Chiang, C. W., Wong, P. C., ve Chen, C. H. (2018). Hydrogels for the application of articular cartilage tissue engineering: A review of hydrogels. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2018, 1-13.
- Croisier, F. ve Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49 (4) , 780-792.
- Dimida, S., Barca, A., Cancelli, N., Benedictis, V. D., Raucci, M. G., ve Demitri C. (2017). Effects of genipin concentration on cross-linked chitosan scaffolds for bone tissue engineering: structural characterization and evidence of biocompatibility features. *International Journal of Polymer Science*, 2017, 0-8.
- Djerassi, C. , Nakano, T., James, A. N., Shoolery, J. N., Zalkow, L. H., ve Eisenbraun, E. J. (1960). The Structure of Genipin. *The Journal of Organic Chemistry*, 26, 1192–1206.
- Engler, A. J., Sen S., Sweeney, H. L., ve Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs Stem cell lineage specification. *Cell*, 126 (4), 677-689.

- Ferrari, M., Louati, K., Miquel, A., Behin, A., Benveniste, O., ve Sellam, J. (2015). Quickly progressive amyotrophy of the thigh: An unusual cause of rapid chondrolysis of the knee. *Joint Bone Spine*, 82 (3), 203-205.
- Foran, J. R., Brown, N., Della Valle, C. J., Berger, R. A., ve Galante, J. O. (2013). Long-term survivorship and failure modes of unicompartmental knee arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 471 (1), 102-108.
- Fox, A. S., Bedi A., ve Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*, 1 (6), 461-468.
- Furukawa, T., Eyre, D. R., Koide, S., ve Gimcher, M. J. (1980). Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 62 (1), 79-89.
- Garg, S. ve Garg, A. (2016). Hydrogel: Classification, properties, preparation and technical Features. *Asian Journal of Biomaterial Research*, 2 (6), 163-170.
- Han, K. S., Song, J. E., Tripathy, N., Kim, H., Moon, B. M., Park, C. H., ve diğer. (2015). Effect of pore sizes of silk scaffolds for cartilage tissue engineering. *Macromolecular Research*, 23 (12), 1091-1097.
- Hangody, L., Vászárhelyi, G., Hangody, L. R., Sükösd, Z., Tibay, G., Bartha, L., ve diğer. (2008). Autologous osteochondral grafting - technique and long-term results. *International Journal of the Care of the Injured*, 39 (1), 32–39.
- Iizawa, T., Taketa, H., Maruta, M., Ishido, T., Gotoh, T., ve Sakohara, S. (2006). Synthesis of porous poly(N-isopropylacrylamide) gel beads by sedimentation polymerization and their morphology. *Synthesis and Morphology of Pnipa*, 104 (2), 842-850.

- Karageorgiou, V. ve Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26 (27), 5474-5491.
- Lee, S. J., Choi, J. S., Park, K. S., Khang, G., Lee, Y. M., ve Lee, H. B. (2004). Response of MG63 osteoblast-like cells onto polycarbonate membrane surfaces with different micropore sizes. *Biomaterials*, 25 (19), 4699-4707.
- Li, Q., Wang, X., Lou, X., Yuan, H., Tu, H., Li, B., ve diğer. (2015). Genipin-crosslinked electrospun chitosan nanofibers: Determination of crosslinking conditions and evaluation of cytocompatibility. *Carbohydrate Polymers*, 130, 166–174.
- Liu, H., Ge, Z., Wang, Y., Toh, S. L., Sutthikhum, V., Goh, J. C. (2007). Modification of sericin-free silk fibers for ligament tissue engineering application. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 82 (1), 129-138.
- Maolin, Z., Jun, L., Min, Y., ve Hongfei (2000). The swelling behavior of radiation prepared semi-interpenetrating polymer networks composed of polyNIPAAm and hydrophilic polymers. *Radiation Physics and Chemistry*, 58 (4), 397-400.
- Medina, J. C. (1959). *Plantas fibrosas da flora mundial*. Campinas : Seção de Plantas Fibrosas, Instituto Agrônômico.
- Nagarkar, S., Nicolai, T., Chassenieux, C., ve Lele, A. (2010). Structure and gelation mechanism of silk hydrogels. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12 (15), 3834-3844.
- Nagarkar, S., Patil, A., Lele, A., Bhat, S., Bellare, J., ve Mashelkar, R. A. (2009). Some mechanistic insights into the gelation of regenerated silk fibroin sol. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48 (17), 8014-8023.

- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14 (3), 88-95.
- Oladoja, N. A., Aboluwoye, C. O., ve Akinkugbe, A. O. (2009). Evaluation of loofah as a sorbent in the decolorization of basic dye contaminated aqueous system. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48 (6), 2786–2794.
- Peppas, N. A., Hilt, J., Khademhosseini, A., ve Langer, R. (2006). Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. *Advanced Materials*, 18 (11), 1345-1360.
- Pérez-Rigueiro, J., Elices, M., Llorca, J., ve Viney, C. (2001). Tensile properties of silkworm silk obtained by forced silking. *Tensile Properties of Silkworm Silk*, 82 (8), 1928-1935.
- Pietrzak , W. S. (Ed). (2008). *Musculoskeletal Tissue Regeneration*. Chicago: Humana Press.
- Ramos-de-la-Pen~a, A., Renard, C., Montañez , J., García-Cerda, L., ve Contreras-Esquivel, J. (2014). Environmental friendly cold-mechanical/sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (Genipa americana). *Ultrasonic Sonochemistry*, 21 (1), 43-49.
- Ramos-de-la-Peña, A. M. ve Renard, C. M. (2016). A review through recovery, purification and identification of genipin. *Phytochemistry Reviews*, 15 (1), 37-49.
- Renhe, I. R., Stringheta, P., Silva, F. F., ve Oliveira, T. V. (2009). Obtention of blue colorant from jenipapo fruit. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44 (6), 649-652.
- Samal, S., Dash, M., Chiellini, F., Wang, X., Chiellini, E., Declercq, H. A., ve diğer. (2014). Silk/chitosan biohybrid hydrogels and scaffolds via green technology. *RSC Advances*, 2014 (4), 53547-53556.

- Silva, S. S., Motta, A., Rodrigues, M. T., Pinheiro, A. F., Gomes, M. E., Mano, J. F. ve diğ. (2008). Novel genipin-cross-linked chitosan/silk fibroin sponges for cartilage engineering strategies. *Biomacromolecules*, 9 (10), 2764-2774.
- Sinnott, E. W. ve Bloch, R. (1943). Development of the fibrous net in the fruit of various races of *Luffa cylindrica*. *Botanical Gazette*, 105 (1), 90-99.
- Sionkowska, A. ve Planecka, A. (2013). Preparation and characterization of silk fibroin/chitosan composite sponges for tissue engineering. *Journal of Molecular Liquids*, 178, 5-14.
- Tanobe, V. O. Sydenstricker, T. H., Munaro, M., ve Sandro, C. A. (2005). A comprehensive characterization of chemically treated Brazilian sponge-gourds (*Luffa cylindrica*). *Polymer Testing*, 29 (4), 474-482.
- Temple, D. K., Cederlung, A. A., Lawless, B. M., Aspden, R. M., ve Espino, D. M. (2016). Viscoelastic properties of human and bovine articular cartilage; a comparison of frequency-dependent trends. *BMC Musculoskeletal Disorder*, 17 (1), 1-8.
- Tsai, T. H., Westly, J., Lee, T. F. ve Chen, C. F. (1994). Identification and determination of geniposide, genipin, gardenoside, and geniposidic acid from herbs by HPLC/photodiode-array detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 17 (10), 2199–2205.
- Ueda, S., Iwashashi, Y., Tokuda, H. (1991). Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell cultures. *Journal of Natural Products*, 54 (6), 1677-1680.

- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K. H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., ve diğer. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84 (2), 377-410.
- Williams, D. F. (2018). Biocompatibility pathways in tissue-engineering templates. *Engineering*, 4 (2), 286-290.
- Yan, L. P., Wang, Y. J., Ren, L., Wu, G., Caridade, S. G., Fan, J. B., ve diğer. (2010). Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95 (2), 465-475.
- Yang, L., Chu, J. S. ve Fix, J. A. (2002). Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 235 (1-2), 1-15.
- Zhang, Q., Yan, S. ve Li, M. (2009). Silk fibroin based porous materials. *Materials*, 2 (4), 2276-2295.
- Zhao, W., Jin, X., Cong, Y., Liu, Y. ve Fu, J. (2012). Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88 (3), 327-339.