

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEKANİK OLARAK DAYANIKLI TEK-, ÇİFT- VE ÜÇ-AĞYAPILI FİBROİN
KRİYOJELLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Berkant YETİŞKİN

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

ARALIK 2015

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEKANİK OLARAK DAYANIKLI TEK-, ÇİFT- VE ÜÇ-AĞYAPILI FİBROİN
KRİYOJELLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Berkant YETİŞKİN
(509131003)**

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oğuz OKAY

ARALIK 2015

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509131003 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Berkant YETİŞKİN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "MEKANİK OLARAK DAYANIKLI TEK-, ÇİFT- VE ÜÇ-AĞYAPILI FİBROİN KRİYOJELLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Oğuz OKAY**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Nermin ORAKDÖĞEN**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Suzan ABDURRAHMANOĞLU
Marmara Üniversitesi

Teslim Tarihi : **27 Kasım 2015**
Savunma Tarihi : **23 Aralık 2015**

Canum Aileme,

ÖNSÖZ

Öncelikle, yüksek lisans çalışmalarım için beni araştırma grubuna dahil eden ve İTÜ'deki eğitim-öğretim hayatım boyunca kendisinden çok şey öğrendiğim danışman hocam sayın Prof. Dr. Oğuz OKAY'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca, lisans eğitimim süresince kendisinden gerek ders alarak gerek son senemde bitirme ödevim için laboratuvarında çalışarak kendimi geliştirmemi sağlayan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Üyeleri'nden sayın Prof. Dr. Nurettin ŞAHİNER'e teşekkür etmek isterim.

Arş. Gör. Ümit GÜLYÜZ'e, Dr. Volkan CAN'a, Aslıhan ARGUN'a ve İTÜ'deki yüksek lisans çalışmalarım sırasında tanıma imkanı bulduğum, İstanbul'daki ailem gibi olan ve bana çalışmalarım sırasında yardımcı olan diğer tüm İTÜ Polimerik Jeller Araştırma Grubu çalışanlarına en içten bir şekilde teşekkürlerimi iletmek isterim.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında bursumu sağlayan TÜBİTAK'a ve kongrelere katılmam için maddi olarak destek sağlayan İTÜ'ye ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak, tüm hayatım boyunca sevgi ve sabırla bana maddi manevi her türlü imkanı sağlayan, sürekli yanımda olan anne ve babama teşekkür etmek isterim.

Aralık 2015

Berkant Yetişkin
(Kimyager)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
SEMBOLLER	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. TEORİK KISIM	5
2.1 Hidrojeller	5
2.2 İç İç Geçmiş Ağyapılı Polimerler (IPN) ve Çift-Ağyapılı (DN) Jeller	6
2.3 Makrogözenekli Jeller	8
2.4 Kriyojeller	8
2.5 İpek.....	10
2.5.1 Fibroin	11
2.5.2 Fibroindeki yapılaşma şekilleri	12
2.5.3 Fibroinin yapısında β -tabaka oluşumu ve jelleşme	15
2.5.4 Gözenekli fibroin iskeletleri.....	16
3. DENEYSEL KISIM.....	19
3.1 Kullanılan Kimyasallar	19
3.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	19
3.3 Deneyin Yapılışı.....	21
3.3.1 İpek böceği kozalarından fibroin çözeltilerinin hazırlanması.....	21
3.3.2 İpek fibroin kriyojellerinin sentezi.....	22
3.3.2.1 Tek-ağyapılı (SN) ipek fibroin kriyojellerinin sentezi.....	22
3.3.2.2 Çift-ağyapılı (DN) ipek fibroin kriyojellerinin sentezi	22
3.3.2.3 Üç-ağyapılı (TN) ipek fibroin kriyojellerinin sentezi	24
3.4 İpek Fibroin Kriyojellerinin Karakterizasyonu	25
3.4.1 Şişme testleri	25
3.4.2 Mekanik testler.....	26
3.4.3 Jellerin morfolojik özelliklerinin incelenmesi	29
3.4.4 ATR-FTIR ile fibroin yapısının aydınlatılması	29
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	31
4.1 Çift-Ağyapılı (DN) Fibroin Kriyojellerinin Özellikleri	32
4.1.1 Kriyojellerin suda ve fibroin çözeltilerinde şişmeleri.....	32
4.1.1.1 SN kriyojelinin farklı konsantrasyonlardaki fibroin çözeltilerinde	
şişmesi ve n_{21} değerlerinin hesaplanması.....	32
4.1.1.2 SN ve DN kriyojellerinin suda şişmeleri	33
4.1.2 Morfolojik özellikler	36
4.1.3 ATR-FTIR analizleri.....	38

4.1.4 Mekanik testler	41
4.1.4.1 Kuru durumdaki kriyojellerin karşılaştırılması	42
4.1.4.2 Şişmiş durumdaki kriyojellerin karşılaştırılması.....	44
4.1.4.3 Kuru durumdaki kriyojellerin şişmiş durumdaki kriyojellerle karşılaştırılması	46
4.2 İkinci Ağyapıdaki Çapraz Bağ Miktarının Çift-Ağyapılı Fibroin Kriyojellerinin Özelliklerine Etkisi	50
4.2.1 Kriyojellerin suda ve fibroin çözeltilerinde şişmeleri	51
4.2.1.1 SN kriyojelinin farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı içeren fibroin çözeltilerinde şişmesi ve n_{21} değerlerinin hesaplanması	51
4.2.1.2 DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin suda şişmeleri	51
4.2.2 Morfolojik özellikler	53
4.2.3 ATR-FTIR analizleri	54
4.2.4 Mekanik testler	56
4.2.4.1 Kuru durumdaki kriyojellerin karşılaştırılması	56
4.2.4.2 Şişmiş durumdaki kriyojellerin karşılaştırılması.....	58
4.2.4.3 Kuru durumdaki kriyojellerin şişmiş durumdaki kriyojellerle karşılaştırılması	60
4.3 Üç-Ağyapılı (TN) Fibroin Kriyojellerinin Özellikleri	62
4.3.1 Kriyojellerin suda ve fibroin çözeltilerinde şişmeleri	63
4.3.1.1 DN1 kriyojelinin fibroin çözeltisinde şişmesi ve $n_{32/1}$ değerinin hesaplanması	63
4.3.1.2 TN kriyojelinin sudaki şişmesi.....	63
4.3.2 Morfolojik özellikler	65
4.3.3 ATR-FTIR analizleri	67
4.3.4 Mekanik testler	68
4.3.4.1 Kuru durumdaki kriyojellerin karşılaştırılması	68
4.3.4.2 Şişmiş durumdaki kriyojellerin karşılaştırılması.....	70
4.3.4.3 Kuru durumdaki kriyojellerin şişmiş durumdaki kriyojellerle karşılaştırılması	71
5. SONUÇLAR	75
KAYNAKLAR.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	83

KISALTMALAR

İF	: İpek Fibroin
SN	: Tekli Ağyapı
DN	: Çift Ağyapı
TN	: Üçlü Ağyapı
IVD	: İntervertebral Disk
NP	: Nükleus Pulposus
AF	: Annulus Fibrosus
IPN	: İç İç Geçmiş Ağyapılı Polimerler
BDDE	: 1,4-bütandiol diglisidil eter
EGDE	: Etilen glikol diglisidil eter
TEMED	: <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamin
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
ATR-FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
PEG	: Polietilen glikol
Cys	: Sistein
DNA	: Deoksiribonükleik asit

SEMBOLLER

n_{21}	: İkinci ağyapının birinci ağyapıya molar oranı
$n_{32/1}$	: İkinci ve üçüncü ağyapının birinci ağyapıya molar oranı
m_{rel}	: Kütlece bağıl şişme oranı
v_{rel}	: Hacimce bağıl şişme oranı
q_w	: Kütlece şişme oranı
q_v	: Hacimce şişme oranı
P	: Gözeneklilik
w_g	: Jel kesri
σ_{nom}	: Nominal gerilim
$\sigma_{gerçek}$	: Gerçek gerilim
$\sigma_{parçalanma}$	: Parçalanma gerilimi
σ_{comp}	: Basınç dayanımı
σ_{plato}	: Plato gerilimi
E	: Young modülü
λ	: Deformasyon oranı
F	: Malzemeye uygulanan kuvvet
A	: Malzemenin herhangi bir deformasyon anındaki kesit alanı
A_0	: Malzemenin başlangıç kesit alanı
D	: Başlangıç anındaki çap
L	: Malzemenin herhangi bir deformasyon anındaki boyu
L_0	: Başlangıç anındaki boy
C_{IF}	: İpek fibroin konsantrasyonu
ρ	: İpek fibroinin yoğunluğu
m_0	: Jelin sentez sonrası ağırlığı
D_0	: Jelin sentez sonrası çapı
$m_{şişmiş}$	: Şişmiş durumdaki jelin ağırlığı
$D_{şişmiş}$	: Şişmiş durumdaki jelin çapı
m_{kuru}	: Kuru durumdaki jelin ağırlığı
D_{kuru}	: Kuru durumdaki jelin çapı
q_{wSN}	: Tek-ağyapılı fibroin kriyojelinin kütlece şişme oranı
q_{wDN}	: Çift-ağyapılı fibroin kriyojelinin kütlece şişme oranı
$m_{DNşişmiş}$	: Şişmiş durumdaki çift-ağyapılı jelin ağırlığı
m_{DNkuru}	: Kuru durumdaki çift-ağyapılı jelin ağırlığı
m_{SNkuru}	: Kuru durumdaki tek-ağyapılı jelin ağırlığı

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : İpeğin bileşimi.....	11
Çizelge 2.2 : Fibroin proteinindeki aminoasit yüzdeleri	12
Çizelge 3.1 : DN kriyojellerinin sentez şartları	23
Çizelge 3.2 : DN4 kriyojellerinin sentez şartları	24
Çizelge 3.3 : TN kriyojellerinin sentez şartları.....	25
Çizelge 4.1 : SN kriyojelinin farklı konsantrasyonlarda fibroin çözeltilerindeki şişmesi	33
Çizelge 4.2 : SN ve DN kriyojellerinin sudaki şişmeleri.....	34
Çizelge 4.3 : SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin gözenek boyutları	38
Çizelge 4.4 : Kuru durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin mekanik test sonuçları.....	43
Çizelge 4.5 : Şişmiş durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin mekanik test sonuçları	45
Çizelge 4.6 : SN kriyojelinin farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı içeren fibroin çözeltilerindeki şişmesi	51
Çizelge 4.7 : DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin sudaki şişmeleri	51
Çizelge 4.8 : DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin gözenek boyutları	54
Çizelge 4.9 : Kuru durumdaki DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin mekanik test sonuçları.....	58
Çizelge 4.10 : Şişmiş durumdaki DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin mekanik test sonuçları.....	60
Çizelge 4.11 : SN, DN1 ve TN kriyojellerinin sudaki şişmeleri	63
Çizelge 4.12 : SN, DN1 ve TN kriyojellerinin gözenek boyutları	66
Çizelge 4.13 : Kuru durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojellerinin mekanik test sonuçları	70
Çizelge 4.14 : Şişmiş durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojellerinin mekanik test sonuçları	71

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Polimerik jellerin yapısı.	5
Şekil 2.2 : Çift-ağyapılı jellerin sentezi.	7
Şekil 2.3 : α -heliks yapısının şematik gösterimi.	13
Şekil 2.4 : Paralel ve antiparalel β -tabaka yapıları.	14
Şekil 2.5 : β -döngü yapısı.	14
Şekil 2.6 : Epoksi gruplarıyla amino grupları arasında gerçekleşen reaksiyon.	16
Şekil 3.1 : Jel sentezinde kullanılan kimyasalların yapısı.	19
Şekil 3.2 : Fibroin kriyojelleri için tipik gerilim-gerinim grafikleri.	27
Şekil 3.3 : Fibroin kriyojelleri için tipik λ - $\sigma_{gerçek}$ grafiği.	28
Şekil 3.4 : Fibroin kriyojelleri için tipik λ - $\sigma_{gerçek}$ ve λ - σ_{nom} eğrileri.	29
Şekil 4.1 : q_w (●), q_v (●) ve % P (●) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi	34
Şekil 4.2 : m_{rel} (●) ve v_{rel} (○) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi.	35
Şekil 4.3 : Jel kesri (w_g) değerinin n_{21} oranı ile değişimi	36
Şekil 4.4 : SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin SEM görüntüleri.	37
Şekil 4.5 : Jelleşme öncesi ipek fibroinin ve jelleşme sonrası SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin ATR-FTIR spektrumları.	39
Şekil 4.6 : SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin ATR-FTIR spektrumlarına PeakFit yazılımıyla Gauss modelinin uygulanmasıyla elde edilen eğriler.	40
Şekil 4.7 : Rastgele yumak (●), β -tabaka (●), β -döngü (●) ve α -sarmal yapı (●) yüzdelерinin n_{21} oranıyla değişimi.	41
Şekil 4.8 : Kuru durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin mekanik testleri sonucunda elde edilen λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri.	42
Şekil 4.9 : Kuru durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojelleri için parçalanma gerilimlerinin ($\sigma_{parçalanma}$) belirlendiği grafikler.	43
Şekil 4.10 : Şişmiş durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin mekanik testleri sonucunda elde edilen λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri.	45
Şekil 4.11 : Şişmiş durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojelleri için parçalanma gerilimlerinin ($\sigma_{parçalanma}$) belirlendiği grafikler	46
Şekil 4.12 : Kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin mekanik özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla çizilen λ - σ_{nom} eğrileri	47
Şekil 4.13 : Kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin mekanik özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla çizilen λ - $\sigma_{gerçek}$ eğrileri.	48
Şekil 4.14 : Kriyojellerin Young modülleri (E) ve parçalanma gerilimleri ($\sigma_{parçalanma}$) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi.	49
Şekil 4.15 : Kriyojellerin basınç dayanımı (σ_{comp}) ve plato gerilimi (σ_{plato}) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi.	49
Şekil 4.16 : q_w (●), q_v (●) ve % P (●) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi.	52
Şekil 4.17 : m_{rel} (●), v_{rel} (○) ve w_g (●) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi.	52

Şekil 4.18 : DN4, DN4' ve DN4" kriyojellerinin SEM görüntüleri.	53
Şekil 4.19 : Jelleşme öncesi ipek fibroinin ve jelleşme sonrası DN4, DN4' ve DN4" kriyojellerinin ATR-FTIR spektrumları.....	55
Şekil 4.20 : DN4, DN4' ve DN4" kriyojellerinin ATR-FTIR spektrumlarına PeakFit yazılımıyla Gauss modelinin uygulanmasıyla elde edilen eğriler.	55
Şekil 4.21 : Rastgele yumak (●), β -tabaka (●), β -döngü (●) ve α -sarmal yapı (●) yüzdelерinin n_{21} oranıyla değişimi.	56
Şekil 4.22 : Kuru durumdaki DN4, DN4' ve DN4" kriyojellerinin mekanik testleri sonucunda elde edilen λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri	57
Şekil 4.23 : Kuru durumdaki DN4, DN4' ve DN4" kriyojelleri için parçalanma gerilimlerinin ($\sigma_{parçalanma}$) belirlendiği grafikler.	57
Şekil 4.24 : Şişmiş durumdaki DN4, DN4' ve DN4" kriyojellerinin mekanik testleri sonucunda elde edilen λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri.	59
Şekil 4.25 : Şişmiş durumdaki DN4, DN4' ve DN4" kriyojelleri için parçalanma gerilimlerinin ($\sigma_{parçalanma}$) belirlendiği grafikler.	59
Şekil 4.26 : Kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki DN4, DN4' ve DN4" kriyojellerinin mekanik özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla çizilen λ - σ_{nom} eğrileri.	60
Şekil 4.27 : Kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki DN4, DN4' ve DN4" kriyojellerinin mekanik özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla çizilen λ - $\sigma_{gerçek}$ eğrileri.....	61
Şekil 4.28 : Kriyojellerin Young modülleri (E) ve parçalanma gerilimleri ($\sigma_{parçalanma}$) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi	61
Şekil 4.29 : Kriyojellerin basınç dayanımı (σ_{comp}) ve plato gerilimi (σ_{plato}) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi.....	62
Şekil 4.30 : SN, DN1 ve TN kriyojelleri için çizilen q_w (●), q_v (●) ve % P (●) grafiği	64
Şekil 4.31 : SN, DN1 ve TN kriyojelleri için çizilen m_{rel} (●), v_{rel} (○) ve w_g (●) grafiği	65
Şekil 4.32 : SN, DN1 ve TN kriyojellerinin SEM görüntüleri	66
Şekil 4.33 : Jelleşme öncesi ipek fibroinin ve jelleşme sonrası SN, DN1 ve TN kriyojellerinin ATR-FTIR spektrumları.....	67
Şekil 4.34 : SN, DN1 ve TN kriyojellerinin ATR-FTIR spektrumlarına PeakFit yazılımıyla Gauss modelinin uygulanmasıyla elde edilen eğriler.....	67
Şekil 4.35 : SN, DN1 ve TN fibroin kriyojellerindeki rastgele yumak (●), β -tabaka (●), β -döngü (●) ve α -sarmal yapı (●) yüzdeleri	68
Şekil 4.36 : Kuru durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojellerinin mekanik testleri sonucunda elde edilen λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri.....	69
Şekil 4.37 : Kuru durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojelleri için parçalanma gerilimlerinin ($\sigma_{parçalanma}$) belirlendiği grafikler	69
Şekil 4.38 : Şişmiş durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojellerinin mekanik testleri sonucunda elde edilen λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri.....	70
Şekil 4.39 : Şişmiş durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojelleri için parçalanma gerilimlerinin ($\sigma_{parçalanma}$) belirlendiği grafikler	71
Şekil 4.40 : Kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojellerinin mekanik özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla çizilen λ - σ_{nom} eğrileri.....	72

Şekil 4.41 : Kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojellerinin mekanik özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla çizilen λ - $\sigma_{gerçek}$ eğrileri	72
Şekil 4.42 : SN, DN1 ve TN kriyojelleri için çizilen Young modül (E) ve parçalanma gerilimi ($\sigma_{parçalanma}$) grafikleri	73
Şekil 4.43 : SN, DN1 ve TN kriyojelleri için çizilen basınç dayanımı (σ_{comp}) ve plato gerilimi (σ_{plato}) grafikleri	73

MEKANİK OLARAK DAYANIKLI TEK-, ÇİFT- VE ÜÇ-AĞYAPILI FİBROİN KRİYOJELLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Doku mühendisliği, mühendislik ve doğa bilimlerinin prensiplerini kullanarak organ geliştirmeyi, bir dokunun işlevini arttırmayı ya da iyileştirmeyi amaçlayan bir bilim dalıdır. Doku mühendisliği disiplinlerarası bir dal olup sadece biyoloji ve medikal alanlarla ilgili değil; aynı zamanda kimya, kimya mühendisliği, biyomühendislik ve malzeme bilimleri gibi bilim dallarıyla da yakından ilişkilidir. Doku mühendisliği, klasik yöntemlerle tedavi edilemeyen hastalarda hasarlı dokuların yenilenmesi ve iyileştirilmesi için oldukça önemlidir. Doku mühendisliğinin en önemli uğraş alanlarından bir tanesi, hücrelerin biyolojik dokuyu oluşturabileceği, büyüyüp farklılaşabileceği, geçici bir kalıp görevi gören iskelet malzemeler geliştirmektir. Bu malzemeler, biyoyumlu ve biyobozunur olmalı, gözenekli bir üç boyut mimarisine sahip olmalı ve aynı zamanda geliştirilecek dokuya uygun mekanik özelliklere sahip olmalıdır.

Doğal malzemeler, biyolojik yapılarından dolayı biyoyumluluğu ve hücrelerle etkileşimi daha iyi olduğundan doku mühendisliğinde biyomalzeme olarak kullanılabilirler. Buna en uygun örneklerden bir tanesi ipektir. İpek, ipek böceği ve bazı örümcek türleri tarafından epitel hücreler içinde sentezlenen bir biyopolimerdir. İpeğin yapısında büyük oranda fibroin bulunmaktadır. Fibroin, ağırlıklı olarak glisin ve alanin aminoasitlerinden oluşan, büyük hidrofobik bloklar ve bu blokların arasında ve zincir uçlarındaki hidrofilik bloklardan oluşan bir kopolimerdir. Hidrofobik kısımlar arası asosiyasyonlar fibroinin rastgele yumak yapısından β -tabaka yapısına geçmesine neden olur. Fibroinin jelleşmesinin temeli de hidrofobik kısımlar arasında meydana gelen bu β -tabaka yapılarıdır. β -tabakalar malzemeye dayanıklılık ve sertlik kazandırır. Diğer yandan hidrofilik kısımlar ise suda çözünmeyi sağlar. Ayrıca tokluğu ve elastisiteyi artırır. Fibroin ipekteki yapısal proteindir ve serisin adı verilen başka bir protein ile kaplıdır. Serisin, ipeği işleme sürecinde yumuşak ve parlak bir yapı elde etmek için yüksek alkali çözeltilerde uzaklaştırılır. Fibroin ve serisinin dışında ipeğin yapısında waks, karbonhidratlar, inorganik maddeler ve pigmentler bulunur. İpek lifleri, çok iyi tokluk ve sertlik özelliklerinin yanında düşük yoğunluk ve kendine özgü çekme dayanımı, biyoyumluluğu, biyobozunurluğu ve kolay işlenebilir olmasından dolayı malzeme bilimlerinde öne çıkan doğal polimerlerden biri haline gelmiştir.

Fibroinin jelleşmesi, diğer proteinlere kıyasla yavaş gerçekleşen bir süreçtir. Araştırma grubumuz tarafından geliştirilen bir yöntemle bu süreç hızlandırılmıştır. Fibroin çözeltilerine diepoksitlerin ilave edilmesiyle kısa sürede jelleşmenin meydana geldiği gözlenmiştir. Diepoksit molekülleri yardımıyla fibroin zincirlerindeki hidrofilik gruplar birbirine bağlanır. Bunun sonucunda fibroin molekülünün hareketliliğinin azalmasıyla birlikte hidrofobik kısımlar arasında β -tabakaların oluşması kolaylaşır. Böylece, kısa sürede fibroinin jelleşmesi gerçekleşmiş olur.

Biyolojik dokulara benzerlikleri nedeniyle doku mühendisliğinde iskelet malzeme olarak kullanılabilecek en uygun malzemelerden birisi hidrojellerdir. Hidrojeller, hidrofilik polimer ağyapısıyla bu ağyapı içindeki çözücünden (su veya sulu çözelti) oluşan iki fazlı, üç boyutlu bir polimerik malzemedir. Klasik hidrojellerin pratik uygulamalarını kısıtlayan iki dezavantajı vardır. Bunlardan birisi hidrojellerin hacim değişiminin yavaş olması; ya da diğer bir değişle uyarılara hızlı cevap verememesi; diğeri ise mekanik olarak dayanıksız olmalarıdır. Hidrojellerin uyarılara hızlı cevap verebilmesi için jel boyutlarının küçültülmesi, jel yüzeyine doğrusal zincirlerin bağlanması ve makrogözenekli jellerin tasarımı; mekanik özelliklerinin iyileştirilmesi içinse çift-ağyapılı jeller, topolojik jeller, nanokompozit jeller ve kriyojeller gibi teknikler geliştirilmiştir.

Kriyojelleşme prosesinde, reaksiyon çözeltisi donma noktası altındaki bir sıcaklığa getirilerek dondurulur ve reaksiyonlar donmuş reaksiyon sisteminin donmamış mikrobölgelerinde ilerler. Reaksiyonlar donma noktası altında gerçekleştiğinden dolayı ortamdaki buz kristalleri kalıp görevi yapar ve birbirine bağlı gözenekleri olan bir yapı oluşur. Reaksiyonların reaktif konsantrasyonunun yüksek olduğu donmamış mikrobölgelerde ilerlemesinden dolayı, oluşan gözenek duvarlarındaki polimer konsantrasyonu fazla olmakta ve böylece malzemenin mekanik özellikleri klasik hidrojelere göre daha iyi olmaktadır.

Çift-ağyapılı jel sentez tekniğinde ise sentezlenen ilk ağyapı, içinde monomer bulunan başka bir çözelti içinde şişirilir ve ilk ağyapının içine bu çözeltinin dolması sağlanır. Ardından yeniden polimerizasyon işlemiyle çift-ağyapılı jel üretilmiş olur. İç içe geçmiş ağyapılardan oluşan çift-ağyapılı jellerde, malzemeye uygulanan kuvvetin ikinci ağyapı tarafından dağıtılmasıyla üstün mekanik özellikler elde edilebilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, doku mühendisliğinde kullanıma uygun makrogözenekli, mekanik olarak dayanıklı, biyouyumlu ve biyobozunur polimerik iskeletler üretmektir. Bu amaçla, *Bombyx Mori* ipek böceği kozasından elde edilen fibroinin sulu çözeltisinden, *N,N,N',N'*-tetrametiletilediamin (TEMED) katalizörü ve 1,4-bütandiol diglisidil eter (BDDE) çapraz bağlayıcısı varlığında -18 °C'de fibroin kriyojelleri üretilmiştir. Bu yöntemle geçtiğimiz yıllarda araştırma grubumuz tarafından literatürde ilk kez fibroinin kriyojelleşmesiyle tek-ağyapılı fibroin kriyojelleri elde edilmişti. Bu tez çalışmasında ise; tek-ağyapılı fibroin kriyojelinden yola çıkarak mekanik dayanımı arttırmak amacıyla çift-ağyapılı ve üç-ağyapılı fibroin kriyojelleri üretilmiştir. Sentezlenen tek-ağyapılı fibroin kriyojelleri, farklı fibroin konsantrasyonlarındaki çözeltilerde şişirilip kriyojelleştirilerek ikinci ağyapıda farklı konsantrasyonlarda fibroin içeren çift-ağyapılı fibroin kriyojelleri üretilmiştir. Aynı şekilde, çift-ağyapılı fibroin kriyojeli de belli bir konsantrasyonda fibroin içeren bir çözeltide şişirilip kriyojelleştirilmesiyle üç-ağyapılı fibroin kriyojeli elde edilmiştir. Bu çalışmada, mekanik olarak dayanıklı hidrojel elde etme yöntemlerinden olan çift-ağyapılı jel yöntemiyle kriyojelasyon yöntemi ilk kez birleştirilerek üstün mekanik özelliklere sahip makrogözenekli fibroin iskeletleri üretilmiştir. Elde edilen tüm kriyojellerin şişme davranışları, taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile morfolojik özellikleri, Zwick-Roell ve Devotrans Mekanik Test Cihazları ile mekanik davranışları incelenmiş ve ATR- FTIR spektrumları ile de fibroin yapısı aydınlatılmıştır.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF MECHANICALLY DURABLE SINGLE-, DOUBLE- AND TRIPLE-NETWORK FIBROIN CRYOGELS

SUMMARY

Tissue engineering is a branch of science aiming to develop a whole organ, improve or recover the functions of a tissue using principles of engineering and life sciences. Tissue engineering is an interdisciplinary field and it is related to not only biology and medical sciences but also chemistry, chemical engineering, bioengineering and material sciences. Tissue engineering is feasible for patients who can't be cured with conventional methods. In tissue engineering concept, it is important to develop scaffold materials acting as a temporary 3D environment where cells can produce new biological tissue. Scaffolds provide cell organization, growth and differentiation. A scaffold must be biocompatible and biodegradable; also it must have 3D morphology and suitable mechanical properties.

A scaffold can be produced from different types of materials such as natural and synthetic polymers and inorganic substances. Natural materials can be more suitable than the others because of their biocompatibility and biological structure which provide better interaction with cells. For instance, silk is an important natural polymer for tissue engineering applications owing to its good biocompatibility, biodegradability, high strength and toughness. Silk is a biopolymer which is synthesized in epithelial cells by silkworms such as *Bombyx Mori* and some spiders such as *Nephila Calavipes* and *Araneus Diadematus*. There are two important proteins in silk; namely, fibroin and sericin. Except fibroin and sericin, silk also contains carbohydrates, wax, inorganic substances and pigments. Fibroin is structural protein in silk and it is covered by sericin. Sericin can be removed from fibroin during silk manufacturing process to make silk soft and lustrous.

Fibroin is the main component in silk and it consists of hydrophilic and hydrophobic blocks. Hydrophilic blocks provide solubility in water and are responsible for fibroin elasticity and toughness. On the other hand, hydrophobic blocks form intermolecular structures, which is called β -sheet, leading to insolubility and high strength of fibroin. β -sheet structures are also responsible for fibroin gelation process. Normally, gelation of fibroin occurs slowly by comparison other proteins. By introducing a new technique developed in our research group, we were able to accelerate the gelation process of fibroin significantly. This technique involves the addition of diepoxide molecules such as 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE) as a chemical cross-linker in aqueous fibroin solution, which induce gelation of fibroin in a short period of time. With BDDE, hydrophilic blocks of fibroin link with each other so that the mobility of the fibroin chains decreases and β -sheet structure forms between hydrophobic blocks, finally fibroin gel forms. BDDE contains epoxide groups on both ends that can react with nucleophiles like hydroxyls, amino groups and sulfhydryls. BDDE has been widely used for cross-linking of DNA, proteins, polysaccharides and organic molecules.

Seeking artificial soft biomaterials for tissue engineering has been a challenging task for scientists and engineers. If we consider the structure of biological tissue in an organism, hydrogels are one of the best candidates as scaffold material because of their tissue-like structure. Hydrogels are soft and wet materials that are composed of a 3D polymer network structure and a large amount of water inside the network as solvent. The polymer network serves as a matrix to hold the solvent together, while the solvent inside the polymer network allows free diffusion of some solute molecules.

Although hydrogels have potential applications in many fields such as tissue engineering, drug delivery system and superabsorbents; they have some inadequacies. Firstly, traditional hydrogels have a slow response rate to the external stimuli. To increase the response rate of hydrogels, several techniques have been developed including decrease of the gel dimensions (microgel preparation), attachment of dangling chains on the gel surfaces and preparation of macroporous gels. Secondly, they have poor mechanical properties. Traditional hydrogels are usually composed of a single polymer network which causes hydrogels to have a weak and brittle structure. There are also several techniques such as double-network gels, topological gels, nanocomposite gels and cryogels, which have been developed to enhance mechanical properties of hydrogels.

The cryogelation technique allows preparation of gels possessing a macroporous structure and exhibiting good mechanical performances. By cryogelation, polymerization is conducted in apparently frozen reaction solutions. The reaction solution containing gel-forming agents is frozen at a temperature a few degrees centigrade below the crystallization point of solvent. In this frozen system, there are unfrozen liquid microphases along with the crystals of the frozen solvent. Gel-forming agents are concentrated in unfrozen liquid microphase (cryoconcentration). Cross-linking reactions occur in this phase and in the meantime, crystals of solvent combine with each other and after melting, crystals leave large interconnected pores. Because of cryoconcentration, cryogels become mechanically stronger than traditional hydrogels.

Double-network (DN) technique provides a way to fabricate hydrogels with high toughness. DN gels possess interpenetrating polymer network (IPN) structure which are cross-linked polymer networks in which at least one network is synthesized and/or cross-linked in the presence of the other. First of all, the first network is prepared and then the first network is immersed in another reaction mixture until equilibrium. By polymerizing the second component, DN gel is formed. DN gels are comprised of two independently cross-linked networks that are physically entangled with each other. That means, there is no other interaction between the two polymer networks. There are two important parameters about DN technique. The first one is n_{21} ratio, which is molar ratio of second network to the first network units and the second one is the amount of cross-linker of the second network. DN gels usually become mechanically stronger with increasing n_{21} ratio and/or decreasing amount of the second network cross-linker.

The aim of this study is the preparation of macroporous, biodegradable, biocompatible and mechanically strong and durable polymeric scaffolds useful for tissue engineering applications. For this purpose, we prepared single-network (SN), double-network (DN) and triple-network (TN) silk fibroin (SF) scaffolds from aqueous solutions of silk fibroin which is obtained from *Bombyx Mori* silkworm cocoons. 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE) and N, N, N', N' -

tetramethylethylenediamine (TEMED) were used as a chemical cross-linker and pH tuner/catalyst respectively, during the cryogelation reactions at -18 °C. Fibroin cryogels were characterized by swelling tests, ATR-FTIR and SEM measurements, as well as by mechanical tests conducted on Zwick Roell and Devotrans mechanical testing machines.

Firstly, we produced SN fibroin cryogels in the presence of BDDE and TEMED. The gels were prepared according to the following scheme: Aqueous fibroin solution of 4,2 % concentration was mixed with BDDE (20 mmol epoxy/g fibroin) and TEMED (0,25 v/v %). Then, the homogeneous reaction mixture was transferred into plastic syringes of 4 mm internal diameters and 1 ml volume, and they were placed in a freezer at -18 °C for 24 h. Finally, SN fibroin cryogels were obtained after the 24 h of cryogelation process. The SN cryogel scaffolds formed at a temperature $T_{prep} = -18$ °C and fibroin concentration $C_{sf} = 4,2$ % exhibit a compressive modulus E of 7 ± 1 MPa with a compressive nominal stress σ_{comp} of $0,16 \pm 0,03$ MPa and fracture stress σ_{fract} of 15 ± 3 MPa in dry state. To enhance further the mechanical performance of SN gels, DN and TN gels were prepared.

DN gels were fabricated by swelling freeze-dried SN hydrogels in fibroin solutions of various concentrations between 7,2 and 28,6 w/v %, containing BDDE and TEMED. Amount of TEMED was fixed at 0,25 v/v % while the amount of BDDE was decreased from 20 to 1,5 mmol/g with increasing silk fibroin concentration to prevent sudden gelation of fibroin. DN fibroin scaffolds thus produced possess compressive modulus E of 58 ± 15 MPa with a compressive nominal stress σ_{comp} of $2,8 \pm 0,8$ MPa and fracture stress σ_{fract} of 240 ± 24 MPa in dry state.

To investigate the effect of the amount of BDDE in the second network solution, DN fibroin cryogels were prepared in 28,6 % fibroin solution containing BDDE at three different amounts, namely 0,375, 0,75 and 1,5 mmol/g. Results showed that porous fibroin scaffolds become mechanically stronger as the amount of BDDE in the second network solution is increased.

TN fibroin cryogels were prepared from a DN cryogel possessing fibroin concentrations of 4,2 % and 7,2 % in its first and second networks, denoted as 4,2-7,2 % DN. 4,2- 7,2 % DN cryogel sample was first immersed in an aqueous solution containing fibroin (20 %), BDDE and TEMED. After equilibrium swelling, the system was transferred into a plastic syringe of 5 ml in volume and it was placed in freezer at -18 °C for 24 h. After the cryogelation process, obtained TN scaffolds were mechanically stronger than the corresponding 4,2-7,2 % DN and 4,2 % SN fibroin scaffolds. TN gels exhibit a compressive modulus E of 48 ± 11 MPa with a compressive nominal stress σ_{comp} of $1,5 \pm 0,7$ MPa and fracture stress σ_{fract} of 190 ± 12 MPa while 4,2- 7,2 % DN gels exhibit $11,2 \pm 0,1$ MPa, $0,24 \pm 0,05$ MPa and 28 ± 5 MPa respectively.

The reaction between fibroin and BDDE was assessed by the ATR-FTIR spectra of freeze-dried fibroin scaffolds. With gelation, in addition to a shift of the Amide I absorption band to lower wavenumbers, new band at 1040- 1100 cm^{-1} appear which were assigned to the ether stretching bands of BDDE. Before gelation, ATR- FTIR spectrum of fibroin was characterized by a peak at 1640 cm^{-1} indicating the presence of primarily random coil and/or α -helix conformations. After cryogelation, all samples display a main peak at 1620 cm^{-1} which was assigned to β -sheet conformation and except the main peak, shoulders at 1660 and 1698 cm^{-1} appeared which can be assigned to α -helix and β -turn conformations, respectively. To estimate

the conformation of the fibroin chains, separation of Amide I band was carried out after base line correction by selecting a Gaussian model for curve fitting. The peak positions were fixed at 1620, 1640, 1660 and 1698 cm^{-1} , representing β -sheet, random coil, α -helix and β -turn conformations, respectively. Before gelation fibroin chains have 12 ± 2 % β -sheet structures, while after gelation SN fibroin cryogels, for instance, have 28 ± 1 % β -sheet structures.

Pore structures of fibroin scaffolds were assessed by the SEM images. It was found that the average pore size decreases with increasing fibroin or BDDE concentration. For instance, the pore size of SN fibroin cryogels is 33 ± 7 μm while that of TN fibroin cryogels is 6 ± 3 μm . These results show that the pore size of the cryogel scaffolds can be regulated depending on the cryogelation conditions, which is very important feature for this kind of scaffold materials in their tissue engineering applications.

Swelling behavior of cryogels in water was also investigated. The volume swelling ratio of fibroin scaffolds was found to be close to unity, independent on the concentrations of fibroin and BDDE at the gel preparation. However, the weight swelling ratio was much larger than the unity and dependent on the concentrations of fibroin and BDDE. The porosity of the scaffolds estimated from the difference between weight and volume swelling ratios was found to be 95 % for SN cryogels. For DN and TN cryogels, porosity decreased to 75 % and 79 %, respectively.

In concluding, we combined two different techniques, namely cryogelation and double-network techniques for the first time to obtain mechanically strong fibroin scaffolds. By simultaneous application of these two technique, we were able to enhance the mechanical performance of traditional single-network fibroin scaffolds. Fibroin scaffolds reported in this thesis exhibit larger moduli and mechanical strenght as compared to those reported in the literature, thus making them a good candidate as bone scaffold materials.

1. GİRİŞ

İpek, değişik örümcek türleri ve ipek böceği tarafından epitel hücreler içinde sentezlenen bir biyopolimerdir [1]. Tarihin en değerli malzemelerinden biri olan ipeğin kullanım alanı oldukça geniştir. Eskiden en çok tekstil malzemesi olarak kullanılan ipek, günümüzde hücre kültürü, ilaç salınımı ve enzim immobilizasyonu gibi amaçlarla kullanılabilmektedir [2,3]. İpeğin bir diğer önemli kullanım alanı ise biyomalzeme olarak doku mühendisliğidir. İpeğin iyi mekanik dayanım ve işleme kolaylığı, biyouyumluluk, sitotoksik olmaması ve düşük antijeniklik, farklı morfolojik formlarda kontrol edilebilir gözeneklilik, kontrol edilebilir bozunma hızı ve su ile oksijen geçirgenliği gibi özellikleri ipeğin bu alanda öne çıkan malzemelerden birisi olmasını sağlamıştır [4-6].

İpeğin doku mühendisliğindeki uygulama alanlarından bir tanesine örnek olarak intervertebral diskin (IVD) rejenerasyonu verilebilir. Günümüzde nüfusun büyük çoğunluğunda bel ağrısı görülmektedir. Bunun en büyük sebebi yaşlanma, biyolojik ve genetik faktörler gibi sebeplerden dolayı IVD dejenerasyonudur. IVD omurlar arasında bulunan, nükleus pulposus (NP), NP'ye göre daha sert yapıda olan ve NP'nin dışında bulunan annulus fibrosus (AF) ve kıkırdak uç tabakadan oluşan bir yapıdır [7-9]. IVD rejenerasyonu, doku mühendisliği sayesinde üretilecek iskelet malzemeler yardımıyla gerçekleştirilebilir. İpeğin IVD doku mühendisliğinde kullanımına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmış ve yapılmaya da devam etmektedir [8,9]. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar, ipeğin IVD doku mühendisliği için uygun bir malzeme olduğunu göstermektedir.

Doku mühendisliği Langer ve Vacanti tarafından “mühendislik ve doğa bilimlerinin prensipleriyle tam bir organ geliştirmek ya da bir dokunun işlevini arttırmak, iyileştirmek ve kalıcı hale getirmek” şeklinde tanımlanmıştır [10]. Doku mühendisliği disiplinler arası bir dal olup sadece biyolojik ve medikal alanların uzmanlığı değildir; kimya, biyomühendislik ve malzeme bilimi gibi dallarla da doğrudan ilişkilidir. Doku mühendisliğinde kullanıma yönelik iskelet malzeme üretimi kimya bilimini yakından ilgilendirmektedir. Bu iskelet malzemeler, o dokuya

özgü bir mekanik dayanıma ve hücrelerin büyüyüp farklılaşabilmesi için uygun bir gözenekli yapıya sahip olmalıdır. Ayrıca bu malzemeler biyouyumlu olmalı ve hücreler büyüyüp dokuyu oluşturduğunda bozunup parçalanmalıdır; yani biyobozunur olmalıdır [11].

Vücuttaki biyolojik dokular yumuşak ve ıslak yapıdadırlar [12]. Bu yumuşak dokulara yapısal olarak en çok benzeyen sentetik malzemelerden birisi hidrojellerdir. Hidrojeller, biyolojik dokulara benzerlikleri sebebiyle doku mühendisliğinde ve daha bir çok alanda kullanılabilir. Hidrojeller hidrofilik polimer ağyapı ve bu ağyapı içinde çözücü olarak su veya sulu çözelti içeren sistemler olarak tanımlanabilir [13,14]. Başka bir deyişle, hidrojeller çözücü olarak su içeren polimerik jellerdir.

Mekanik dayanıklılık kemik doku mühendisliğinde kullanılacak iskelet malzeme için en önemli parametrelerden biridir. Kemik doku mühendisliği için bir çok polimerik malzemenin denenmesine rağmen; biyouyumluluk, biyobozunurluk, gözeneklilik ve mekanik dayanım gibi şartların optimum bir kombinasyonunun gerekliliği çoğu malzemenin kullanımını sınırlamaktadır [15-17]. Biyolojik dokulara benzerliğinden dolayı doku mühendisliğinde kullanıma uygun olan hidrojellerin mekanik olarak zayıf olmaları, onların bu alandaki kullanımını kısıtlamaktadır. Hidrojellerin mekanik dayanımını arttırmak için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklerin başında çift-ağyapılı jeller, topolojik jeller, nanokompozit jeller ve kriyojeller gelmektedir.

Topolojik jeller, fiziksel ve kimyasal olarak çapraz bağlı jellerden farklı olarak, “8” şeklinde birbirinin içine geçmiş çapraz bağlar içeren jellerdir. Topolojik jellerde, sekiz şeklindeki çapraz bağlar polimer zincirleri üzerinde makara gibi kayarak hareket edebildiğinden, malzemeye uygulanan kuvvet denegelenabilir ve malzemenin mekanik dayanımı arttırılmış olur. Bu hareketli çapraz bağlar sayesinde topolojik jeller yüksek miktarda suyu emebilir ve kırılmadan esnetilebilir [18]. Polimer zincirlerinin, kimyasal bir çapraz bağlayıcı yerine kil nanotanecikleri gibi fiziksel bir çapraz bağlayıcıyla bağlanmasıyla oluşan jeller nanokompozit jellerdir. Nanokompozit jellerin, kısa polimer zincirleri ve bu zincirlerin birbirine kil ile çapraz bağlanmasıyla oluşan organik-inorganik ağyapısı sayesinde mekanik dayanımı yüksek olmaktadır [19]. İç içe geçmiş ağyapılardan oluşan çift-ağyapılı

jellerde ise ikinci ağyapı tarafından jel içinde etkili bir enerji dağılım mekanizması yaratılır. Bu da malzemenin mekanik özelliklerinde iyileşmeyi sağlar [20].

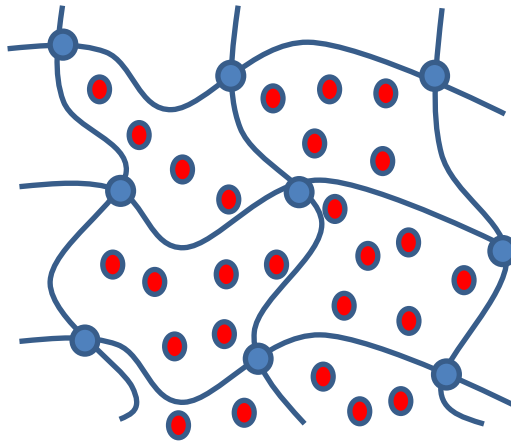
Hidrojellerin uyarılara hızlı cevap verebilmesi için makrogözenekli jeller üretilmektedir [21]. Kriyojelasyon tekniği, hem makrogözenekli hem de mekanik olarak dayanıklı jellerin sentezinde öne çıkan önemli bir tekniktir. Çözücünün donma noktası altında gerçekleştirilen çapraz bağlanma reaksiyonlarıyla yüksek mekanik özelliklere sahip ve aynı zamanda makrogözenekler içeren kriyojeller üretmek mümkündür [22].

Bu tez çalışmasında, jellerin mekanik dayanımını arttırmak için kullanılan iki önemli yöntemden çift-ağyapı tekniğiyle kriyojelasyon tekniği ilk kez birleştirilerek mekanik olarak dayanıklı ve makrogözenekli ipek fibroin iskeletleri üretilmiştir. Araştırma grubumuz tarafından daha önceki çalışmalarda diepoksitler kullanılarak sulu fibroin çözeltisinin kısa sürede kriyojelleşme reaksiyonuna girdiği ve bunun sonucunda fibroin kriyojellerinin oluştuğu saptanmıştır [23]. Yapılan bu çalışmalarda -18 °C sıcaklıkta, % 4,2 fibroin konsantrasyonunda, diepoksit kaynağı olarak 1,4-bütandiol diglisidil eter (BDDE) ve katalizör ve pH ayarlayıcısı olarak *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin (TEMED) kullanılarak tek-ağyapılı ipek fibroin kriyojelleri üretilmiştir. Çift-ağyapılı ve üç-ağyapılı fibroin jelleri kriyojelasyon yöntemiyle daha önce üretilmemiştir. Bu tezde, tek-ağyapılı (SN) fibroin kriyojelinden yola çıkarak mekanik dayanımı arttırmak amacıyla çift-ağyapılı (DN) ve üç-ağyapılı (TN) fibroin kriyojelleri üretilmiş ve üretilen tüm jellerin karakterizasyonları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, kriyojelasyon tekniğiyle üretilen çift-ağyapılı ve üç-ağyapılı fibroin iskeletlerinin, daha önce literatürde rapor edilen iskeletlerden mekanik olarak oldukça üstün olduklarını göstermektedir.

2. TEORİK KISIM

2.1 Hidrojeller

Hidrojeller, hidrofilik polimer ağıyapı ve bu ağıyapı içinde bulunan çözücünden (su veya sulu çözelti) oluşan iki fazlı sistemlerdir [13,14]. Ağıyapı içinde bulunan çözücü ağıyapının çökmesini engeller. Diğer yandan, polimerik ağıyapıya çözücünün dışarıya çıkmasına engel olur. Hidrojeller, büyük miktarlarda biyolojik sıvıları ya da suyu tutabilen üç boyutlu, hidrofilik, polimerik ağıyapılardır. Hidrojellerin biyolojik dokulara benzerlikleri, onların doku mühendisliğinde iskelet malzeme olarak kullanılmasına imkan sağlamaktadır. Vücuttaki yumuşak dokular % 30-80 civarında su içerirler ve yüksek mekanik dayanıma sahiptirler. Hidrojeller de içerdiği yüksek miktarda suyla, biyolojik dokular gibi ıslak ve yumuşak bir malzemedir [12]. Ayrıca hidrojeller, sahip olduğu düşük arayüzey geriliminden dolayı vücut sıvılarındaki proteinleri en az düzeyde adsorbe etme eğilimi gösterirler [24]. Şekil 2.1’de polimerik jellerin yapısı şematik olarak gösterilmiştir. Mavi eğriler polimerik ağıyapıyı, mavi noktalar çapraz bağ noktasını, kırmızı noktalar ise ağıyapı içerisindeki çözücüyü temsil etmektedir.



Şekil 2.1 : Polimerik jellerin yapısı.

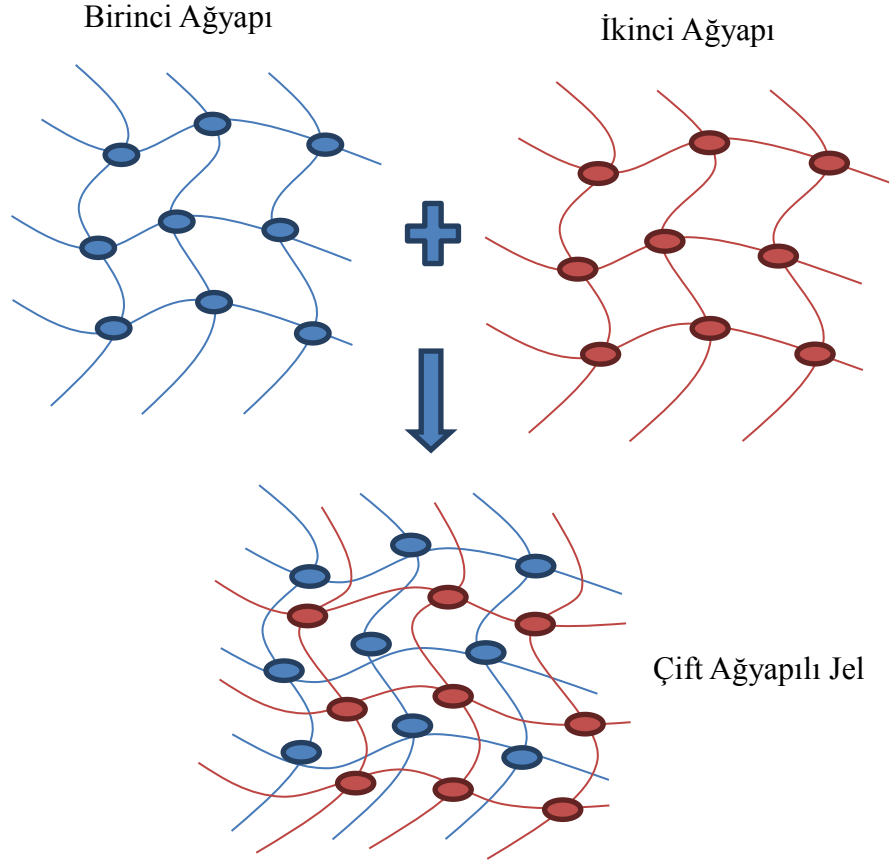
Hidrojeller sahip olduğu yüksek su emme kapasitesi, dışardan gelen uyarılara bağlı olarak hacim değiştirebilme yetenekleri ve biyolojik sistemlere benzerlikleri gibi

özellikleri sebebiyle son yıllarda en çok çalışılan malzemelerden birisi haline gelmiştir. Ancak, hidrojellerin pratik uygulamalarını sınırlayan iki dezavantajı vardır. Bunlardan bir tanesi klasik hidrojellerin hacim değişiminin yavaş olması, yani dışardan gelen uyarılara hızlı cevap verememesidir. Çoğu pratik uygulamada hidrojellerin hacim değişiminin hızlı olması istenmektedir. Bu sebeple, hidrojellerin dışardan gelen uyarılara hızlı cevap verebilmesi için jel boyutlarının küçültülmesi, jel yüzeyine doğrusal zincirlerin bağlanması ve makrogözenekli jellerin tasarımı gibi teknikler geliştirilmiştir [21,25,26].

Hidrojellerin diğer bir dezavantajı ise mekanik özelliklerinin çok iyi olmamasıdır. Çözelti benzeri yapısı, etkin bir enerji dağılım mekanizması olmayışı, ağyapılarının heterojenliği gibi sebeplerden dolayı hidrojellerin mekanik özellikleri iyi değildir [12]. Mekanik dayanım, özellikle kemik doku mühendisliği için oldukça önemli bir parametredir. Bir çok biyomalzeme, biyobozunur, biyouyumlu ve hücrelerin büyüyüp farklılaşabileceği üç boyutlu bir mimariye sahip olmasına rağmen mekanik olarak zayıf oldukları için kemik doku mühendisliğinde kullanılamamaktadır [15-17]. Hidrojellerin mekanik dayanımını arttırmak için topolojik jeller [18], nanokompozit jeller [19], çift-ağyapılı jeller [20], ve kriyojeller [22] gibi teknikler geliştirilmiştir.

2.2 İç İç Geçmiş Ağyapılı Polimerler (IPN) ve Çift-Ağyapılı (DN) Jeller

Bir hidrojinin mekanik dayanımını arttırmak için jel içerisinde etkili bir enerji dağılım mekanizması yaratmak gerekir. İç içe geçmiş ağyapılardan oluşan çift-ağyapılı jellerde, bu dağılım mekanizması ikinci ağyapı tarafından sağlanmaktadır. Gong ve Osada tarafından geliştirilen bu yöntemde, malzemeye uygulanan kuvvetin ikinci ağyapı tarafından dağıtılmasıyla üstün mekanik özellikler gözlenmektedir. İlk ağyapının sentezlenmesinin ardından elde edilen tek-ağyapılı jel, başka bir jel çözeltisinde dengeye gelene kadar şişirilerek ilk ağyapının içine ikinci ağyapıyı oluşturacak monomerlerin girmesi sağlanır. Ardından gerçekleştirilen polimerizasyon sonucu çift-ağyapılı (DN) jeller elde edilir [20]. Şekil 2.2’de çift-ağyapılı jellerin sentezi şematik olarak gösterilmiştir. Mavi ile gösterilen ilk ağyapının içinde kırmızıyla gösterilen ikinci ağyapının in situ yaratılmasıyla çift-ağyapılı jel oluşur. Çift-ağyapılı jelin ikinci ağyapı bileşeni çapraz bağlı ya da lineer olabilir.



Şekil 2.2 : Çift-ağyapılı jellerin sentezi.

Çift-ağyapılı jellerin mekanik özelliklerini etkileyen iki önemli parametre vardır. Bunlardan bir tanesi ikinci ağyapıdaki çapraz bağ miktarı; diğeri ise n_{21} ile gösterilen ikinci ağyapının birinci ağyapıya molar oranıdır. Polimer ve/veya monomerin cinsine ve elde edilen hidrojel yapıya bağlı olmak koşuluyla genelde ikinci ağyapı birinci ağyapıya göre daha az çapraz bağlı olduğunda ya da ikinci ağyapıda hiç çapraz bağ bulunmadığında çift-ağyapılı jellerin mekanik özellikleri daha iyi olmaktadır. Çünkü, ikinci ağyapıdaki çapraz bağ oranı azaldıkça ikinci ağyapı birinci ağyapıya göre daha esnek ve yumuşak olmakta ve böylece ikinci ağyapı malzemeye uygulanan kuvveti kırılmadan daha iyi bir şekilde dağıtabilmektedir. Bu da malzemenin mekanik özelliklerinde iyileşme olmasını sağlar. Aynı şekilde, ikinci ağyapının birinci ağyapıya molar oranı (n_{21}) arttıkça yine malzeme mekanik olarak daha dayanıklı hale gelmektedir [27].

Çift-ağyapılı jeller, iç içe geçmiş ağyapılardan oluşmaktadır. İç içe geçmiş ağyapılı polimerler (IPN) homojen ya da heterojen polimerlerin bir diğeri varlığında çapraz bağlanmasıyla oluşan üç boyutlu ağyapılardır [28]. IPN'ler ilk kez 1960 yılında polistiren ağyapıları ile literature girmiştir [29]. IPN gibi polimer karışımları

malzeme mühendisliğinde oldukça fazla kullanılmaktadır. IPN'leri diğer klasik polimer karışımlarından ayıran iki önemli özellik vardır. Bunlardan birincisi, IPN çözücülerde parçalanmadan şişebilir; ikincisi ise IPN'lerin yapısından dolayı yayılması ve akışkanlığı engellenmiştir [30].

2.3 Makrogözenekli Jeller

Makrogözenekli jel tasarımı, hidrojenlerin dışardan gelen uyarılara daha hızlı cevap verebilmesi için geliştirilen tasarımlardan birisidir. Makrogözenekli jellerin üretiminde en çok kullanılan yöntemlerden bir tanesi faz ayrımı tekniğidir. Bu teknikte, jelleşme sırasında çözücü, çapraz bağlayıcı ve inert gözenek oluşturun (porogen) gibi bileşenlerin miktarlarına ve reaksiyon sistemindeki polimer-çözücü etkileşmelerinin boyutlarına bağlı olarak bir mikrofaz ayrımı gerçekleşir [21,31]. Gerçekleşen bu faz ayrımının sonucu olarak da polimerizasyon sistemi polimer ve çözücü-monomer olmak üzere iki sürekli faza ayrılır. Reaksiyonun devam etmesiyle monomerler polimere dönüşür ve çözücü-monomer fazındaki monomer derişimi gittikçe azalır. Reaksiyon sonunda oluşan jel içinde sadece çözücünden oluşan ayrı bir sıvı faz kalır. Çapraz bağlanma ve polimerizasyon reaksiyonlarının tamamlanıp çözücünün uzaklaştırılmasıyla mikro ve nano boyutlarda gözenekler içeren makrogözenekli bir jel sentezlenmiş olur [21,32,33].

Faz ayrımı tekniğinin bazı dezavantajları vardır. Örneğin, faz ayrımı tekniği yüksek çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında mümkün olabilmekte ve bunun sonucunda da oluşan jel fazla çözücü emememektedir. Ayrıca oluşan gözenekler tekdüze değildir ve boyutları geniş bir dağılım gösterir. Bu tekniğin en büyük dezavantajı ise oluşan jellerin mekanik özelliklerinin iyi olmamasıdır. Faz ayrımı tekniğiyle sentezlenen jeller % 10-30 deformasyon oranlarında bile kolayca parçalanabilir. Hem makrogözenekli olup hem de üstün mekanik özelliklere sahip jeller kriyojelasyon tekniğiyle üretilebilmektedir [22].

2.4 Kriyojeller

Kriyojelleşme yöntemiyle makrogözenekli ve üstün mekanik özelliklere sahip jeller sentezlenebilir. Bu yöntemle elde edilen jellere “kriyojel” adı verilir. Kriyojel ismindeki “kriyo” kısmı Yunanca’da “donmuş” ya da “buz” anlamına gelmektedir

[34]. Kriyojelleri, klasik hidrojellerden ayıran bazı özellikler vardır. Bunlardan bir tanesi gözenek oluşum şeklidir. Hidrojellerde gözenekler jel sentezinden sonra dondurmalı kurutma sırasında oluşurken; kriyojellerde jelleşmenin başlangıcından hemen önce oluşur [35].

Kriyojellerin biyomühendislik ve doku mühendisliğinde uygulamaları sahip oldukları gözenekli yapıya ve mekanik dayanıklılığa bağlıdır. Kriyojellerin mikrometre boyutlarındaki ve birbiriyle bağlantılı olan gözenekli yapısı ve biyouyumluluğu, kriyojelleri doku mühendisliğinde hücrelerin tutunup büyümesi için uygun bir iskelet malzeme yapar. Kriyojeller yaklaşık 10-200 μm boyutlarında gözeneklere sahip olabilirler. Bu boyutlara kriyojel literatüründe bazen “süpermakrogözenekler” denilmektedir [36].

Kriyojeller, monomer ya da polimer çözeltilerinin donma noktası altında jelleşmesi sonucu elde edilir. Jelleşme reaksiyonlarının donma noktasının altında ilerlemesiyle ortamdaki buz kristalleri kalıp etkisi yaparak gözenekli bir yapının oluşması sağlanır [22,34,37-41]. Kriyojelleşme yönteminde jel çözeltisi donma noktasının altında bir sıcaklığa getirilerek dondurulur ve jelleşme reaksiyonları donmuş reaksiyon sisteminin donmamış mikrobölgelerinde ilerler. Yapılan çalışmalarda -10 °C ve -20 °C gibi sıcaklıklarda bile sistem içerisinde donmamış mikrobölgelerin olduğu saptanmıştır. Bunun nedeni, sulu çözelti donmaya başladığında buz kristallerinin ayrılarak donmamış sıvı fazdaki çözünen madde konsantrasyonunun artmasıdır. Çözünen madde konsantrasyonunun artması, o bölgelerin donmasını güçleştirir.

Kriyojeller sulu çözeltilerde genellikle -10 °C ve -20 °C gibi düşük sıcaklıklarda sentezlenir. Düşük sıcaklıklarda buz kristallerinin büyümesi gözeneklerin oluşmasını sağlarken, erimeden sonra birbirine bağlı gözenekler için kalıp davranışı sergiler. Jel çözeltisi soğutulduğunda donmuş monolitik blok iki ana parçadan oluşur. Jelleşme reaksiyonları donmamış sıvı mikrofaz içinde ilerler. Donma esnasında çözücü kristalleri büyürken içerdiği reaktifleri dışarı verme eğiliminde olup, donmuş çerçevenin sürekli bir sistemi oluşana dek diğer kristallerle birleşmektedir. Jelleşme reaksiyonlarının bitmesinden sonra erime ile sistem sıvı çözücüyle doldurulmuş sürekli makrogözenekli bölgeler içeren bir ağyapıdan oluşmaktadır [22,34].

Donmamış mikrobölgelerdeki başlatıcı ve monomer konsantrasyonu çok yüksek olduğundan reaksiyonlar -22 °C gibi çok düşük sıcaklıklarda bile normal sıcaklıklara

oranla daha hızlı ve daha verimli bir şekilde gerçekleşmektedir [22,37,42]. Kriyojellerin diğer dikkat çeken özelliklerinden bir tanesi, mekanik olarak klasik hidrojellere kıyasla oldukça üstün özellikler göstermeleridir. Yarı donmuş reaksiyon ortamında çözünmüş reaktifler jelleşme reaksiyonunun gerçekleştiği donmamış sıvı mikrofaz içinde yoğunlaşır. Böylece polimer zincirleri gözeneklerden gözenek duvarlarına taşınır ve kriyojel oluşur. Kriyojellerde gözenek duvarları klasik hidrojellerle karşılaştırıldığında daha yüksek polimer konsantrasyonuna sahiptir. Gözenek duvarlarında artan bu polimer konsantrasyonu kriyojellerin mekanik olarak dayanıklı olmasını sağlar [43-45]. Ayrıca kriyojeller % 100'e yakın bir oranda sıkıştırılıp çözücüyü verdikten sonra çözücü eklendiğinde anında yeniden şişip başlangıç konumuna dönebilir.

2.5 İpek

İpek, ipek böceği ve bazı örümcekler tarafından özel epitel hücrelerde sentezlenen doğal bir polimerdir. İpek lifleri, yüzyıllardır medikal alanda dikiş ipliği formunda kullanılmaktadır. Son yıllarda ise ipeğin jel, sünger ve film gibi çeşitli biyomalzeme formlarında medikal alanlarda kullanımı göze çarpmaktadır [1]. Ayrıca ipek sahip olduğu mekanik dayanımı sayesinde osteokondral doku, kas ve intervertebral disk (IVD) gibi dokuların onarımında kullanılabilir. Bir çok malzeme biyobozunur ve biyouyumlu olmasına rağmen mekanik dayanıklılığının yetersiz olmasından dolayı doku mühendisliğinde kullanılamamaktadır [15-17]. İpek, bilinen en güçlü doğal lif olmasından dolayı IVD gibi mekanik dayanımın önemli olduğu dokuların mühendisliğinde kullanılabilir. İpek liflerinin sahip olduğu bu mekanik dayanım, yapıda yoğun şekilde bulunan hidrojen bağları, proteinin hidrofobik doğası ve β -tabaka yapılarından kaynaklanan kristalinitenin bir sonucudur [9,46].

İpeğin diğer önemli özelliklerinden birisi kontrollü bozunmasıdır. İskelet malzemenin bozunma süresi doku mühendisliği için önemli bir parametredir ve bozunma süresi oluşacak yeni dokunun oluşma süresiyle uyumlu olmalıdır. Genel olarak, ipek lifleri gerilme kuvvetinin çoğunu in vivo olarak bir yıl içinde kaybeder ve iki yıl içinde de tamamen bozunur [9]. Ancak bu bozunma süresi gözeneklilik ve kristallilik gibi özellikler ayarlanarak kontrol edilebilir. İpeğin kontrol edilebilir bozunma hızı, kendine özgü mekanik özellikleri ve biyouyumluluğu gibi tüm

özellikleri, onu doku mühendisliğinde öne çıkan malzemelerden birisi haline getirmiştir.

2.5.1 Fibroin

İpek, fibroin ve serisin ağırlıklı olmak üzere waks, karbonhidratlar, anorganik tuzlar ve pigmentlerden oluşmaktadır [1,47-49]. Çizelge 2.1’de *Bombyx Mori* ipek böceğinden elde edilen ipeğin bileşimi görülmektedir [49].

Çizelge 2.1 : İpeğin bileşimi.

Bileşen	Bileşen Yüzdesi
Fibroin	70-80
Serisin	20-30
Waks	0,4-0,8
Karbonhidratlar	1,2-1,6
Anorganik Tuzlar	0,7
Pigmentler	0,2
Toplam	100

Fibroin, ipektaki yapısal protein, serisin ise yapışkan yapısı sayesinde fibroinin etrafını sarıp ipek liflerini bir arada tutan proteindir. Serisin, fibroinin yapısından ipek böceği kozalarının alkali çözeltilerde kaynatılmasıyla uzaklaştırılabilir [1].

Bombyx Mori ipek böceğinden elde edilen ipeğin yapısındaki fibroin lifleri yaklaşık 10-25 µm çapındadır. Bu lifler molekül ağırlığı yaklaşık 26 kDa olan hafif ve molekül ağırlığı yaklaşık 390 kDa olan ağır zincirlerin 1:1 oranında disülfid bağlarıyla bağlanmasıyla oluşur. Bu proteinler 20-310 kDa hafif-ağır zincirlerden oluşan serisin ile örtülmüştür. Disülfid bağı ağır zincirin Cys-c20 (karbonil ucundan 20. aminoasit kalıntısı) ile hafif zincirin Cys-172 arasında gerçekleşir. Ayrıca, P25 olarak adlandırılan bir glikoprotein kovalent olmayan bağlarla bu proteinlere bağlanmıştır [1,50]. P25 proteininin yapının bütünlüğünü koruduğu düşünülmektedir. Ağır ve hafif zincirlerle P25 proteininin molar oranları ise 6:6:1 şeklindedir [47].

İpek fibroinin yapısında glisin, alanin ve serin aminoasitleri baskın olarak bulunmaktadır [48,50]. Fibroinin yapısındaki aminoasitler ve bunların hafif ve ağır alanlardaki oranları Çizelge 2.2’de görülmektedir. Polimerin ağır alanı düzenli hidrofobik makromoleküllerden meydana gelir ve molekül ağırlığı 350-370 kDa arasındadır. Hafif alanın ise molekül ağırlığı yaklaşık 25 kDa’dur ve büyük polar aminoasitlerden oluşur [48].

Çizelge 2.2 : Fibroin proteinindeki aminoasit yüzdeleri.

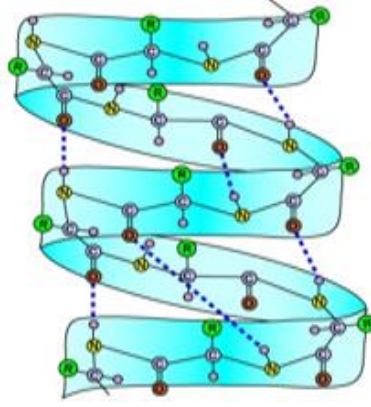
Aminoasit	Bileşen (% mol)		
	Toplam	Ağır Alan	Hafif Alan
Glisin	42,9	49,4	10,0
Alanin	30,0	29,8	16,9
Serin	12,2	11,3	7,9
Tirosin	4,8	4,6	3,4
Valin	2,5	2,0	7,4
Aspartik asit	1,9	0,65	15,4
Glutamik asit	1,4	0,70	8,4
Treonin	0,92	0,45	2,8
Fenilalanin	0,67	0,39	2,7
Metionin	0,37	-	0,37
İzolösin	0,64	0,14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

Fibroin büyük hidrofobik bloklar ve bunların aralarında ve zincir uçlarında bulunan daha küçük hidrofilik bloklardan oluşan bir kopolimerik mimariye sahiptir [51-54]. Fibroinin yapısında meydana gelen hidrojen bağları gibi moleküler arası etkileşimlerle ikincil yapılaşma şekilleri meydana gelmektedir [48].

2.5.2 Fibroindeki yapılaşma şekilleri

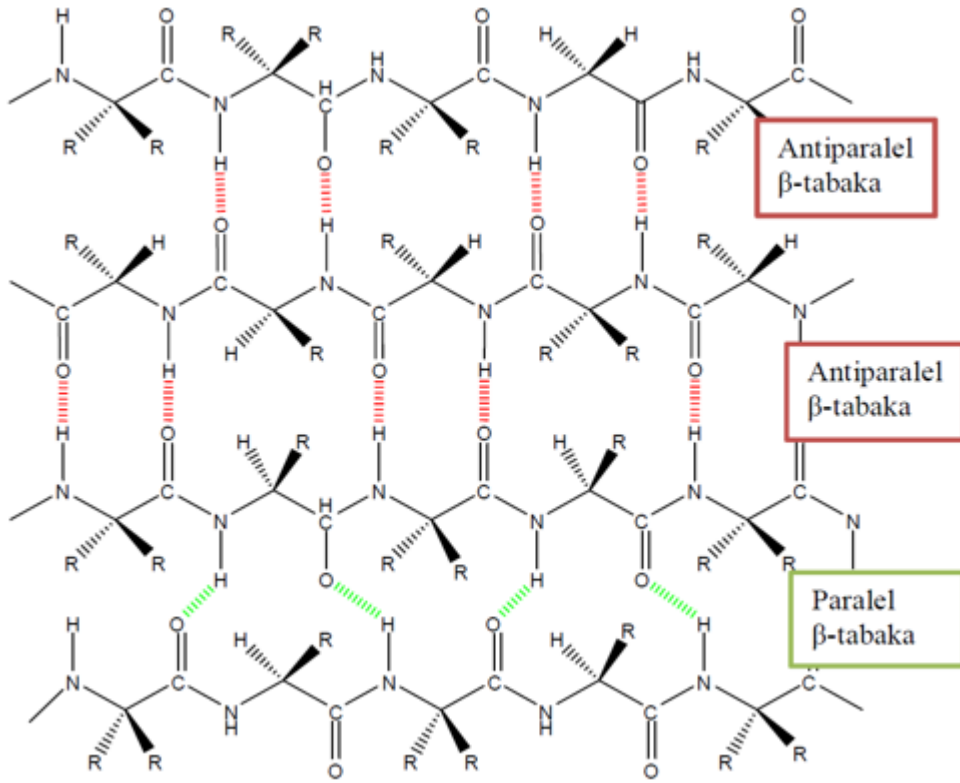
Proteinlerin yapılaşma şekillerini birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül olmak üzere dörde ayırabiliriz. Birincil yapı, aminoasitlerin birbirlerine peptit bağlarıyla bağlanarak oluşturduğu düz zincirli yapıdır. İkincil yapı, birincil yapıda moleküller arasındaki hidrojen bağları gibi etkileşimler sonucu oluşan yapılaşma şeklidir. İkincil yapıya örnek olarak α -heliks, β -tabaka ve β -döngü yapıları verilebilir. Üçüncül yapı, ikincil yapının katlanmasıyla oluşan üç boyutlu yapıdır. Dördüncü yapı ise protein eğer birden fazla polipeptit zincirinden oluşuyorsa gözlenebilir. Fibroin de bir protein olduğu için bu tarz yapılaşma şekilleri görülebilir.

İkincil yapılaşma şekillerinden biri olan α -heliks bir aminoasidin amino grubundaki hidrojen ile 4. sıradaki aminoasidin karbonil oksijeni arasında hidrojen bağı oluşmasıyla ortaya çıkar. Bu sarmal yapının her dönüşünde 3,6 aminoasit kalıntısı vardır ve dönüş başına alınan yol 5,4 Å'dur [47]. Şekil 2.3'de α -heliks yapısının şematik gösterimi verilmiştir. Bu şekilde, sarmal yapının oluşmasına neden olan hidrojen bağları mavi noktalar ile gösterilmiştir.



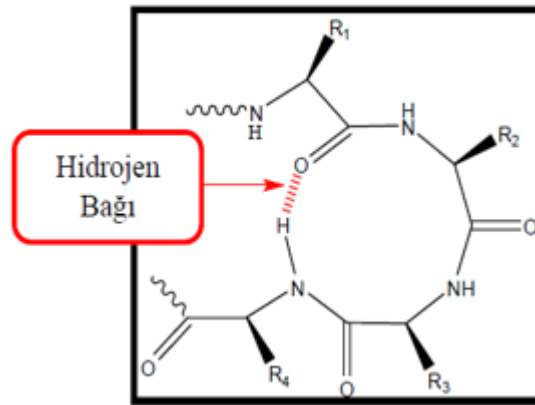
Şekil 2.3 : α -heliks yapısının şematik gösterimi [Url-1].

Şekil 2.3'de de görüldüğü üzere, α -heliks yapısı tek bir polipeptit zinciri içinde gerçekleşir. Farklı polipeptit zincirleri arasında oluşan hidrojen bağlarıyla da diğer ikincil yapılaşma şekli olan β -tabaka yapısı oluşur [47]. β -tabaka yapısı paralel ve antiparalel olabilir. Eğer polipeptit zincirleri farklı şekilde yönlendiyse antiparalel yapı; aynı şekilde yönlendiyse paralel yapı oluşur. Şekil 2.4'de paralel ve antiparalel β -tabaka yapıları görülmektedir.



Şekil 2.4 : Paralel ve antiparalel β -tabaka yapıları [Url-2].

Birinci aminoasitteki karbonil oksijeniyle 4. aminoasitteki azota bağlı hidrojen arasında hidrojen bağı oluşması ve dört aminoasidin kendi eksenini etrafında 180° dönmesiyle β -döngü yapısı meydana gelir [47]. Şekil 2.5’de β -döngü yapısı görülmektedir.



Şekil 2.5 : β -döngü yapısı [Url-2].

α -heliks, β -tabaka ve β -döngü şeklinde düzenlenmemiş protein bölgelerinin ise rastgele yumak yapıda olduğu söylenir [55]. Fibroin yapısındaki β -tabakaları malzemeye dayanıklılık ve sertlik kazandırırken, daha düzensiz olan ve zincir uçlarıyla hidrofobik bloklar arasında bulunan hidrofilik bloklar tokluğu ve elastisiteyi

arttırır. Ayrıca, β -tabaka yapıları fiziksel çapraz bağ görevi görerek kararlı jellerin oluşmasını sağlar [50,56-67].

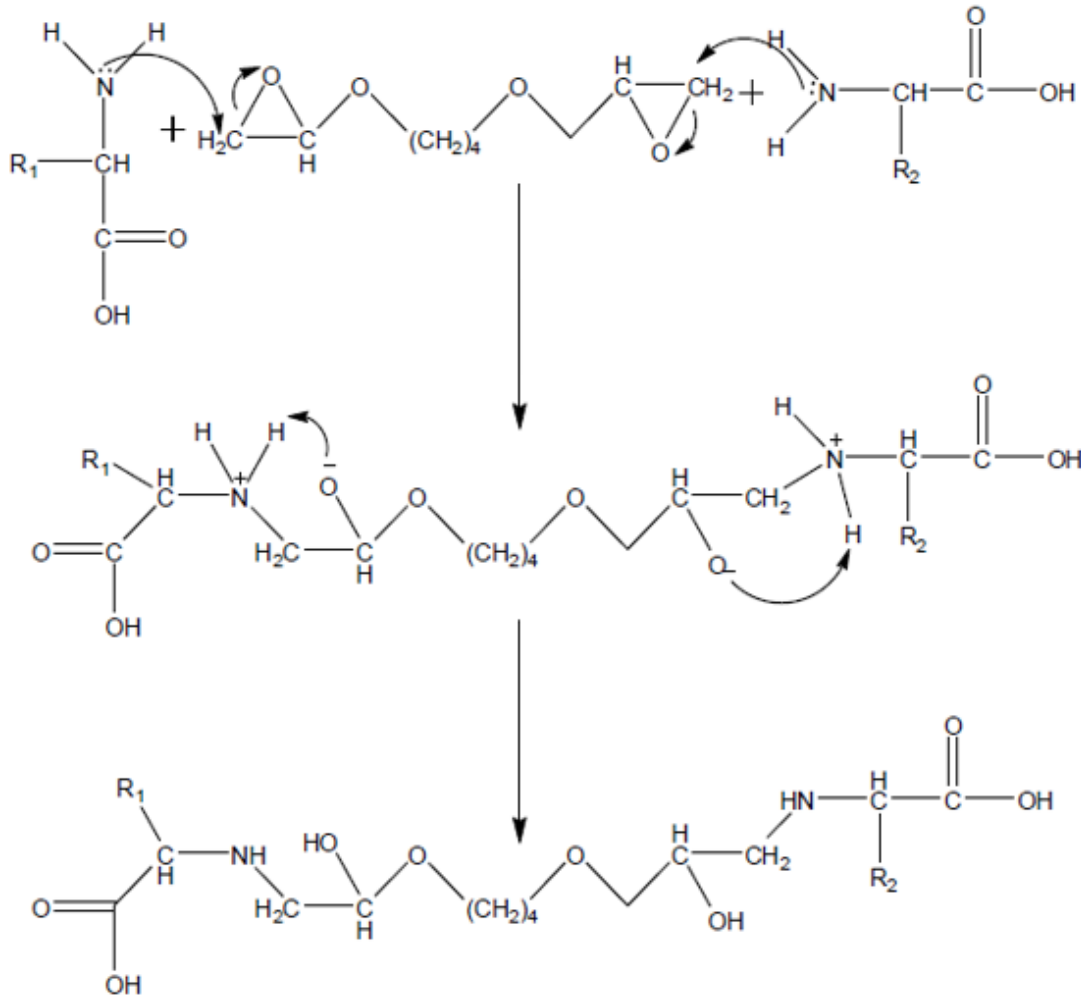
2.5.3 Fibroinin yapısında β -tabaka oluşumu ve jelleşme

Fibroinin hidrofobik kısımları arasında meydana gelen β -tabaka yapıları, fibroinin jelleşmesindeki ana etkidir. Diğer proteinlere kıyasla fibroinin jelleşmesi oldukça yavaş gerçekleşen bir süreçtir. Fibroinin jelleşmesini sıcaklık, konsantrasyon ve pH gibi parametreler etkilemektedir. Örneğin, 37 °C'de % 1-7 konsantrasyon aralığındaki fibroin çözeltilerinde sol-jel faz geçişi 5-7 günde gerçekleşir [68]. Çözeltinin pH değeri arttıkça jelleşme süresi de uzamaktadır. Örneğin pH = 10'da çözelti 1 ayda jelleşmektedir. pH artışıyla fibroinin jelleşmesinin daha uzun sürmesinin nedeni, fibroin zincirleri üzerindeki karboksil gruplarının karşı-iyonlarının yarattığı osmotik basınç nedeniyle molekülün suda genişmesi ve moleküller arası hidrofobik etkileşmelerin zayıflamasıdır. Hidrofobik etkileşmelerin zayıflamasıyla β -tabaka oluşumu güçleşir ve jelleşme süresi uzar.

Asidik pH değerlerinde ise, β -tabaka oluşumu daha kolay gerçekleştiğinden dolayı jelleşme de daha kısa sürede gerçekleşir. Düşük pH değerlerinde karboksil grupları iyonize olmadıklarından dolayı, molekülün suda genişmesi gibi bir durum söz konusu olmaz. Fibroin molekülü sulu çözeltide daha küçük boyutlarda olur ve bu durum hidrofobik kısımlar arasında β -tabaka oluşumunu tetikleyerek jelleşmenin gerçekleşmesini sağlar [69]. Ancak izoelektrik noktanın (pI = 3,8–3,9) yakınındaki pH değerlerinde bile % 3 konsantrasyonda fibroinin jelleşmesinin 2 gün sürdüğü görülmüştür [70]. Araştırma grubumuz tarafından geliştirilen bir yöntemle, fibroin çözeltilerine diepoksitlerin ilave edilmesiyle fibroinin jelleşmesinin daha hızlı gerçekleşmesi sağlanmıştır [23]. En sık kullanılan diepoksit kaynaklarından olan etilen glikol diglisidil eter (EGDE) ve 1,4-bütandiol diglisidil eter (BDDE) polisakkarit, protein, DNA ve bir çok organik molekülün çapraz bağlanmasında kullanılan bir çapraz bağlayıcıdır [71]. EGDE ve BDDE'nin iki ucunda bulunan epoksi grupları amin, tiyol ve hidroksil gruplarıyla reaksiyona girebilir. Yapılan çalışmalarda BDDE varlığında 50 °C'de ve % 4,2 konsantrasyonunda fibroin çözeltisinin pH = 8-11 gibi geniş bir aralıkta kısa bir süre içerisinde jelleşmesi sağlanmıştır [23]. Fibroinin yapısında BDDE ile gerçekleşen konformasyonel geçişler şu şekilde açıklanabilir: BDDE ile fibroin molekülündeki hidrofilik kısımlar

birbirine bağlanarak molekülün hareketliliği azalır. Böylece moleküller arası hidrofobik etkileşimler kuvvetlenerek β -tabaka yapısının çekirdeklenme ve büyüme süreci kolaylaşır.

Epoksi grubu sahip olduğu üç üyeli halkalı yapısından dolayı nükleofilik yer değiştirme tepkimelerinde oldukça etkindir. Amino grubunda azot atomu, üzerindeki bağ yapmamış elektronlar ile epoksi karbonuna atak yapar ve halka açılır. Bu reaksiyon, azot atomunun nükleofil olarak davrandığı bir S_N2 reaksiyonudur. Şekil 2.6'da epoksi gruplarıyla amino grupları arasında gerçekleşen çapraz bağlanma reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 2.6 : Epoksi gruplarıyla amino grupları arasında gerçekleşen reaksiyon.

2.5.4 Gözenekli fibroin iskeletleri

Kemik doku mühendisliğinde kullanılabilecek bir malzeme üstün mekanik özelliklere sahip olmalı, biyobozunur ve biyouyumlu olmalı ve aynı zamanda

hücrelerin büyüyüp dokuyu oluşturabileceği gözenekli bir yapıya sahip olmalıdır. İpek, sayılan bu tüm özelliklere sahip olmasıyla doku mühendisliğinde  ne çıkan malzemelerden birisidir.

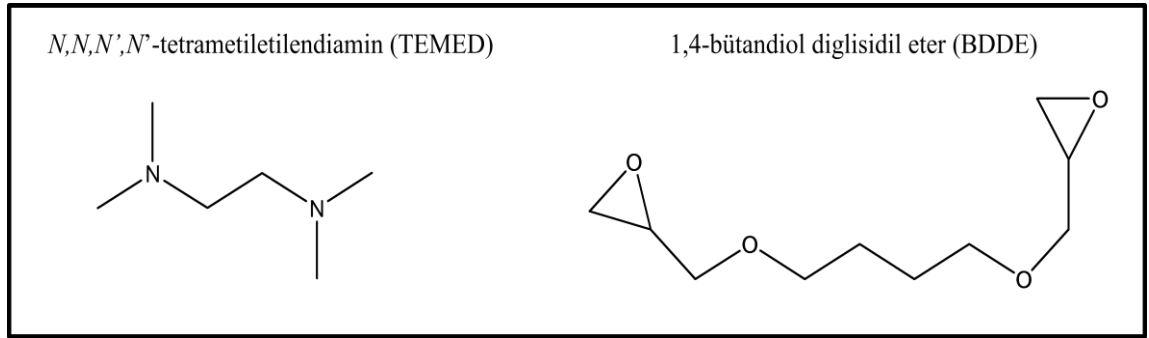
Gözenekli ipek fibroin iskeletleri elde etmenin çeşitli yolları vardır. Bunlardan bir tanesi, hekzafloroizopropil alkol ve metanol      leriyle muameledir [72]. Ayrıca, fibroinin sulu çözeltilerinden dondurarak eritme, dondurarak kurutma, gözenek oluşturucu ekleme, gaz oluşturma, elektro-eğirme işlemleri gibi çeşitli yöntemlerle gözenekli fibroin iskeletleri elde edilebilir [73-78]. Ancak tüm bu tekniklerde β -tabaka yapılarının oluşması için metanol ile muamele işlemi gerekmektedir. Ayrıca, bu tekniklerle elde edilen fibroin iskeletlerinin mekanik dayanımları çok iyi olmamaktadır. Örneğin, kortikal kemik yaklaşık 200 MPa basınç dayanımına ve 20 GPa elastik modüle; süngerimsi kemik ise 7 MPa basınç dayanımına ve 75 MPa elastik modüle sahiptir. Dondurma-kurutma, gaz oluşturma ve gözenek oluşturucu olarak tuz ilavesiyle üretilen ipek fibroin iskeletlerinin ise basınç dayanımları ile elastik modülleri oldukça düşük olup ulaşılabilen en yüksek değerler sırasıyla 0,2 MPa ve 3 MPa'dır. [16].

Bu tez çalışmasında ise fibroin iskeletleri kriyojelleşme tekniğiyle üretilmiştir. Sonuçlar ve Tartışma kısmında da görüleceği üzere; kriyojelleşme tekniği uygulanarak literatürde ilk kez olarak çift-ağyapılı ve üç-ağyapılı fibroin iskeletleri elde edilmiştir. Fibroin kriyojel iskeletlerinin mekanik performanslarının yukarıda bahsedilen diğer tekniklerle elde edilen iskeletlere nazaran çok daha üstün olduğu ortaya konmuştur.

3. DENEYSEL KISIM

3.1 Kullanılan Kimyasallar

Deneysel çalışmalarda fibroin elde etmek için Bursa Koza Birlik firmasından temin edilen *Bombyx Mori* ipek böceği kozaları; ipeğin yapısından serisini uzaklaştırmak için sodyum karbonat (Na_2CO_3 , mol kütlesi 105,99 g/mol, Merck) ve fibroini çözmek için lityum bromür (LiBr , mol kütlesi 86,84 g/mol, Merck) kullanılmıştır. Jel sentezinde katalizör ve pH ayarlayıcısı olarak *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$, TEMED, mol kütlesi 116,21 g/mol, Aldrich) ve kimyasal çapraz bağlayıcı olarak 1,4-bütandiol diglisidil eter ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_4$, BDDE, mol kütlesi 202,25 g/mol, Aldrich) kullanılmıştır. Jel sentezinde kullanılan kimyasalların yapısı Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 : Jel sentezinde kullanılan kimyasalların yapısı.

Fibroini LiBr içinde çözdükten sonra tuzu uzaklaştırıp sulu fibroin çözeltisi elde etmek için ve/veya fibroinin konsantrasyonunu arttırmak için yapılan diyaliz işlemlerinde ise 10000 g/mol ortalama molekül ağırlığında polietilenglikol (PEG, Aldrich) kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan alet ve cihazlar ilgili özellikleriyle birlikte aşağıda verilmiştir.

Hassas Terazi

Deneysel alışmalar sırasında tüm tartım işlemleri Sartorius model elektronik teraziyle yapılmıştır. Bu terazi 205 g ağırlık kapasitesi ve 0,1 mg duyarlılığa sahiptir.

Plastik şıringalar

Kriyojellerin sentezi için plastik şıringalar kullanılmıştır. Tek-ağyapılı fibroin kriyojellerinin sentezi için 1 ml'lik; çift-ağyapılı ve üç-ağyapılı fibroin kriyojellerinin sentezi için 5 ml'lik şıringalar kullanılmıştır.

Desikatör

Fibroinin kurutulması için içinde NaOH bulunan vakumlu desikatör kullanılmıştır.

Buzdolabı

Kriyojelasyon işlemi için buzluk sıcaklığı -18°C olan buzdolabı kullanılmıştır.

Diyaliz Tüpleri

LiBr zeltisi içinde çözülerek elde edilen fibroin çözeltisinden LiBr'u uzaklaştırıp sulu fibroin çözeltisi elde etmek için Pierce Thermo Scientific Rockford IL marka MWCO 10000 olan diyaliz tüpü kullanılmıştır. Ayrıca tuzu uzaklaştırdıktan sonra, fibroin çözeltisinin konsantrasyonunu arttırmak için Pierce Thermo Scientific Rockford IL marka MWCO 3500 olan diyaliz tüpü kullanılmıştır.

Elektronik Kumpas

Elde edilen jellerin çapları Mitutoyo marka elektronik kumpas ile lmştr. Bu kumpasın m aralığı 0-150 mm'dir.

Freeze-Dryer (Dondurmalı-Kurutucu)

Sentezlenen jellerin kurutma işlemleri Christ marka Alpha 2-4 LD Plus model dondurmalı kurutucu ile yapılmıştır.

Mekanik Test Cihazları

Üretilen jellerin mekanik davranışlarını incelemek için Zwick Roell marka ve Devotrans marka mekanik test cihazları kullanılmıştır.

ATR-FTIR Spektrofotometresi

Fibroinin zincir konformasyon analizleri için Nicolet Nexus 6700 marka ATR-FTIR spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Jellerin morfolojik analizleri için Jeol JSM 6335F Field Emison marka taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır.

3.3 Deneyin Yapılışı

3.3.1 İpek böceği kozalarından fibroin çözeltilerinin hazırlanması

Bombyx Mori ipek böceği kozaları kesilerek böcekleri uzaklaştırılmıştır. Ardından, kesilen kozalardan 10 g tartılmış ve kozalar suyla yıkanarak temizlenmiştir. Yıkanan kozalar 2 litrelik bir beher içinde, beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak, 1 L 0,02 M Na_2CO_3 çözeltisi içinde 1 saat karıştırılarak kaynatılmıştır. Bu işlemin amacı, ipeğin iki temel bileşeninden biri olan ve fibroinin etrafını saran serisini uzaklaştırmaktır. 1 saatin ardından serisin uzaklaştırılarak elde edilen fibroin, içerisinde kalmış olabilecek waks ve serisin gibi bileşenlerin tamamen temizlenmesi için 70 °C sıcaklıktaki 1 L saf suyla 4 kez; 50-60 °C sıcaklıktaki 2 L saf suyla da 1 kez yıkanmıştır. Yıkama işlemlerinin ardından oda sıcaklığındaki saf su içine alınan fibroin, iyice sıkılarak suyu uzaklaştırılmış ve vakumlu desikatör içerisinde oda sıcaklığında kurutulmuştur. İpeğin yapısının yaklaşık % 70'i fibroin olduğu için ve başlangıçta 10 g ipek kozası kullanıldığı için kurutma işleminden sonra yaklaşık 7 g ipek fibroin elde edilmiştir.

Kuruyan fibroin 9,3 M LiBr içerisinde 56-60 °C sıcaklıkta 1,5-2 saat içerisinde çözülmüştür. Elde edilen fibroin çözeltisi buzdolabında 1,5 saat bekletilmiş ve bir spatül yardımıyla çözelti üzerindeki safsızlıklar uzaklaştırılarak 10000 MWCO diyaliz tüpünde suya karşı 3 gün boyunca diyaliz edilmiştir. Bu diyaliz işleminin amacı, tuzun uzaklaştırılması ve bu sırada diyaliz tüpünün içine ilave su girmesi ile daha seyreltik bir fibroin çözeltisi elde etmektir. LiBr uzaklaştırılmasını hızlandırmak için diyaliz işlemi sırasında saf su sık sık değiştirilmiştir. Suyu karşı diyaliz işleminden sonra konsantrasyon tayini yapılmış ve fibroin çözeltisinin konsantrasyonunun yaklaşık % 6 olduğu bulunmuştur. Tek-ağyapılı (SN) kriyojellerin sentezinde kullanmak için bu çözelti % 5'e seyreltilmiştir. Çift-ağyapılı (DN) ve üç-ağyapılı (TN) kriyojellerin sentezi için ise fibroin çözeltisinin konsantrasyonu artırılmıştır. Bu amaçla, suya karşı diyaliz işleminden sonra fibroin çözeltisi 3500 MWCO diyaliz tüpü yardımıyla 10000 g/mol molekül ağırlığında PEG

çözeltilerine (% 10-15 PEG) karşı diyaliz yapılmıştır. PEG'e karşı diyaliz işleminden sonra da fibroin konsantrasyon tayinleri yapılmış ve istenen konsantrasyonu elde etmek için gerekiyorsa seyreltme işlemi yapılmıştır.

3.3.2 İpek fibroin kriyojellerinin sentezi

Bu çalışma kapsamında tek-ağyapılı (SN), çift-ağyapılı (DN) ve üç-ağyapılı (TN) olmak üzere üç farklı fibroin kriyojeli üretilmiştir. Bu kriyojellerin sentezleri ayrıntılı olarak aşağıda anlatılmıştır.

3.3.2.1 Tek-ağyapılı (SN) ipek fibroin kriyojellerinin sentezi

Diyaliz işleminden sonra gravimetrik tayinle konsantrasyonu belirlenen sulu fibroin çözeltisi, SN kriyojellerinin sentezi için % 5 (ağ/ hac) konsantrasyona seyreltilmiştir. Ardından % 5'lik fibroin çözeltisi, 1 gram fibroin başına 20 mmol epoksi olacak şekilde BDDE ve hacimce % 0,25 olacak şekilde TEMED kullanılarak toplam hacmi 6 ml olan bir çözelti hazırlanmış ve SN kriyojelinin sentezi yapılmıştır. Toplam çözelti hacmi 6 ml olduğundan ve % 5'lik fibroin çözeltisi kullanıldığından dolayı SN kriyojeli % 4,2 fibroin konsantrasyonuna sahiptir. SN kriyojelleri için standart bir sentez prosedürü şu şekildedir: 5 ml % 5'lik fibroin çözeltisi üzerine 0,487 ml saf su, 0,498 ml BDDE ve 0,015 ml TEMED eklenerek toplam hacmi 6 ml olan bir çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltinin manyetik karıştırıcıda bir balık yardımıyla karıştırılarak homojen bir karışım elde edilmesi sağlanmıştır. Karıştırma işleminin ardından bu çözelti 1 ml'lik plastik şırıngalara çekilmiş ve şırıngalar kriyojelasyon işlemi için -18 °C'de 24 saat bekletilmiştir. Kriyojelasyon işleminden sonra jeller oda sıcaklığında erimeleri için yaklaşık 30 dakika bekletilmiş ve şırıngaların bir jilet yardımıyla kesilmesiyle jeller dışarı alınmıştır. Sentez sonrasında jeller şişme dengesine gelene kadar saf su içinde bekletilmiştir. Bu süre boyunca jellerin içinde olduğu su sık sık değiştirilmiştir. Bu işlem ile reaksiyona girmeyen maddelerin de uzaklaştırılması sağlanmıştır. Jeller dengeye geldikleri zaman ileriki aşamalarda kullanılmak üzere dondurmali kurutucuda kurutulmuşlardır.

3.3.2.2 Çift-ağyapılı (DN) ipek fibroin kriyojellerinin sentezi

Tüm DN kriyojellerinin sentezi için % 4,2 fibroin konsantrasyonunda elde edilen SN kriyojelleri kullanılmıştır. Dondurmali kurutucuda kurutulmuş SN kriyojeli, % 7,2 ile % 28,6 arasında değişen konsantrasyonlarda fibroin içeren çözeltilere atılıp dengeye

gelene kadar şişirilmiştir. Şişen jeller fibroin çözeltisinden alınıp 5 ml'lik plastik şırıngalar içerisine konularak -18 °C 'de kriyojelasyon işlemiyle çift-ağyapılı fibroin kriyojelleri elde edilmiştir. Özetle, ilk ağyapı konsantrasyonu % 4,2'de sabit tutulmuş; ikinci ağyapıdaki fibroin konsantrasyonu ise % 7,2 ile % 28,6 arasında değiştirilerek DN kriyojelleri üretilmiştir. Örneğin % 7,2 fibroin konsantrasyonunda DN kriyojelinin sentezi için standart prosedür şu şekildedir: Fibroin konsantrasyonu % 10 olan sulu fibroin çözeltisinden 5 ml alınarak üzerine 0,987 ml saf su, 0,996 ml BDDE ve 0,0175 ml TEMED konularak toplam hacmi 7 ml olan ve % 7,2 fibroin içeren bir çözelti hazırlanmıştır. 5 ± 1 mm boyutlarında kesilen kuru durumdaki SN kriyojelleri hazırlanan bu çözeltiye atılıp şişirilmiştir. Şişen jeller 5 ml'lik plastik şırıngalara alınmış ve şırıngaların -18 °C'deki kriyojelasyon işlemiyle 24 saat sonunda % 4,2-7,2 DN kriyojeli sentezlenmiştir. Kriyojelasyon işleminden sonra şırıngalar oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk bekletilmiş ve ardından jeller şırıngalardan çıkarılarak suya atılmıştır. Suda şişme dengesine gelen DN kriyojelleri ileriki aşamalarda kullanılmak amacıyla dondurmali kurutucuda kurutulmuşlardır.

DN kriyojellerinin senteziyle ilgili gerekli bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir. % 7,2, % 14,3, % 20 ve % 28,6'lık fibroin çözeltilerini hazırlamak için sırasıyla diyaliz sonrasında % 10, % 20, % 24,7 ve % 30'luk fibroin çözeltileri kullanılmıştır. Bu çözeltilere eklenen TEMED hacimce % 0,25 olacak şekilde hesaplanmıştır. BDDE hesabı ise 1 gram fibroin başına mmol epoksi (mmol/g) olacak şekilde yapılmış ve fibroin çözeltilerine eklenmiştir. Artan fibroin konsantrasyonundan dolayı ani jelleşmeleri en aza indirmek için ikinci ağyapıdaki BDDE miktarları azaltılmıştır. Çizelgede görülen 1 ve 2 alt indisleri sırasıyla ilk ağyapıyı ve ikinci ağyapıyı temsil etmektedir. Ayrıca karşılaştırma amacıyla SN kriyojelinin sentez bilgileri de çizelgeye eklenmiştir. % 7,2; % 14,3; % 20 ve % 28,6 fibroin konsantrasyonlarında elde edilen DN kriyojelleri aşağıdaki paragraflarda sırasıyla DN1, DN2, DN3 ve DN4 kodları ile bahsedilecektir.

Çizelge 3.1 : DN kriyojellerinin sentez şartları.

Jel Kodu	C _{IF} (1) %	C _{IF} (2) %	Epoksi (1) mmol/g	Epoksi (2) mmol/g
SN	4,2	-	20	-
DN1	4,2	7,2	20	20
DN2	4,2	14,3	20	10
DN3	4,2	20	20	5
DN4	4,2	28,6	20	1,5

Çizelge 3.1’de görülen DN kriyojellerinin haricinde, ikinci ağyapıdaki çapraz bağlayıcı (BDDE) miktarının jellerin özelliklerine etkisini incelemek için; DN4 kodlu kriyojelden fibroin konsantrasyonları değiştirilmeden; ikinci ağyapıda 0,75 mmol/g ve 0,375 mmol/g epoksi içeren kriyojeller üretilmiştir. Yani, ilk ağyapıda ve ikinci ağyapıda aynı fibroin konsantrasyonuna sahip fakat ikinci ağyapıda farklı miktarlarda BDDE içeren 3 farklı DN4 kriyojeli (DN4, DN4’, DN4’’) üretilmiştir. Çizelge 3.2’de DN4 kriyojellerinin kodları ve sentez şartları özetlenmiştir.

Çizelge 3.2 : DN4 kriyojellerinin sentez şartları.

Jel Kodu	C _{IF} (1) %	C _{IF} (2) %	Epoksi (1) mmol/g	Epoksi (2) mmol/g
DN4	4,2	28,6	20	1,5
DN4’	4,2	28,6	20	0,75
DN4’’	4,2	28,6	20	0,375

3.3.2.3 Üç-ağyapılı (TN) ipek fibroin kriyojellerinin sentezi

% 4,2 fibroin konsantrasyonunda sentezlenen tek-ağyapılı (SN) kriyojelden yola çıkarak önce ikinci ağyapıda % 7,2 fibroin konsantrasyonuna sahip ve DN1 kodlu çift-ağyapılı fibroin kriyojeli elde edilmiş; ardından bu DN ile de üçüncü ağyapıda fibroin konsantrasyonu % 20 olan TN kriyojeli üretilmiştir. TN kriyojeli için standart bir sentez prosedürü şu şekildedir: Fibroin konsantrasyonu % 24,7 olan fibroin çözeltisinden 5 ml alınarak üzerine 0,37 ml saf su, 0,615 ml BDDE ve 0,015 ml TEMED konularak toplam hacmi 6 ml; fibroin konsantrasyonu % 20 olan bir çözelti hazırlanmıştır. Kuru durumdaki DN1 kriyojeli hazırlanan bu çözeltiye atılarak dengeye gelene kadar şişirilmiştir. Çözeltide şişmiş jeller 5 ml’lik plastik şırıngalara alınarak kriyojelasyon işlemi için -18 °C’de 24 saat bekletilmiştir. Üçüncü ağyapının kriyojelleştirilmesinin ardından TN kriyojelleri yaklaşık 30 dk erimeleri için oda sıcaklığında bekletilmiş ve ardından jeller şırıngalardan çıkarılarak saf su içerisine atılmıştır. Suda şişme dengesine gelen ve reaksiyona girmeyen maddelerin uzaklaştığı jeller ileriki aşamalarda kullanılmak üzere dondurmali kurutucuda kurutulmuşlardır.

TN kriyojelinin sentezinde kullanılan SN, DN ve çapraz bağlayıcı ile ilgili bilgiler Çizelge 3.3’de özetlenmiştir. Katalizör ve pH ayarlayıcısı olarak kullanılan TEMED, çözeltiye hacimce % 0,25 olacak şekilde eklenmiştir.

Çizelge 3.3 : TN kriyojellerinin sentez şartları.

Jel Kodu	C _{IF} (1) %	C _{IF} (2) %	C _{IF} (3) %	Epoksi (1) mmol/g	Epoksi (2) mmol/g	Epoksi (3) mmol/g
SN	4,2	-	-	20	-	-
DN1	4,2	7,2	-	20	20	-
TN	4,2	7,2	20	20	20	5

3.4 İpek Fibroin Kriyojellerinin Karakterizasyonu

3.4.1 Şişme testleri

Sentez sonrasında kriyojeller şırıngalardan çıkarılarak yaklaşık 5 mm boyutunda kesilip sentez sonrası ağırlıkları (m_0); dijital kumpas ile de sentez sonrası çapları (D_0) ölçülüp saf suya atılmış ve şişme dengesine gelene kadar beklenilmiştir. Bu süre içinde jellerin çapları ve kütleleri ölçülmüştür. Dengeye gelen jeller sudan çıkarılarak şişmiş durumdaki ağırlıkları ($m_{\text{şişmiş}}$) ve şişmiş durumdaki çapları ($D_{\text{şişmiş}}$) ölçülmüştür. Ardından şişmiş durumdaki fibroin kriyojelleri dondurmalı kurutucuda 3 gün süren bir işlemle kurutulmuşlardır. Bu cihazda kriyojeller ilk gün -25 °C’de dondurulmuştur. 2. gün -40°C ve 0,12 mbar sıcaklık ve basınç değerlerinde; 3. gün ise -60°C ve 0,01 mbar sıcaklık ve basınç değerlerinde dondurularak kurutulmuşlardır. Dondurarak kurutma işleminden sonra kuru durumdaki kriyojellerin ağırlıkları (m_{kuru}) ve çapları (D_{kuru}) ölçülmüştür. Sentez sonrası, şişmiş durumdaki ve kuru durumdaki kriyojellerin ağırlık ve çaplarının ölçümünün ardından, bu değerler kullanılarak aşağıdaki eşitlikler yardımıyla kütlece şişme (q_w), hacimce şişme (q_v), kütlece bağıl şişme (m_{rel}) ve hacimce bağıl şişme (v_{rel}) değerleri hesaplanmıştır.

$$m_{\text{rel}} = \frac{m_{\text{şişmiş}}}{m_0} \quad (3.1)$$

$$v_{\text{rel}} = \left(\frac{D_{\text{şişmiş}}}{D_0} \right)^3 \quad (3.2)$$

$$q_w = \frac{m_{\text{şişmiş}}}{m_{\text{kuru}}} \quad (3.3)$$

$$q_v = \left(\frac{D_{\text{şişmiş}}}{D_{\text{kuru}}} \right)^3 \quad (3.4)$$

Malzemenin toplam gözenekliliği de q_w ve q_v değerlerinden faydalanılarak 3.5 numaralı denklemden hesaplanmıştır [79]. Bu denklemdeki ρ fibroinin yoğunluğunu göstermekte olup değeri 1,35 g/ml'dir.

$$P = 1 - q_v[1 + (q_w - 1)\rho]^{-1} \quad (3.5)$$

Jel kesri, 1 g ipek fibroinden elde edilen çapraz bağlı fibroin miktarıdır ve w_g ile gösterilir. Tek-ağyapılı jeller için jel kesri 3.6 numaralı denklem ile hesaplanabilir.

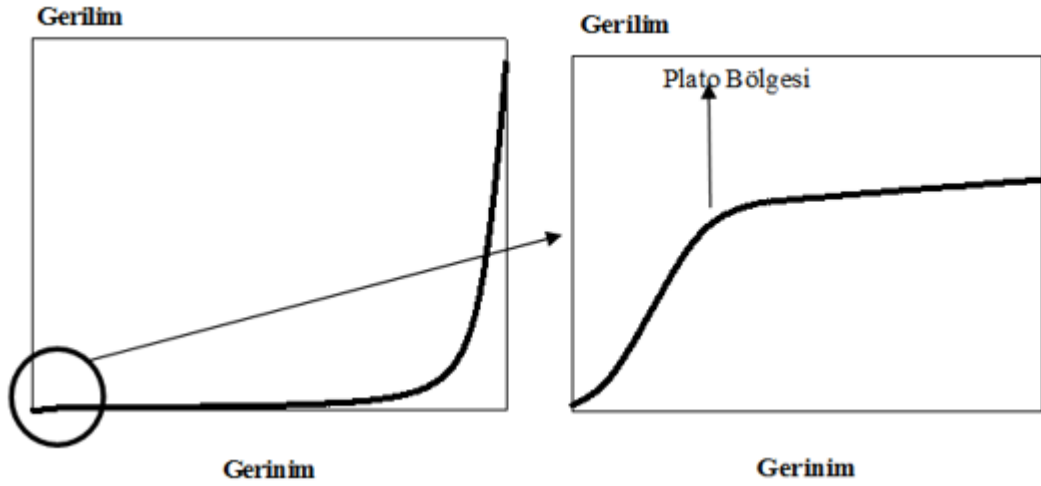
$$w_g = m_{kuru}/(m_0 * C_{IF}) \quad (3.6)$$

Çift-ağyapılı ve üç-ağyapılı jeller için jel kesrinin hesaplanmasında 3.6 numaralı denklem kullanılmamıştır. Çift-ağyapılı jellerde ikinci ağyapıya giren fibroin miktarı; üç-ağyapılı jellerde de üçüncü ağyapıya giren fibroin miktarı hesaba katılarak jel kesri tek-ağyapılı jellerden farklı olarak hesaplanmıştır.

3.4.2 Mekanik Testler

Tek eksenli sıkıştırma testleri için Zwick-Roell Z 0.05 ve Devotrans mekanik test cihazları kullanılmıştır. Bu cihazlarda yaklaşık 4 mm çapındaki silindirik numuneler sıkıştırılarak gerilim-gerinim grafikleri elde edilmiştir. Zwick-Roell'deki ölçümler 500 N'luk yük hücresiyle 0,1 N'luk bir ön yük uygulanarak $24 \pm 0,5$ °C sıcaklıkta ve 0,3 mm/dak test hızında gerçekleştirilmiştir. Devotrans cihazında ise sıkıştırma testleri 10 kN'luk yük hücresiyle 1 N'luk ön yük uygulanarak $24 \pm 0,5$ °C sıcaklıkta ve 0,6 mm/dak test hızında gerçekleştirilmiştir. Diğer numunelere göre daha sert yapıda olan kuru durumdaki bazı DN kriyojelleri ve TN kriyojelleri için Devotrans cihazı kullanılmıştır. İki cihazda da ön yük uygulanmasının nedeni cihazlardaki basma aparatının jel yüzeyine değdiğinden emin olmak içindir.

Sıkıştırma testleri sonucu elde edilen gerilim-gerinim grafikleri yardımıyla malzemelerin mekanik özellikleri incelenmiştir. Şekil 3.2'de ipek fibroin kriyojelleri için tipik bir gerilim-gerinim grafiği şematik olarak görülmektedir. Gerilim-gerinim grafiklerinde % 2-4 deformasyon oranı arasındaki eğim Young modülü (E) değerini vermektedir. Gözeneklerin parçalanmaya başladığı gerilim değeri plato gerilimidir (σ_{plato}) ve bu gerilim değeri bir gerilim-gerinim grafiğinde plato bölgesinin olduğu yerden belirlenir [35]. % 3 deformasyon oranına karşılık gelen gerilim değeri ise basınç dayanımı (σ_{comp}) olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 3.2 : Fibroin kriyojelleri için tipik gerilim-gerinim grafikleri.

Bu çalışmada, malzemelere uygulanan gerilim iki farklı şekilde ifade edilmiştir. Bunlardan bir tanesi nominal gerilim (σ_{nom}); diğeri ise gerçek gerilimdir ($\sigma_{gerçek}$). Nominal gerilim, numunenin birim başlangıç kesit alanına etki eden kuvveti; gerçek gerilim ise numunenin herhangi bir deformasyon anındaki birim yüzeyine etki eden kuvveti göstermektedir.

$$\sigma_{nom} = \frac{F}{A_0} \quad (3.7)$$

$$\sigma_{gerçek} = \frac{F}{A} = \sigma_{nom} * \lambda \quad (3.8)$$

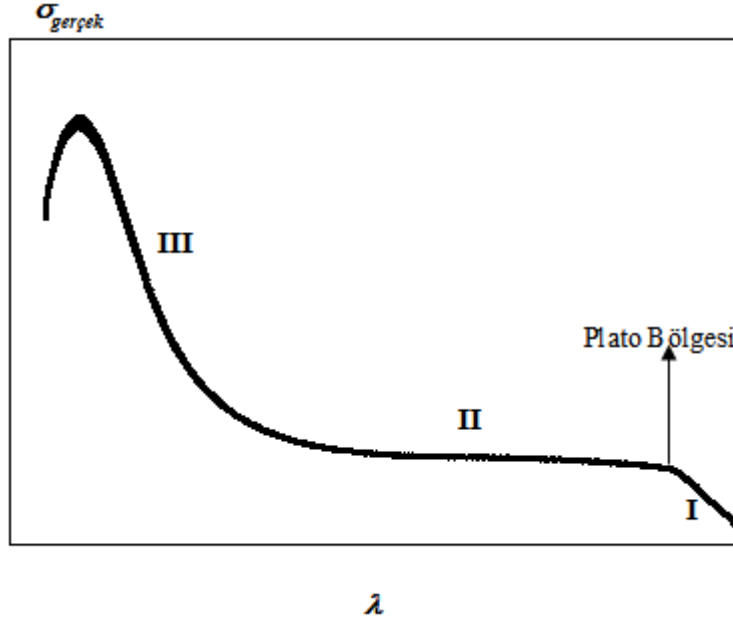
Denklemlerde F malzemeye uygulanan kuvvet, A_0 malzemenin başlangıç kesit alanı, A ise malzemenin sıkıştırılması sırasında herhangi bir deformasyon anındaki kesit alanıdır. Başlangıç çapı D ile gösterilen bir malzeme için kesit alanı 3.9 numaralı eşitlik yardımıyla hesaplanabilir.

$$A_0 = 2\pi \left(\frac{D}{2}\right)^2 \quad (3.9)$$

Malzemeye uygulanan gerilime bağlı olarak oluşan gerinim ise 3.8 numaralı denklemde görülen ve λ ile gösterilen deformasyon oranıdır. Deformasyon oranı malzemenin başlangıç anındaki uzunluğu (L_0) ve sıkıştırma sırasında herhangi bir gerilim altındaki uzunluğu (L) yardımı ile hesaplanabilir.

$$\lambda = 1 - \frac{L}{L_0} \quad (3.10)$$

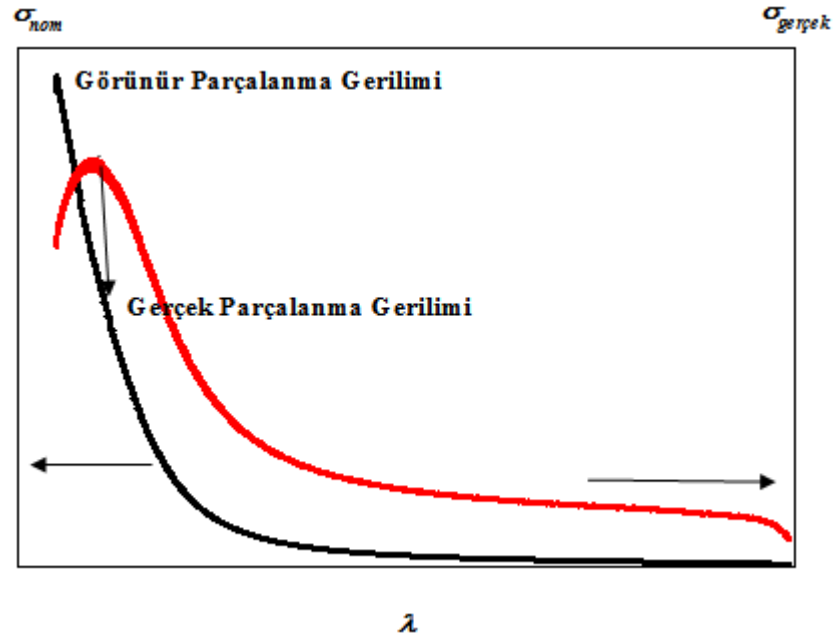
Deformasyon oranına karşı çizilen gerçek gerilim grafikleri yardımıyla malzemenin parçalandığı parçalanma gerilimi ($\sigma_{parçalanma}$) bulunabilir. Fibroin kriyojelleri için tipik λ - $\sigma_{gerçek}$ grafiği Şekil 3.3’de görülmektedir.



Şekil 3.3 : Fibroin kriyojelleri için tipik λ - $\sigma_{gerçek}$ grafiği.

Şekil 3.3’den görüldüğü üzere grafik 3 farklı bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölge malzemenin mekanik olarak dayanıklı olduğu bölgedir. İkinci bölgede malzemenin gözeneklerinin parçalanmasından dolayı bir plato bölgesi gözlenir. Üçüncü bölge ise hemen hemen malzemenin tüm gözeneklerinin parçalandığı ve eğimin hızlıca arttığı bölgedir.

Şekil 3.3’de görülen grafikte eğrinin üçüncü bölgede belli bir gerilim değerine kadar çıktıktan sonra düşüşe geçtiği görülmektedir. Bu maksimum noktasına denk gelen deformasyon oranı ile 3.8 numaralı eşitlik kullanılarak $\sigma_{gerçek}$ değerinden σ_{nom} değeri hesaplanır. Cihazdan elde edilen ilk nominal gerilim değerinden farklı olarak, gerçek gerilim yardımıyla hesaplanan bu nominal gerilim değerine parçalanma gerilimi ($\sigma_{parçalanma}$) denmektedir. Ayrıca, aynı malzeme için λ - $\sigma_{gerçek}$ eğrisiyle λ - σ_{nom} eğrisi aynı grafiğe çizilerek malzemenin gerçek parçalandığı yer λ - σ_{nom} eğrisi üzerinde şematik olarak da gösterilebilir. Bu gösterim Şekil 3.4’de verilmiştir.



Şekil 3.4 : Fibroin kriyojelleri için tipik λ - $\sigma_{gerçek}$ ve λ - σ_{nom} eğrileri.

3.4.3 Jellerin morfolojik özelliklerinin incelenmesi

Sentezlenen tüm SN, DN ve TN kriyojellerinin morfolojik özellikleri üç farklı büyütme oranında (x25, x100, x500) Jeol JSM 6335F Field Emission Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. SEM analizleri, kuru durumdaki örneklerin altın ile kaplanmasının ardından yapılmıştır. Elde edilen SEM sonuçları ile jellerin gözenek yapıları incelenmiştir.

3.4.4 ATR-FTIR ile fibroin yapısının aydınlatılması

Jelleşme ile fibroin zincirlerinde meydana gelen konformasyonel geçişler Fourier dönüşümlü kızılötesi (ATR-FTIR) spektrometre cihazı (Nicolet Nexus 6700) ile incelenmiştir. Elde edilen spektrumlarda Amid-I bölgesi ($1580-1720\text{ cm}^{-1}$) Peak Fit Version 4.12 SeaSolve Software yazılımı ile analiz edilmiştir. Bu yazılım ile önce gizli piklerin Gauss fonksiyonu yardımıyla görünür hale getirilmesi sağlanmıştır. Ardından sırasıyla β -tabaka, rastgele yumak, α -sarmal ve β -döngü konformasyonlarına karşılık gelen 1620 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} ve 1698 cm^{-1} piklerinin altında kalan alanlardan bu konformasyon oranları kantitatif olarak belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

İpek, değişik örümcek türleri ve ipek böceği tarafından epitel hücreler içinde sentezlenen, hidrofobik ve hidrofilik kısımlardan oluşan bir biyopolimerdir [1]. İpek, kendine has özellikleriyle kemik doku mühendisliğinde kullanıma uygun doğal polimerlerden bir tanesidir.

Bu tez çalışmasında biyouyumlu, biyobozunur, mekanik olarak dayanıklı ve üç boyutlu, makrogözenekler içeren fibroin iskeletleri üretilmiştir. Bu amaçla, fibroine makrogözenekli bir yapı kazandırılması sağlanmıştır. Gözenekli fibroin iskeletleri üretmenin çeşitli yöntemleri vardır ancak mekanik olarak dayanıklı ve makrogözenekli fibroin iskeletleri kriyojelasyon yöntemiyle üretilmektedir [22]. Kriyojelasyon tekniğiyle elde edilen fibroin iskeletlerinin, diğer tekniklerle elde edilen fibroin iskeletlerine oranla mekanik olarak daha dayanıklı olduğu literatürde rapor edilmiştir [35].

Araştırma grubumuz tarafından literatürde ilk kez fibroinin kriyojelasyonu ile makrogözenekli fibroin iskeletlerinin elde edilebileceği ortaya konmuştur [35]. Yapılan bu çalışmalarda, % 4,2 konsantrasyonundaki fibroin sulu çözeltilerinden BDDE çapraz bağlayıcısı ve TEMED katalizörü varlığında tek-ağyapılı (SN) fibroin kriyojelleri elde edilmiştir. Çift-ağyapılı (DN) ve üç-ağyapılı (TN) fibroin kriyojellerinin sentezi ise daha önce literatürde yayınlanmamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında, tek-ağyapılı fibroin iskeletlerinden yola çıkarak çift-ağyapılı ve üç-ağyapılı fibroin kriyojelleri üretilmiş ve tüm jeller karakterize edilmiştir. Aşağıdaki paragraflarda deneysel sonuçlar üç ana bölümde tartışılmıştır. Birinci bölümde tek-ağyapılı (SN) fibroin kriyojeli ve bu jelden sentezlenen çift-ağyapılı (DN) fibroin kriyojellerinin özellikleri incelenmiş ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır. İkinci bölümde, DN kriyojellerinin ikinci ağyapılarındaki çapraz bağlayıcı miktarının jellerin özelliklerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, ikinci ağyapının hazırlanmasında farklı miktarlarda BDDE çapraz bağlayıcısı kullanılmış, elde edilen DN kriyojellerinin özellikleri karşılaştırılmıştır. Üçüncü bölümde ise üç-

ağyapılı (TN) fibroin kriyojelinin özellikleri tartışılmış ve TN'nin özellikleri bu jelin üretiminde kullanılan SN ve DN ile karşılaştırılarak üç-ağyapılı jel tekniğinin de fibroin iskeletleri için mekanik dayanımı arttırmak amacıyla kullanılabileceği ortaya konmuştur. Üç ana başlıkta da kriyojellerin özellikleri şişme davranışları, SEM ile morfolojik analizler, ATR-FTIR ile fibroin zincir konformasyon analizi ve mekanik özellikler olmak üzere dört yöntem ile incelenmiştir.

4.1 Çift-Ağyapılı (DN) Fibroin Kriyojellerinin Özellikleri

Tek-ağyapılı (SN) fibroin kriyojelinden yola çıkarak çift-ağyapılı (DN) fibroin kriyojelleri üretilmiştir. Tüm DN kriyojellerinin sentezinde fibroin konsantrasyonu % 4,2 olan SN kriyojeli kullanılmıştır. Diğer bir deyişle; DN kriyojellerinde ilk ağyapıdaki fibroin konsantrasyonu % 4,2'de sabit tutulup ikinci ağyapıdaki fibroin konsantrasyonu artırılarak (n_{21} oranı artırılarak) sentez yapılmıştır. İkinci ağyapıda artan fibroin konsantrasyonundan dolayı ani jelleşmeleri en aza indirmek için kullanılan BDDE miktarının azaltılması gerekmiştir. Hacimce % 0,25 TEMED varlığında hazırlanan fibroin çözeltileriyle -18 °C'de gerçekleştirilen ve 24 saat süren kriyojellasyon işlemiyle SN ve DN kriyojelleri elde edilmiştir.

4.1.1 Kriyojellerin suda ve fibroin çözeltilerinde şişmeleri

4.1.1.1 SN kriyojelinin farklı konsantrasyonlardaki fibroin çözeltilerinde şişmesi ve n_{21} değerlerinin hesaplanması

Kuru durumdaki SN kriyojeli, DN kriyojellerinin sentezi amacıyla değişik konsantrasyonlarda fibroin içeren çözeltilere atılıp şişirilmiştir. Dengeye gelene kadar şişen jeller için kuru duruma göre kütlece şişme oranları (q_{wSN}) 3.3 numaralı denklem yardımıyla hesaplanmıştır. İkinci ağyapıdaki fibroinin birinci ağyapıdakine molar oranı olan ve DN jelleri için önemli bir parametre olan n_{21} değeri ise 4.1 numaralı eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

$$n_{21} = (q_{wSN} - 1) * C_{IF(2)} \quad (4.1)$$

Bu denklemde $C_{IF(2)}$; % olarak ikinci ağyapıdaki fibroin konsantrasyonunu göstermektedir. q_{wSN} değerinden “1” değerinin çıkarılmasının sebebi ise DN kriyojellerinin sentezi için kuru durumdaki SN kriyojelinin kullanılmasıdır. Yani; q_w

değerinin tanımı düşünüldüğünde; örneğin q_w değerinin 17 olması demek 1 g kuru jelin 16 g çözücü (burada fibroin çözeltisi) aldığı anlamına gelmektedir. Bu yüzden bu kuru jelin ağırlığı olarak “1” değeri q_{wSN} değerinden çıkarılmaktadır. Çizelge 4.1’de SN kriyojelinin değişik konsantrasyonlardaki fibroin çözeltisi içerisinde şişme çalışmasıyla elde edilen sonuçlar görülmektedir. Karşılaştırma yapabilmek için SN kriyojelinin sudaki şişme çalışmasından elde edilen sonuç da ($C_{IF(2)} = 0$) çizelgeye eklenmiştir.

Çizelge 4.1 : SN kriyojelinin farklı konsantrasyonlarda fibroin çözeltilerindeki şişmesi.

$C_{IF(2)}$	q_{wSN}	n_{21}
0	17 ± 1	0
0,072	15 ± 1	0,997
0,143	13 ± 2	1,694
0,205	11 ± 1	2,014
0,286	$9,8 \pm 1,2$	2,513

Çizelge 4.1 incelendiği zaman, SN kriyojelinin fibroin çözeltilerinde, sudakine kıyasla daha az şiştiği; çözeltilerde artan fibroin konsantrasyonu ile şişme derecesinin giderek azaldığı görülüyor. Artan fibroin konsantrasyonu ile çözelti viskozitesi artarak çözelti daha yoğun bir hale gelmekte ve dolayısıyla SN kriyojelinin bu çözelti içinde şişmesi azalmaktadır. Ayrıca çözelti içindeki fibroin moleküllerinin kriyojele uyguladığı osmotik basınç da jelin büzülmesinde etkili olabilir. Diğer yandan, 4.1 numaralı eşitlikle $C_{IF(2)}$ ve q_{wSN} yardımıyla hesaplanan n_{21} değerinin ise artan fibroin konsantrasyonu ile arttığı görülmektedir.

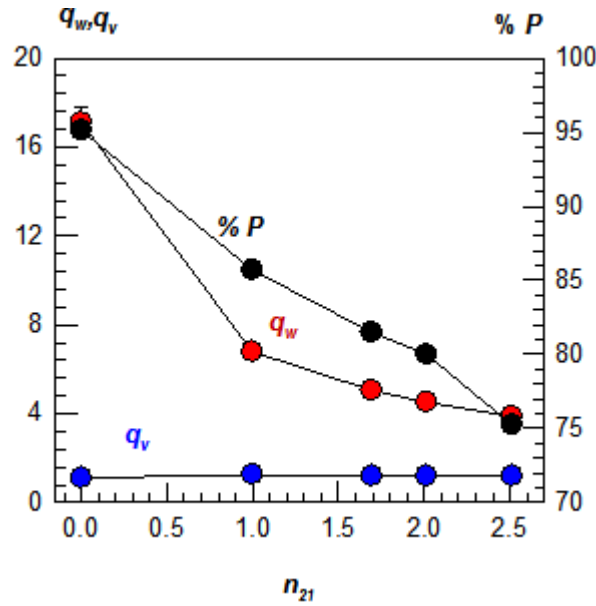
4.1.1.2 SN ve DN kriyojellerinin suda şişmeleri

Bölüm 3.4.1’de ayrıntılı şekilde anlatıldığı gibi jellerin sudaki şişmeleri de incelenmiştir. Jeller sentezlendikten sonra sentez sonrası, şişmiş durumdaki ve kuru durumdaki jellerin ağırlıkları ve çapları ölçülerek kütlece şişme (q_w), hacimce şişme (q_v), kütlece bağıl şişme (m_{rel}), hacimce bağıl şişme (v_{rel}), gözeneklilik (P) ve jel kesri (w_g) değerleri hesaplanarak jellerin şişme davranışları incelenmiştir. Bulunan bu değerler Çizelge 4.2’de görülmektedir.

Çizelge 4.2 : SN ve DN kriyojellerinin sudaki şişmeleri.

Jel Kodu	q_w	q_v	m_{rel}	v_{rel}	w_g	% P
SN	17±1	1,11±0,03	0,88±0,01	0,90±0,06	1,2±0,1	95
DN1	6,8±0,2	1,27±0,07	0,98±0,17	0,91±0,09	1,5±0,1	86
DN2	5,1±0,2	1,20±0,03	0,99±0,07	0,90±0,05	0,9±0,1	82
DN3	4,5±0,2	1,19±0,02	1,05±0,06	0,90±0,02	0,92±0,03	80
DN4	3,9±0,2	1,20±0,05	1,15±0,09	0,96±0,01	1,1±0,1	75

Şekil 4.1’de q_w , q_v ve P değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi görülmektedir. SN kriyojeli $n_{21}=0$ alınarak grafiğe eklenmiştir.

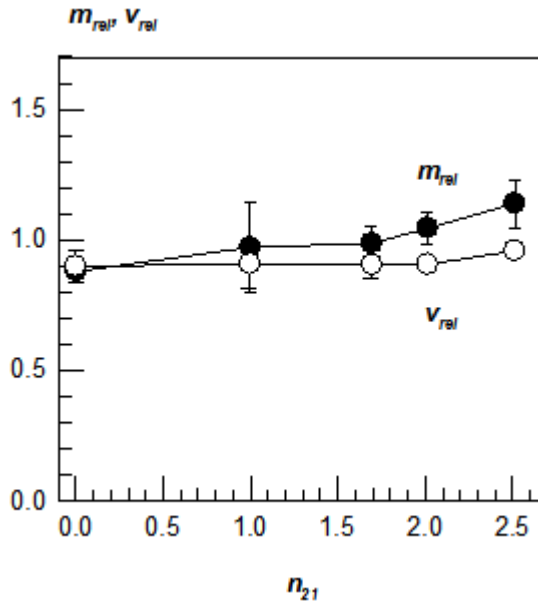


Şekil 4.1 : q_w (●), q_v (●) ve % P (●) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi.

Çizelge 4.1’de ve Şekil 4.1’de görüldüğü üzere, q_w değeri DN kriyojellerinde SN kriyojeline göre daha düşüktür. DN kriyojellerinde de n_{21} değeri arttıkça yani ikinci ağıyadaki fibroin konsantrasyonu arttıkça q_w değeri azalmaktadır. Diğer yandan q_v değeri ise SN ve DN kriyojelleri için yaklaşık 1 civarındadır ve fazla değişmemektedir. Bu sonuçlar şu şekilde yorumlanabilir: Kuru durumdaki fibroin kriyojelleri suya atıldığı zaman ağırlıklarında bir artış olmaktadır. Ancak bu artış, artan fibroin konsantrasyonu ile azalmaktadır. Suya atılan kuru durumdaki kriyojellerin hacimleri ise fazla değişmemektedir. Çünkü gözenekli bir yapıya sahip olan fibroin kriyojelleri suya atıldıkları zaman, su malzemenin gözeneklerine girmektedir. Böylece malzemenin ağırlığında bir artış olmakta ancak hacminde bir değişiklik olmamaktadır.

Ayrıca, Çizelge 4.1’de ve Şekil 4.1’de, 3.5 numaralı eşitlik yardımıyla hesaplanan ve q_w ile q_v değerlerine bağlı olan gözenekliliğin de azaldığı görülmektedir. SN kriyojeli için % 95 olarak hesaplanan gözeneklilik; DN kriyojelleri için n_{21} değeri arttıkça azalmaktadır. Diğer bir deyişle q_w değerinin azalmasıyla yani; q_v değeri değişmediğinden dolayı q_w ile q_v arasındaki farkın azalmasıyla malzemenin gözenekliliği de azalmaktadır.

Şekil 4.2’de ise fibroin kriyojelleri için kütlece ve hacimce bağıl şişme değerlerinin (m_{rel} ve v_{rel}) n_{21} değerine karşı çizilen grafiği görülmektedir.

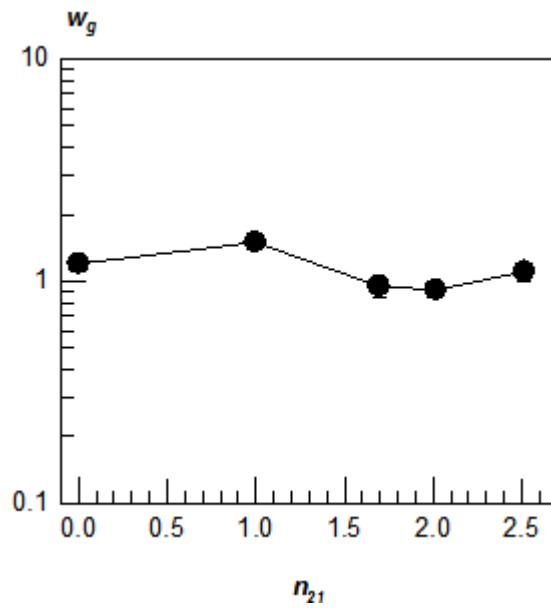


Şekil 4.2 : m_{rel} (●) ve v_{rel} (○) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi.

Sonuçlardan anlaşılacağı üzere; SN ve DN kriyojelleri için m_{rel} ve v_{rel} değerleri 0,9-1 civarındadır ve fazla değişmemektedir. Bunun sebebi, kütlece ve hacimce bağıl şişme değerlerinin, q_w ve q_v değerlerinin aksine kuru duruma göre değil sentez sonrası duruma göre hesaplanmasıdır. Kriyojelasyon işlemi süresince buzun kalıp görevi görmesiyle oluşan gözenekler, sentez sonrasında erimeyle birlikte içerisinde su içerirler. Dolayısıyla suya atılan jeller kütlece ve hacimce ilave bir şişme göstermemekte ve m_{rel} ve v_{rel} değerleri 0,9-1 civarında olmaktadır.

Şekil 4.3’de ise SN ve DN kriyojelleri için jel kesri (w_g) değerlerinin n_{21} oranına karşı çizilen grafiği görülmektedir. Jel kesri 1 g fibroinden elde edilen çapraz bağı fibroin (suda çözünmeyen) miktarıdır. SN kriyojelleri için 3.6 numaralı eşitlik kullanılarak; DN kriyojelleri için ise ikinci ağyapıya giren fibroin miktarının belirlenmesinden sonra hesaplanan jel kesri değerlerinin 1 civarında olduğu

görülmektedir. Bu sonuç bize, BDDE ile çapraz bağlanma reaksiyonları sırasında tüm fibroin moleküllerinin ağıyapıya girdiğini göstermektedir. Kriyojelasyon tekniğinde, reaksiyonların madde konsantrasyonunun yüksek olduğu donmamış mikrobölgelerde ilerlemesi bu yüksek dönüşümün temel nedenidir. Diğer yandan, BDDE kullanılmadan fibroin çözeltisinin -18°C 'de 24 saatte jelleşmediği görülmüştür. Bunun nedeni ise, fibroin zincirlerindeki karboksil gruplarının yarattığı osmotik basınç ile fibroin zincirleri arasındaki mesafenin artması ve hidrofobik kısımlar arasındaki etkileşmelerin azalmasıdır. Böylece β -tabaka oluşumu güçleşmekte ve jelleşme meydana gelmemektedir.



Şekil 4.3 : Jel kesri (w_g) değerinin n_{21} oranı ile değişimi.

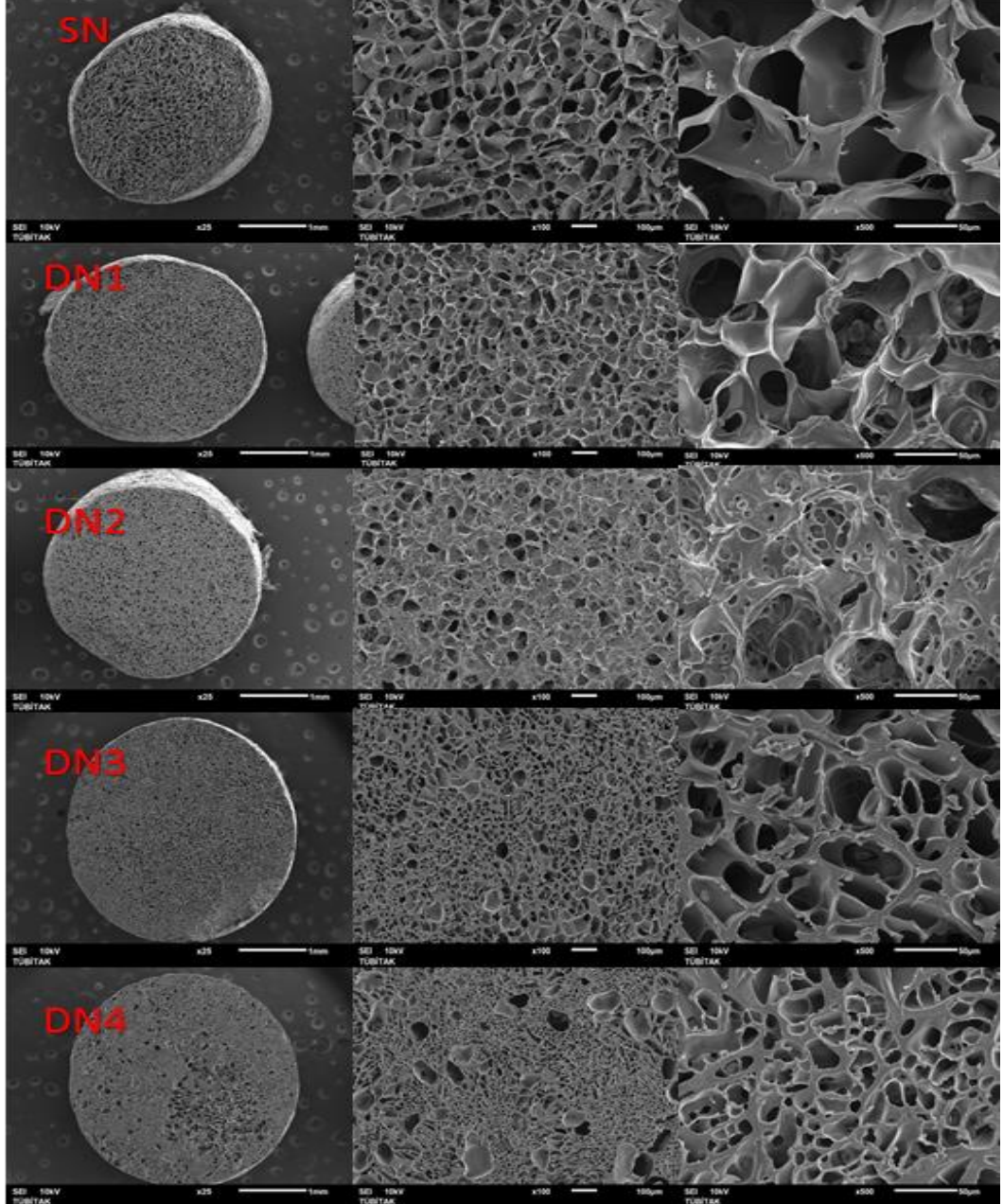
4.1.2 Morfolojik özellikler

SN ve DN kriyojellerinin morfolojik özelliklerini incelemek için kriyojellerin taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) görüntüleri çekilmiştir. SEM analizleri, kuru durumdaki jel numunelerinin altın ile kaplanmasının ardından gerçekleştirilmiştir. Elde edilen görüntüler 3 farklı büyütme oranıyla (x25, x100 ve x500) Şekil 4.4'de verilmiştir.

Şekil 4.4 incelendiğinde ortak özellik olarak tüm kriyojellerin makrogözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Kriyojelasyon tekniğinde, düşük sıcaklıklarda jel çözeltisindeki suyun donması ve reaksiyonların donmamış mikrobölgelerde ilerlemesiyle gözenek duvarları oluşmaktadır. Kriyojelasyon işleminin ardından oda

sıcaklığına getirilen jellerin buz kristalleri eriyerek makrogözenekli bir yapının oluşması sağlanır [34].

Diğer yandan, Şekil 4.4'den DN kriyojellerinin SN kriyojeline göre gözenek boyutlarının daha küçük olduğu görülmektedir. DN kriyojellerinde ikinci ağıyapıdaki fibroin konsantrasyonu arttıkça gözenek boyutu küçülmekte ve gözenek duvarları kalınlaşmaktadır.



Şekil 4.4 : SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin SEM görüntüleri.

SEM görüntülerinden 10 farklı gözenek boyutu ölçülerek fibroin iskeletleri için ortalama bir gözenek boyutu belirlenmiştir. Bulunan bu sonuçlar μm cinsinden standart sapma değerleriyle birlikte Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3 : SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin gözenek boyutları.

Jel Kodu	Gözenek Boyutu (μm)
SN	33 ± 7
DN1	25 ± 6
DN2	20 ± 6
DN3	15 ± 5
DN4	10 ± 3

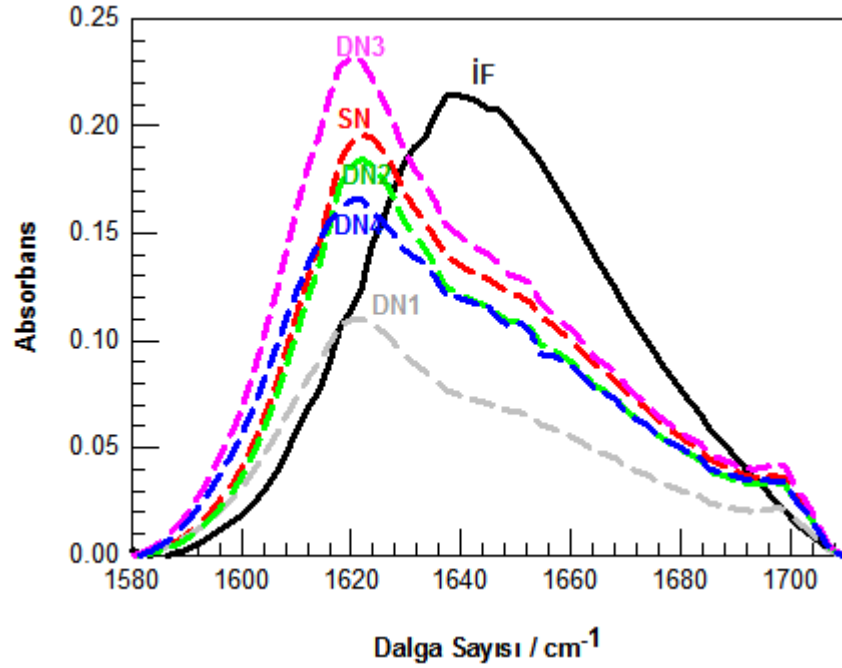
Kriyojellerin gözenek boyutları, donarak kalıp etkisi yapan ve gözenekli bir yapının oluşmasını sağlayan çözücü (su) miktarına bağlıdır. DN kriyojellerinin eldesinde ikinci ağyapıyı hazırlama aşamasında kullanılan fibroin çözeltisinin konsantrasyonunun artmasıyla su miktarı azalmaktadır. Azalan su ile kalıp etkisi yapan buz miktarı da azalmakta ve gözenek boyutları küçülmektedir. Ayrıca, reaksiyonların gerçekleştiği donmamış mikrobölgelerdeki fibroin konsantrasyonunun artması, gözenek duvarlarının kalınlaşmasını sağlamaktadır.

4.1.3 ATR-FTIR analizleri

SN ve DN kriyojellerindeki fibroinin konformasyon analizi ATR-FTIR cihazı ile yapılmıştır. Jelleşme öncesi ve sonrası fibroinin IR spektrumu karşılaştırılarak, BDDE ile jelleşme sonucu β -tabaka yapılarının oluştuğu piklerin kaymasından anlaşılmıştır. Ayrıca, ATR-FTIR cihazındaki ölçümlerden sonra elde edilen spektrumlar yardımıyla fibroin yapısındaki β -tabaka, rastgele yumak, α -sarmal ve β -döngü konformasyonları kantitatif olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.5’de jelleşme öncesi fibroinin ve jelleşme sonrası SN ve DN kriyojellerinin Amid-I bölgesinin ($1580\text{-}1710\text{ cm}^{-1}$) ATR-FTIR spektrumları verilmiştir. Siyah düz çizgi ile gösterilen ve 1640 cm^{-1} dalga sayısında görülen pik, kriyojelleşmeye tabi tutulmadan dondurmalı kurutucuda kurutulan fibroine aittir. Kesikli çizgilerle ve farklı renklerde gösterilen 1620 cm^{-1} dalga sayısında görülen pikler ise kurutulmuş durumdaki SN ve DN fibroin kriyojellerine aittir. 1640 cm^{-1} ’de görülen pikin 1620 cm^{-1} ’e kayması, BDDE ile gerçekleştirilen jelleşme işlemiyle, fibroin zincirlerinde rastgele yumak yapıdan β -tabaka yapısına geçiş olduğunu gösterir. Yani, fibroinin

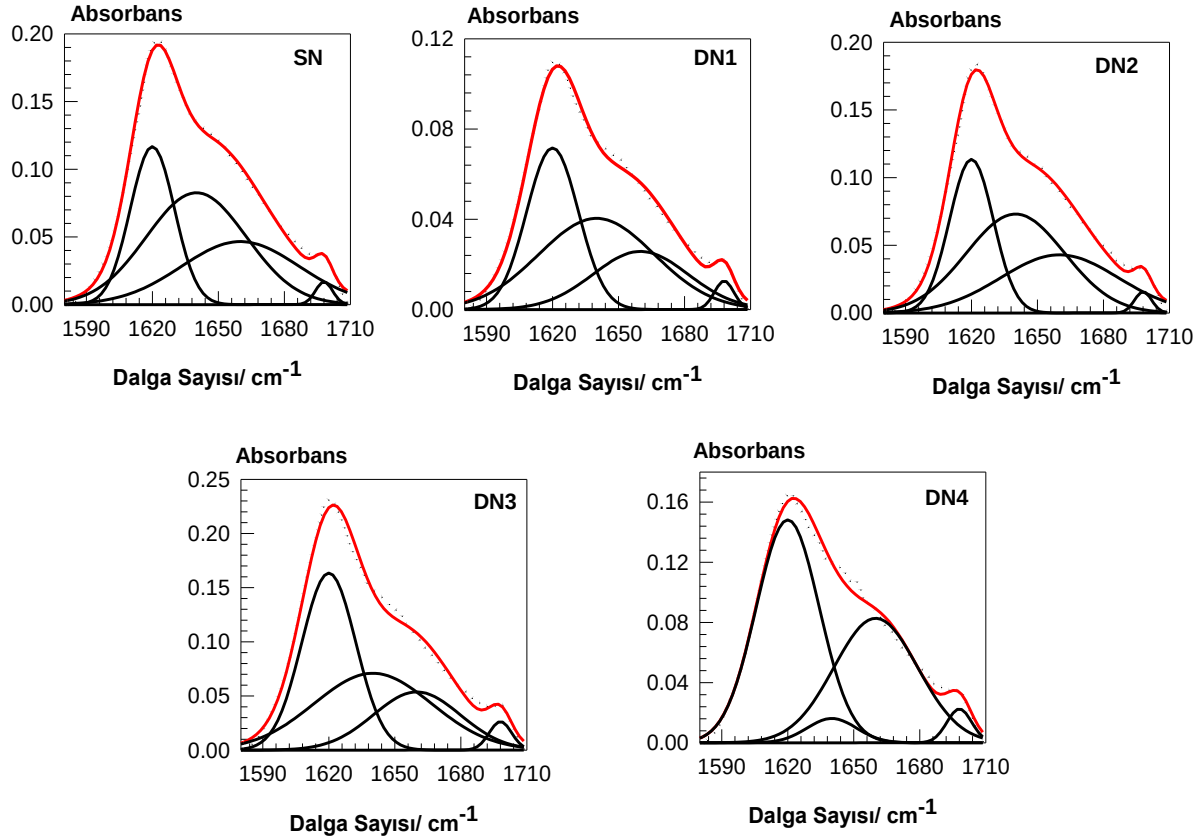
jelleşmesinin temel nedeni, fibroin zincirlerinde meydana gelen konformasyonel geçişler ve hidrofobik kısımlar arasında meydana gelen β -tabaka yapılarıdır.



Şekil 4.5 : Jelleşme öncesi ipek fibroinin ve jelleşme sonrası SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin ATR-FTIR spektrumları.

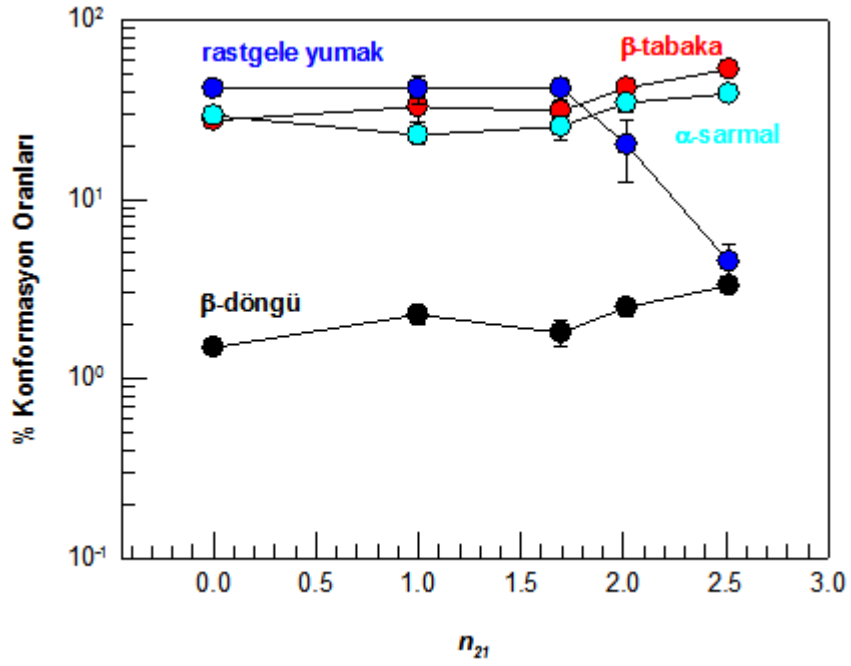
Fibroinin yapısındaki β -tabaka, rastgele yumak, α -sarmal ve β -döngü konformasyonlarını kantitatif olarak belirleyebilmek için Peak Fit (Version 4.12 SeaSolve Software) yazılımı kullanılmıştır. Amid-I bölgesindeki pikleri ayırabilmek için spektrumlara önce doğrusal düzeltme uygulanmıştır. Ardından, Gauss modeli ile uygun eğriler oluşturularak orjinal spektrumlarda pikin altındaki gizli pikler ortaya çıkarılıp; bu piklerin altında kalan alanların hesaplanmasıyla konformasyon oranları % olarak belirlenmiştir. Gauss modeli uygulandıktan sonra sabitlenen ve fibroin için karakteristik olan 1620 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} ve 1698 cm^{-1} pikleri sırasıyla β -tabaka, rastgele yumak, α -sarmal ve β -döngü yapılarını göstermektedir.

SN ve DN kriyojelleri için Peak Fit yazılımıyla elde edilen grafikler Şekil 4.6'da görülmektedir. Bu grafiklerde noktalı çizgiler orjinal spektrumu göstermektedir. Kırmızı çizgiler, Peak Fit yazılımıyla ve eğri uydurma yoluyla elde edilen spektrumlardır. Bu spektrumların altında kalan ve 1620 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} ve 1698 cm^{-1} dalga sayılarına karşılık gelen pikler veren siyah çizgiler ise yazılım sayesinde ortaya çıkarılmış ve sırasıyla β -tabaka, rastgele yumak, α -sarmal ve β -döngü yapılarına karşılık gelen gizli piklerdir.



Şekil 4.6 : SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin ATR-FTIR spektrumlarına PeakFit yazılımıyla Gauss modelinin uygulanmasıyla elde edilen eğriler.

1620 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} ve 1698 cm^{-1} dalga sayılarına karşılık gelen piklerin altındaki alanlardan β -tabaka, rastgele yumak, α -sarmal ve β -döngü konformasyon oranları % olarak hesaplanmıştır. Elde edilen % konformasyon oranları Şekil 4.7’de kriyojellerin n_{21} değerlerine karşı grafiğe çizilmiştir. SN kriyojeli $n_{21} = 0$ alınarak grafiğe eklenmiştir. n_{21} değerinin 1,5’un üzerine çıkmasıyla birlikte fibroin yapısındaki rastgele yumak yüzdesi azalmakta; buna karşılık β -tabaka, α -sarmal ve β -döngü yüzdeleri ise artmaktadır. Çünkü; ikinci ağıyapıda artan fibroin konsantrasyonu ile birlikte fibroin moleküllerinin hareketliliği azalmakta ve zincirler birbirine yakınlaşmakta; böylece moleküler arası etkileşimler kuvvetlenerek fibroin yapısında rastgele yumak halde bulunan kısımlar β -tabaka, α -sarmal ve β -döngü yapılarına dönüşmektedir.



Şekil 4.7 : Rastgele yumak (●), β -tabaka (●), β -döngü (●) ve α -sarmal yapı (●) yüzdelerinin n_{21} oranıyla değişimi.

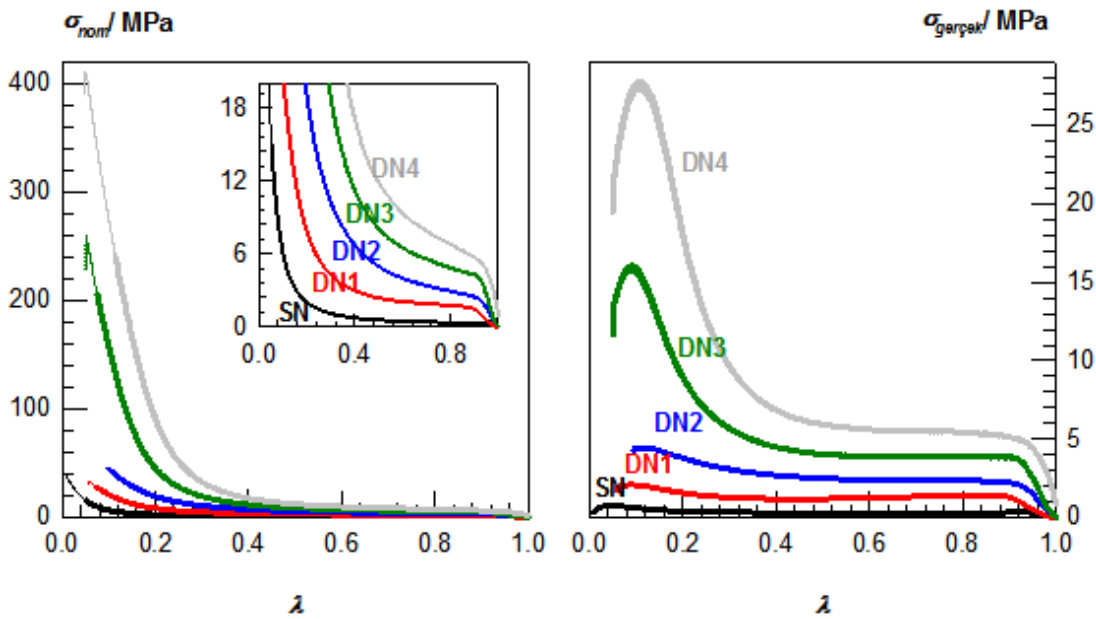
Fibroin çözeltisinin jelleşme öncesi $\% 12 \pm 2$ olarak hesaplanan β -tabaka yüzdesi; jelleşmeyle birlikte DN kriyojellerinde $\% 53 \pm 1$ değerine kadar çıkmıştır. Bu da bize β -tabaka oluşumuyla jelleşmenin gerçekleşmesi arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. BDDE molekülleri fibroin zincirlerindeki hidrofilik kısımlarla reaksiyona girerek molekülün hareketliliğinin kısıtlanmasını ve hidrofobik kısımlar arası etkileşmelerin kuvvetlenmesini sağlar. Hidrofobik kısımlar arasında β -tabaka yapılarının oluşmasıyla da jelleşme meydana gelir [23].

4.1.4 Mekanik testler

SN ve DN kriyojellerinin mekanik özelliklerini incelemek amacıyla Zwick-Roell Z 0.05 ve Devotrans mekanik test cihazları kullanılmıştır. Bölüm 3.4.2'de ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi jellerin tek eksenli sıkıştırma testleri yapılarak mekanik özellikleri belirlenmiştir. Mekanik testler her kriyojelin hem kuru durumdaki hem de şişmiş durumdaki hali için yapılmış ve kuru durumdaki kriyojeller kendi içinde; şişmiş durumdaki kriyojeller kendi içinde karşılaştırılmıştır. Ayrıca aynı kriyojelin kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki mekanik özellikleri birbiriyle de karşılaştırılarak kuru durumdaki kriyojellerin şişmiş durumdaki kriyojellere göre mekanik üstünlükleri ortaya konmuştur.

4.1.4.1 Kuru durumdaki kriyojellerin karşılaştırılması

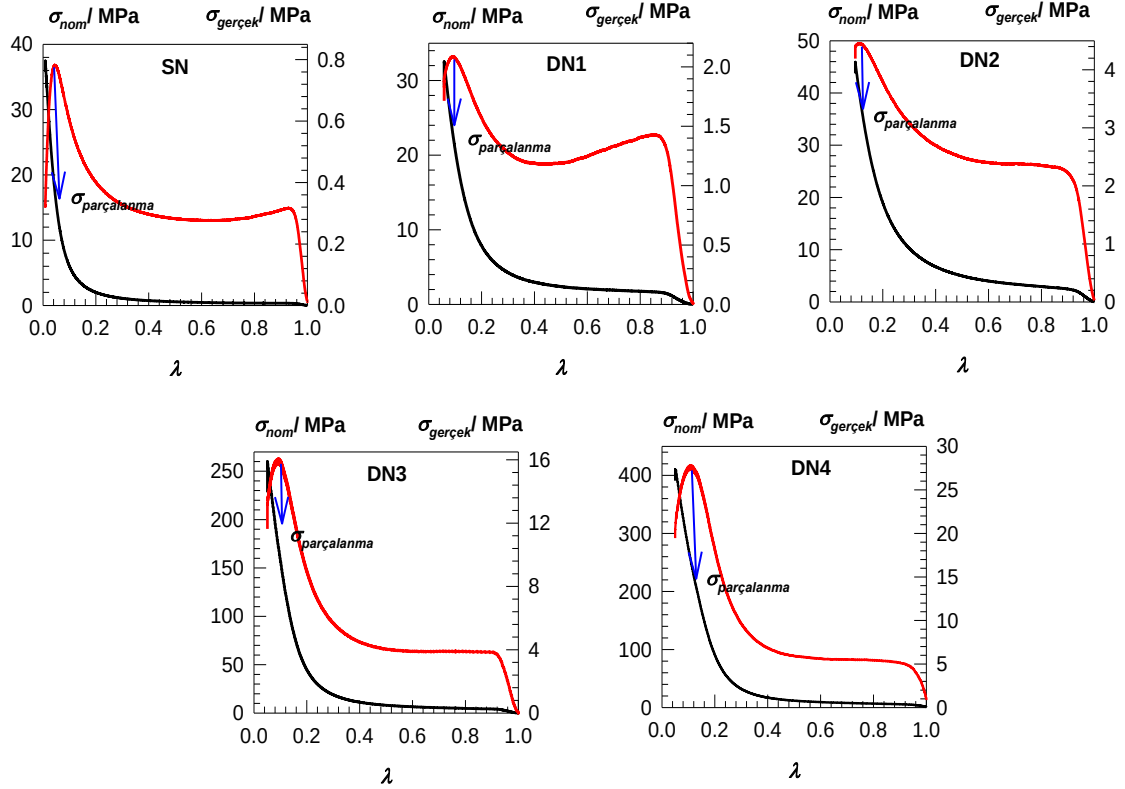
Şekil 4.8’de kuru durumdaki kriyojellerin mekanik test çalışmaları sonucunda elde edilen verilerle çizilen deformasyon oranı-nominal gerilim ($\lambda-\sigma_{nom}$) ve deformasyon oranı-gerçek gerilim ($\lambda-\sigma_{gerçek}$) grafikleri görülmektedir. $\lambda-\sigma_{nom}$ grafiğinde ince çizgiler cihazdan elde edilen nominal gerilim değerleriyle çizilen; kalın çizgiler ise jellerin gerçek parçalanma geriliminin belirlenmesinin ardından düzeltme yapılarak çizilen eğrilerdir.



Şekil 4.8 : Kuru durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin mekanik testleri sonucunda elde edilen $\lambda-\sigma_{nom}$ ve $\lambda-\sigma_{gerçek}$ grafikleri.

Şekil 4.8’den kuru durumdaki DN kriyojellerinin SN kriyojeline göre mekanik olarak daha dayanıklı olduğu görülüyor. DN kriyojellerinin ikinci ağyapılarındaki fibroin konsantrasyonu arttıkça, yani DN1, DN2, DN3 ve DN4 sırasıyla (bkz. Çizelge 3.1) malzemenin mekanik özelliklerindeki iyileşme de artmaktadır. Gerek $\lambda-\sigma_{nom}$ ve gerekse $\lambda-\sigma_{gerçek}$ grafiklerinde görülen plato bölgesi ile $\lambda-\sigma_{gerçek}$ grafiğinde malzemelerin kırıldığı maksimum noktasının aynı sırayla yükselerek malzemelerin daha dayanıklı hale geldikleri de görülmektedir.

Şekil 4.9’da her bir kriyojel için $\lambda-\sigma_{nom}$ ve $\lambda-\sigma_{gerçek}$ eğrileri aynı grafikte karşılaştırılmıştır. Kırmızı eğriler $\lambda-\sigma_{gerçek}$, siyah eğrilerse $\lambda-\sigma_{nom}$ grafiklerini göstermektedir. Şekilde $\lambda-\sigma_{gerçek}$ eğrilerinde oluşan maksimum noktalarından $\lambda-\sigma_{nom}$ eğrilerine inilen mavi oklarla kriyojellerin gerçek parçalandığı yerler şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.9 : Kuru durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojelleri için parçalanma gerilimlerinin ($\sigma_{parçalanma}$) belirlendiği grafikler.

Çizelge 4.4’de ise kriyojellerin mekanik testleri sonucunda elde edilen tüm sonuçlar verilmiştir. Çizelgede E , σ_{plato} , σ_{comp} , $\sigma_{parçalanma}$ ve λ sırasıyla Young modülü, plato gerilimi, basınç dayanımı, parçalanma gerilimi ve kriyojelin parçalandığı andaki deformasyon oranını (λ - $\sigma_{gerçek}$ grafiğinde maksimum noktasının olduğu yerdeki λ değeri) göstermektedir.

Çizelge 4.4 : Kuru durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin mekanik test sonuçları.

Jel Kodu	E (MPa)	σ_{plato} (MPa)	σ_{comp} (MPa)	$\sigma_{parçalanma}$ (MPa)	λ
SN	7 ± 1	$0,33 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,03$	15 ± 3	$0,05 \pm 0,01$
DN1	$11,2 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	$0,24 \pm 0,05$	28 ± 5	$0,085 \pm 0,006$
DN2	35 ± 3	$3,0 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,1$	43 ± 4	$0,098 \pm 0,007$
DN3	68 ± 11	$4,2 \pm 1,2$	$1,6 \pm 0,7$	205 ± 24	$0,091 \pm 0,008$
DN4	58 ± 15	$4,7 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,8$	240 ± 24	$0,097 \pm 0,006$

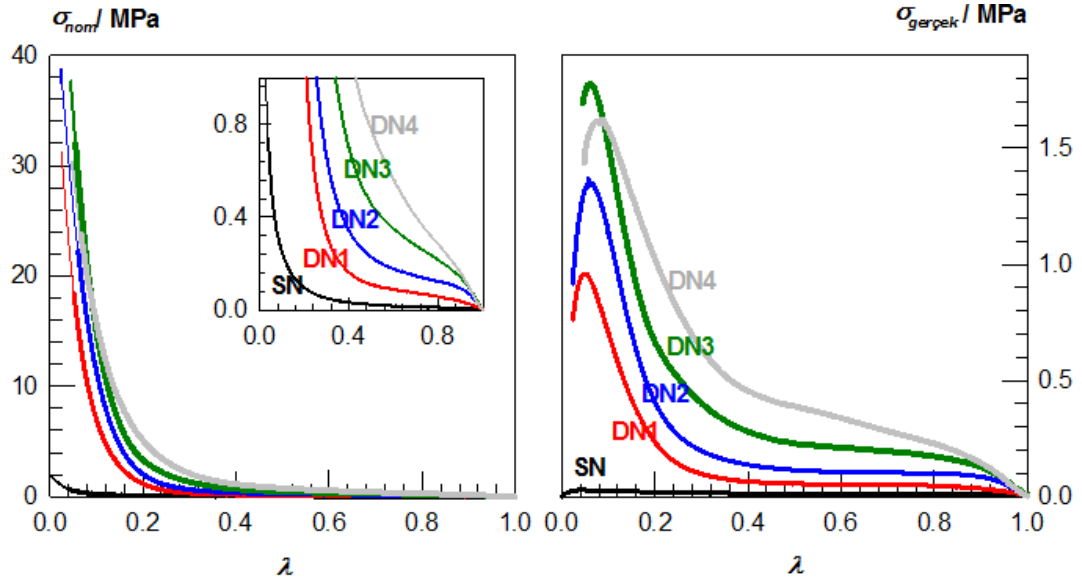
Tüm sonuçlar incelendiği zaman SN’den DN4’e gidildikçe yani ikinci ağyapıdaki fibroin konsantrasyonu arttıkça mekanik özelliklerin hepsinde iyileşme olmaktadır. Young modülü (E) gerinim-gerilim grafiklerinde % 2-4 gerinim aralığındaki doğrunun eğimidir ve malzemelerin mekanik özellikleri için önemli bir parametredir.

Plato gerilimi (σ_{plato}), gerinim-gerilim grafiklerinde plato bölgesinin olduğu yerden belirlenen ve malzemelerin gözeneklerinin dayanıklılığı hakkında bilgi veren bir parametredir. Plato geriliminin artmasıyla malzemelerin gözeneklerinin daha dayanıklı hale geldiği söylenebilir. Basınç dayanımı da % 3 gerinim değerine karşılık gelen gerilim değeri olup, bu değerin $0,16 \pm 0,03$ MPa değerinden $2,8 \pm 0,8$ MPa değerine yükselmesi malzemelerin mekanik dayanımının yükseldiğini gösteren bir diğer kanıttır. SN kriyojeli için 15 ± 3 MPa olan $\sigma_{parçalanma}$ değeri; DN kriyojellerinde 240 ± 24 MPa değerine kadar arttırılabilmektedir. İkinci ağyapıda artan fibroin konsantrasyonu ile kriyojellerin $\sigma_{parçalanma}$ değeri artmaktadır. Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak fibroin kriyojellerinde ikinci ağyapıda artan fibroin konsantrasyonu ile yani artan n_{21} oranı ile kriyojellerin mekanik olarak daha dayanıklı hale geldiği söylenebilir.

4.1.4.2 Şişmiş durumdaki kriyojellerin karşılaştırılması

Kuru durumdaki kriyojellerde olduğu gibi şişmiş durumdaki kriyojeller de birbiriyle karşılaştırılmıştır. Şişmiş durumdaki DN kriyojelleri SN'den mekanik olarak daha dayanıklıdır. Ayrıca ikinci ağyapıda artan fibroin konsantrasyonu ile DN kriyojellerinin mekanik özelliklerinin iyileştiği şişmiş durumdaki kriyojellerde de görülmektedir.

Şekil 4.10'da şişmiş durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 fibroin kriyojelleri için çizilen λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri görülmektedir. İnce çizgiler cihazdan elde edilen nominal gerilim değerleriyle çizilen; kalın çizgiler ise kriyojellerin gerçek parçalanma geriliminin belirlenmesinin ardından düzeltme yapılarak çizilen eğrilerdir. Kuru durumdaki kriyojellerde olduğu gibi şişmiş durumdaki kriyojellerde de SN'den DN4'e gidildikçe malzemenin mekanik özelliklerinde iyileşme olmaktadır.



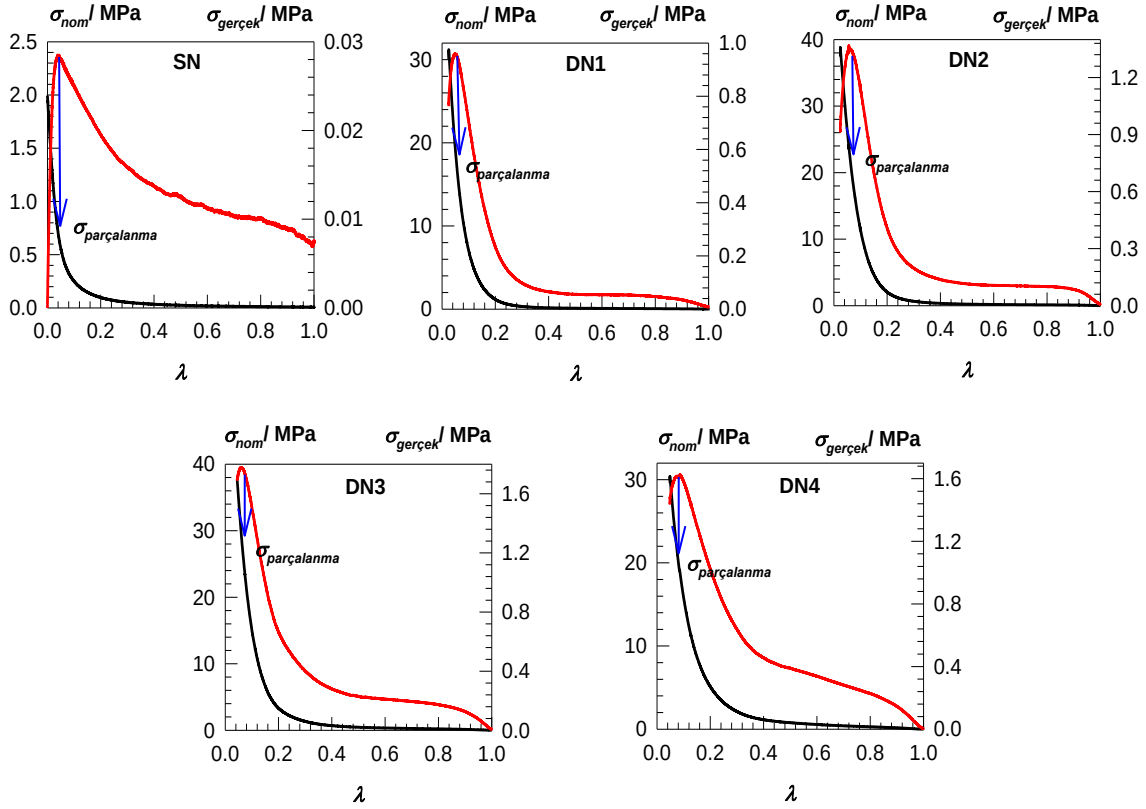
Şekil 4.10 : Şişmiş durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin mekanik testleri sonucunda elde edilen λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri.

Çizelge 4.5’de ise şişmiş durumdaki kriyojellerin mekanik test sonuçları toplu halde verilmiştir.

Çizelge 4.5 : Şişmiş durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin mekanik test sonuçları.

Jel Kodu	E (MPa)	σ_{plato} (MPa)	σ_{comp} (MPa)	$\sigma_{parçalanma}$ (MPa)	λ
SN	0,03±0,01	0,009±0,003	0,008±0,003	0,7±0,3	0,04±0,01
DN1	0,43±0,09	0,050±0,002	0,021±0,004	19±2	0,049±0,001
DN2	1,2±0,3	0,13±0,01	0,034±0,007	23±3	0,059±0,003
DN3	1,4±0,3	0,15±0,03	0,04±0,01	32±2	0,069±0,007
DN4	1,6±0,6	0,22±0,03	0,037±0,015	24±4	0,07±0,01

Şekil 4.11’de her bir kriyojel için λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ eğrileri aynı grafiklerde karşılaştırılmaktadır. Kırmızı eğrilerle λ - $\sigma_{gerçek}$, siyah eğrilerle λ - σ_{nom} grafikleri, mavi oklarla da parçalanma gerilimleri gösterilmiştir.

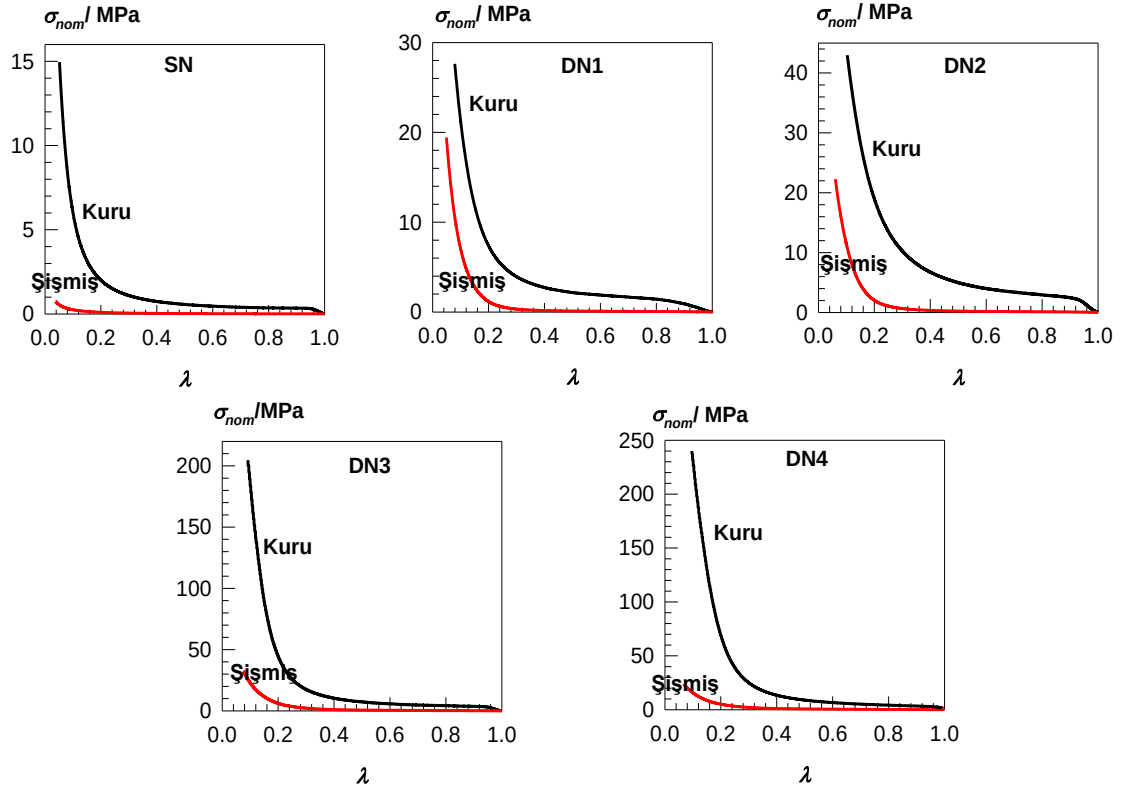


Şekil 4.11 : Şişmiş durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojelleri için parçalanma gerilimlerinin ($\sigma_{parçalanma}$) belirlendiği grafikler.

DN tekniğiyle üretilen malzemelerin mekanik üstünlükleri hem kuru durumdaki hem de şişmiş durumdaki kriyojeller için ortaya konmuştur. Kuru durumdaki kriyojellerin özellikleri ile şişmiş durumdaki kriyojellerin özellikleri karşılaştırıldığında ise kuru durumdaki kriyojellerin mekanik özelliklerinin daha iyi olduğu görülmektedir. Kuru durumdaki kriyojellerle şişmiş durumdaki kriyojellerin karşılaştırılması ayrıntılı olarak bir sonraki bölümde yapılmıştır.

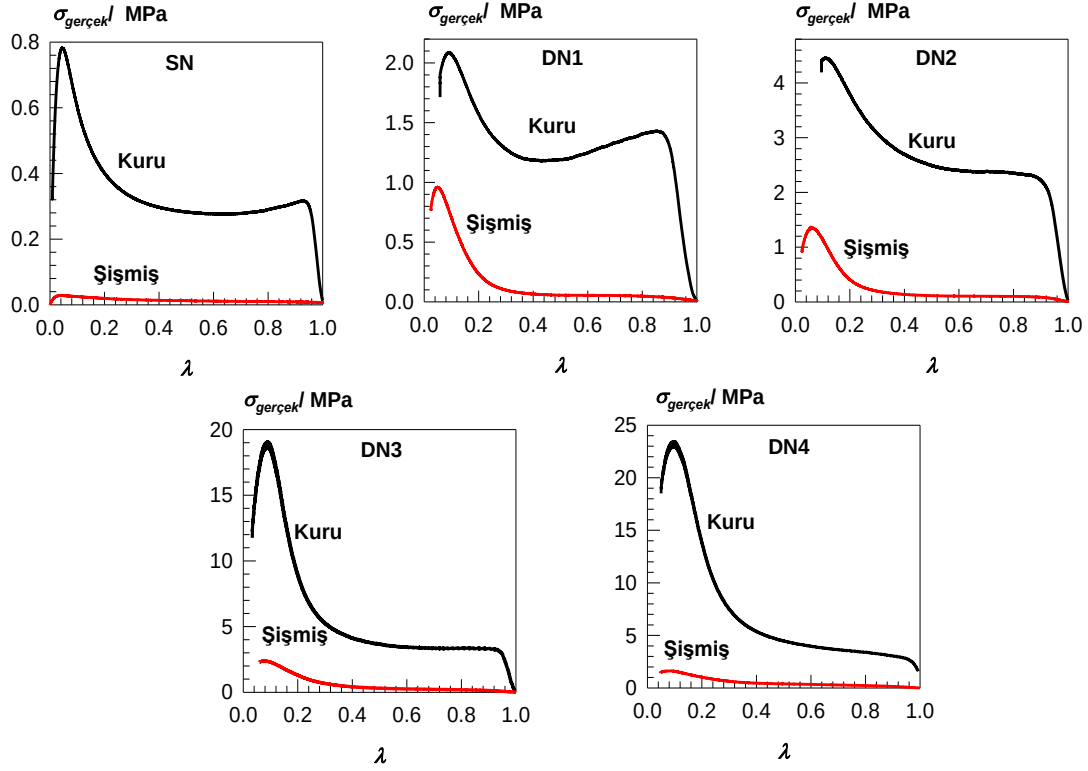
4.1.4.3 Kuru durumdaki kriyojellerin şişmiş durumdaki kriyojellerle karşılaştırılması

Şekil 4.12’de her bir kriyojel için kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki λ - σ_{nom} eğrileri karşılaştırılmıştır. Grafikler, kriyojellerin parçalanma gerilimleri bulunduktan sonra nominal gerilim değerlerine düzeltme uygulanarak çizilmiştir.



Şekil 4.12 : Kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin mekanik özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla çizilen λ - σ_{nom} eğrileri.

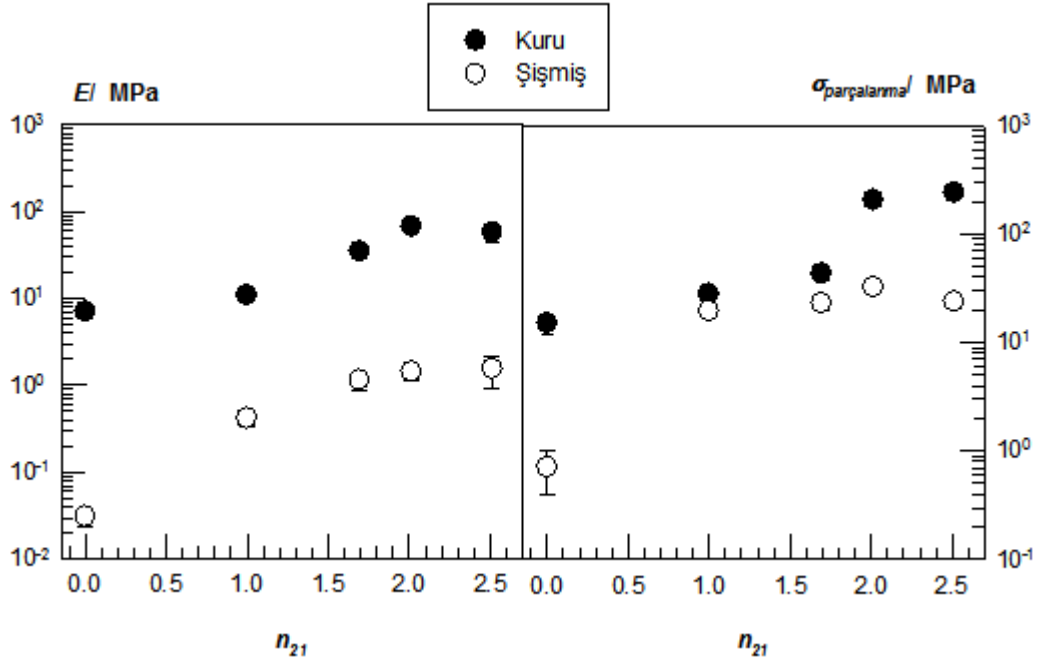
Şekil 4.13’de ise λ - $\sigma_{gerçek}$ eğrileriyle kuru ve şişmiş durumdaki kriyojellerin karşılaştırılması yapılmıştır.



Şekil 4.13 : Kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki SN, DN1, DN2, DN3 ve DN4 kriyojellerinin mekanik özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla çizilen λ - $\sigma_{gerçek}$ eğrileri.

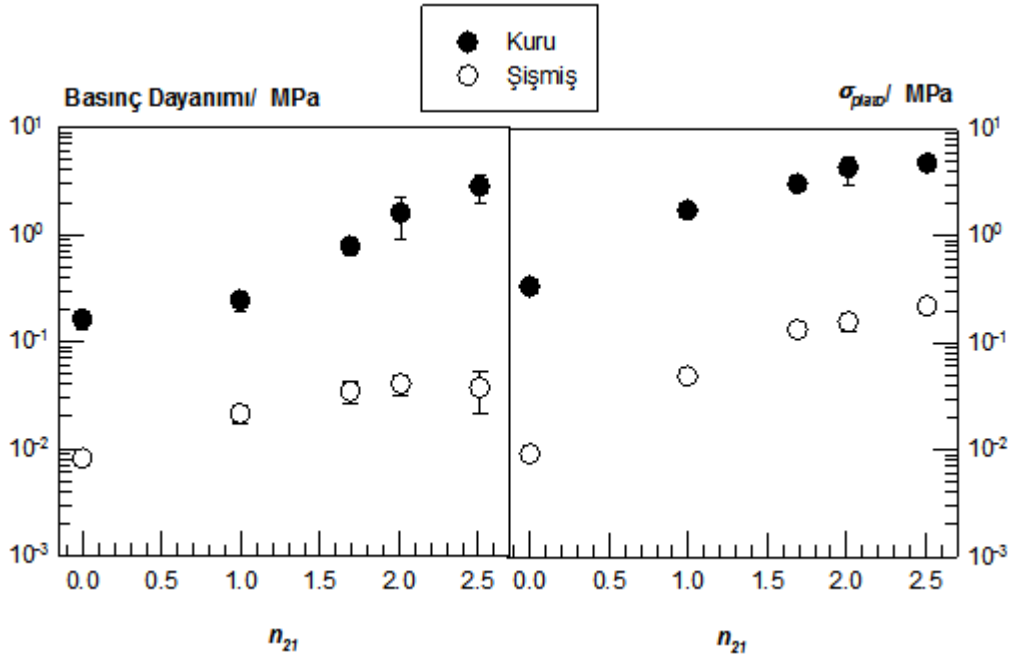
Hem şekil 4.12'deki λ - σ_{nom} grafiklerinden hem de Şekil 4.13'deki λ - $\sigma_{gerçek}$ grafiklerinden görüldüğü üzere kuru durumdaki kriyojellerin mekanik özellikleri şişmiş durumdaki kriyojellere göre daha iyidir.

Şekil 4.13'de ise kriyojellerin Young modül (E) ve parçalanma gerilimi ($\sigma_{parçalanma}$) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi görülmektedir. Artan n_{21} oranıyla, yani ikinci ağyapıdaki fibroin konsantrasyonunun artması ile birlikte hem kuru durumdaki hem de şişmiş durumdaki kriyojellerin E ve $\sigma_{parçalanma}$ değerlerinde artış olmaktadır.



Şekil 4.14 : Kriyojellerin Young modülleri (E) ve parçalanma gerilimleri ($\sigma_{parçalanma}$) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi.

Şekil 4.15’de ise basınç dayanımı (σ_{comp}) ve plato gerilimi (σ_{plato}) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi verilmektedir. n_{21} oranının artmasıyla basınç dayanımı ve plato gerilimi değerlerinin hem kuru hem de şişmiş durumdaki kriyojellerde artarak malzemelerin daha dayanıklı hale geldikleri görülmektedir.



Şekil 4.15 : Kriyojellerin basınç dayanımı (σ_{comp}) ve plato gerilimi (σ_{plato}) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi.

Özet olarak; mekanik testlerde elde edilen sonuçlarla kuru durumdaki kriyojellerin şişmiş durumdaki kriyojellere kıyasla daha dayanıklı olduğu; ayrıca ikinci ağyapıda artan fibroin konsantrasyonu ile yani artan n_{21} oranıyla birlikte malzemelerin mekanik özelliklerinde iyileşme olduğu gözlenmiştir. Mekanik test sonuçları, diğer sonuçlarla da uyumludur. Örneğin ATR-FTIR analizlerinde artan n_{21} oranı ile birlikte fibroin kriyojellerindeki β -tabaka yüzdelерinin de arttığı tespit edilmiştir. β -tabaka yapılarının jelleşmenin temel sebebi olduğu ve malzemeye sertlik ve dayanıklılık kazandırdığı daha önceki çalışmalardan bilinmektedir [35]. Ayrıca SEM analizleriyle DN kriyojellerinde ikinci ağyapıda artan fibroin konsantrasyonundan dolayı gözenek boyutlarının küçüldüğü ve gözenek duvarlarının kalınlaştığı görülmüştü. Gözenek boyutu ve gözenek duvarları mekanik dayanıklılığın bir ölçüsü olarak kabul edilebilir. Gözeneklerin küçük olması ve gözenek duvarlarının ise donmamış mikrobölgelerde artan fibroin konsantrasyonundan dolayı daha kalın olması, malzemelerin mekanik olarak daha dayanıklı olmasını sağlamaktadır. Mekanik dayanıklılık kemik doku mühendisliği için oldukça önemli bir parametredir ve bu çalışmada çift-ağyapılı jel ve kriyojelasyon yöntemleriyle mekanik dayanımı daha önce yayınlanan fibroin iskeletlerinden oldukça fazla olan malzemeler üretilmiştir.

4.2 İkinci Ağyapıdaki Çapraz Bağ Miktarının Çift-Ağyapılı Fibroin Kriyojellerinin Özelliklerine Etkisi

İkinci ağyapıdaki çapraz bağ miktarının DN kriyojellerinin özelliklerine etkisini incelemek için ikinci ağyapıdaki BDDE miktarı farklı olan 3 DN kriyojeli sentezlenmiştir. Tüm DN kriyojellerinin birinci ve ikinci ağyapılarındaki fibroin konsantrasyonları sırasıyla % 4,2 ve % 28,6 olarak sabit tutulmuştur. DN kriyojellerinden bir tanesi önceki bölümde incelenmiş olan, ikinci ağyapıda 1 g fibroin başına 1,5 mmol epoksi olacak şekilde BDDE içeren DN4 kodlu jeldir. Diğer iki DN kriyojelinin sentezinde ise ikinci ağyapıdaki BDDE miktarı 0,750 mmol/g ve 0,375 mmol/g olarak alınarak DN4' ve DN4'' kodlu kriyojeller elde edilmiştir.

4.2.1 Kriyojellerin suda ve fibroin çözeltilerinde şişmeleri

4.2.1.1 SN kriyojelinin farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı içeren fibroin çözeltilerinde şişmesi ve n_{21} değerlerinin hesaplanması

SN kriyojelinin farklı konsantrasyonlarda BDDE çapraz bağlayıcısı içeren % 28,6'lık fibroin çözeltisinde şişirilmesiyle DN kriyojelleri elde edilmiştir. Yapılan ölçümler, fibroin konsantrasyonunun sabit tutulmasına karşın SN kriyojelinin şişme derecesinin BDDE miktarına bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir. Karşılaştırma yapabilmek için SN kriyojelinin sudaki şişme çalışmasından elde edilen sonuç da ($C_{IF(2)} = 0$) çizelgeye eklenmiştir. "2" alt indisi ikinci ağyapıyı temsil etmektedir.

Çizelge 4.6 : SN kriyojelinin farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı içeren fibroin çözeltilerindeki şişmesi.

$C_{IF(2)}$	Epoksi (2) mmol/g	q_{wSN}	n_{21}
0	-	17 ± 1	0
0,286	1,5	$9,8 \pm 1,2$	2,513
0,286	0,75	$8,8 \pm 0,7$	2,236
0,286	0,375	8 ± 1	2,059

Fibroin çözeltisindeki BDDE miktarının artışı ile SN kriyojelinin giderek daha fazla şiştiği yani şişme oranının arttığı görülüyor. Ayrıca, fibroin konsantrasyonu değişmediğinden dolayı artan q_{wSN} ile birlikte 4.1 numaralı eşitlik yardımıyla hesaplanan n_{21} oranı da artmaktadır.

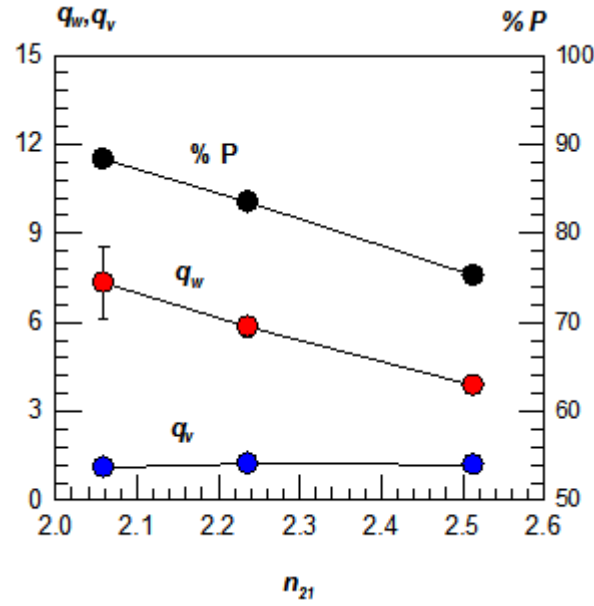
4.2.1.2 DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin suda şişmeleri

Farklı BDDE konsantrasyonlarında hazırlanan DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin kütlece şişme (q_w), hacimce şişme (q_v), kütlece bağıl şişme (m_{rel}), hacimce bağıl şişme (v_{rel}), gözeneklilik (P) ve jel kesri (w_g) değerleri toplu halde Çizelge 4.7'de görülmektedir.

Çizelge 4.7 : DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin sudaki şişmeleri.

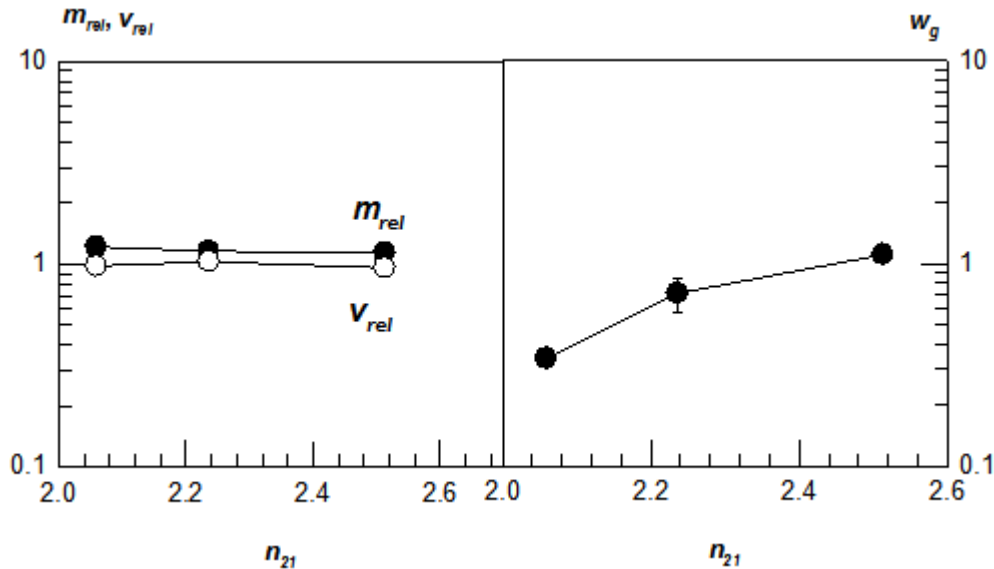
Jel Kodu	q_w	q_v	m_{rel}	v_{rel}	w_g	% P
DN4	$3,9 \pm 0,2$	$1,20 \pm 0,05$	$1,15 \pm 0,09$	$0,96 \pm 0,01$	$1,1 \pm 0,1$	75
DN4'	$5,9 \pm 0,3$	$1,24 \pm 0,07$	$1,16 \pm 0,11$	$1,03 \pm 0,05$	$0,7 \pm 0,1$	83
DN4''	$7,3 \pm 1,2$	$1,11 \pm 0,06$	$1,22 \pm 0,09$	$0,98 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,03$	88

Şekil 4.16’da ise q_w , q_v ve P değerlerinin n_{21} oranına bağlı değişimi görülüyor. İkinci ağyapıda artan BDDE ile çift ağyapılı kriyojellerin n_{21} değeri artmaktadır. Artan n_{21} değeriyle de q_w değeri azalmaktadır. Diğer yandan q_v değeri ise DN kriyojelleri için yaklaşık 1 civarındadır ve fazla değişmemektedir. Bunun temel sebebi, bir önceki bölümde de açıklandığı gibi (bkz. Bölüm 4.1.1.2) kuru durumdaki fibroin kriyojellerinin sahip olduğu gözenekli yapıdan dolayı suyun gözeneklere girmesidir. Ayrıca, q_w değerinin azalması; q_w ile q_v arasındaki farkın da azalmasına sebep olmakta ve böylece malzemenin gözenekliliği (P) de azalmaktadır.



Şekil 4.16 : q_w (●), q_v (●) ve %P (●) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi.

Şekil 4.17’de ise m_{rel} , v_{rel} ve w_g değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi görülmektedir.

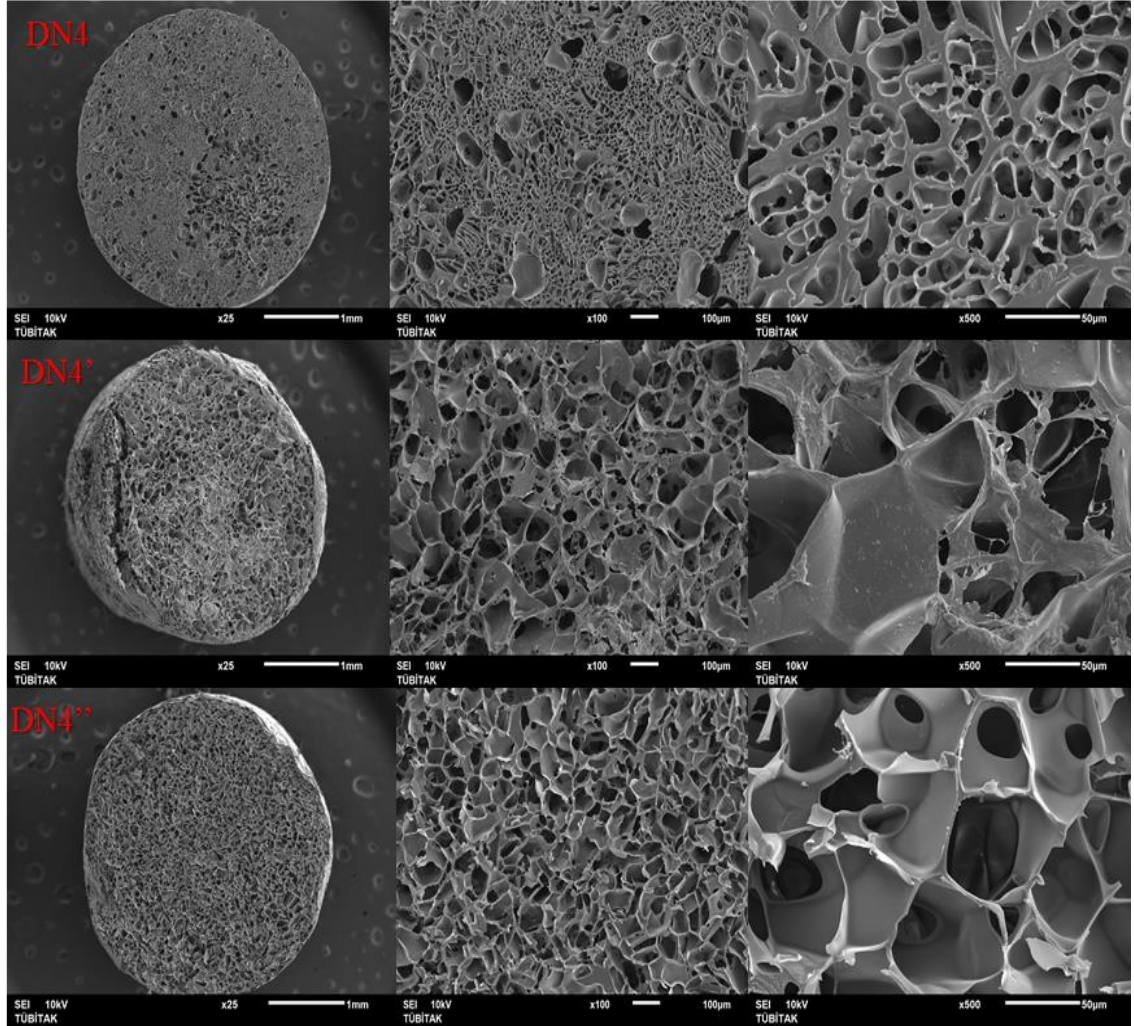


Şekil 4.17 : m_{rel} (●), v_{rel} (○) ve w_g (●) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi.

Artan n_{21} değeriyle birlikte m_{rel} , v_{rel} değerlerinin değişmediği ve 1 civarında olduğu; diğer yandan w_g değerinin ise arttığı görülmektedir. Sentez sonrasında kriyojeller suya atıldığında ilave bir şişme göstermediğinden dolayı m_{rel} ve v_{rel} değerleri 1 civarındadır. Diğer yandan; artan n_{21} oranı ile yani ikinci ağyapıda artan BDDE miktarı ile jel kesri değeri artmaktadır. Yani, BDDE miktarı az olduğunda fibroinin tamamı ağyapıya girmemekte, artan BDDE ile birlikte w_g değeri 1'e yaklaşmaktadır.

4.2.2 Morfolojik özellikler

İkinci ağyapının hazırlanmasında kullanılan BDDE miktarının DN kriyojellerinde gözenek yapılarına etkisini incelemek için kuru durumdaki DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin SEM görüntüleri çekilmiştir. Elde edilen görüntüler 3 farklı büyütme oranıyla (x25, x100 ve x500) Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18 : DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin SEM görüntüleri.

SEM görüntülerinden gözenek yapılarının farklılaştığı, yani morfolojik özelliklerin BDDE miktarına bağlı olarak değiştiği anlaşılmaktadır. Kriyojeller için SEM görüntüleri yardımıyla hesaplanan gözenek boyutları ise Çizelge 4.8’de verilmiştir.

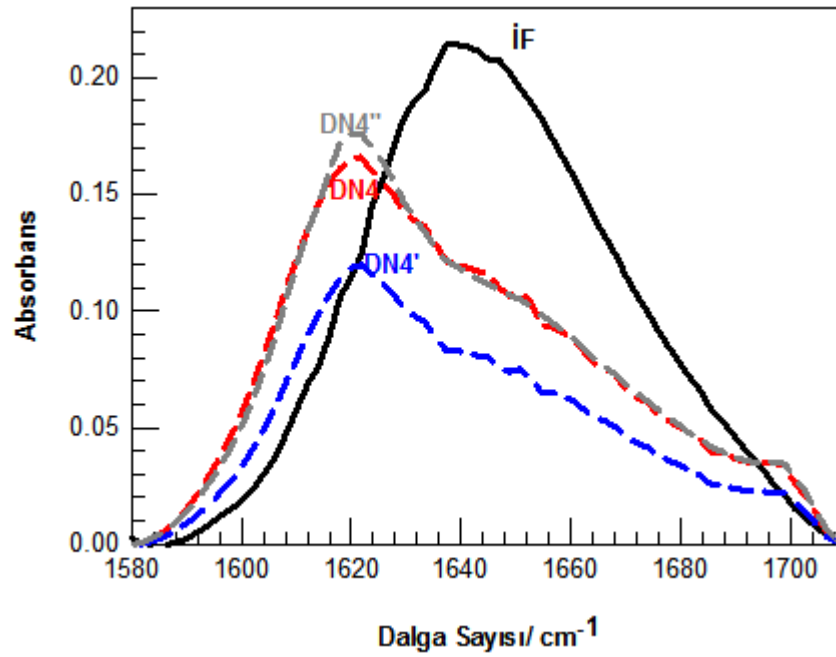
Çizelge 4.8 : DN4, DN4’ ve DN4’’ kriyojellerinin gözenek boyutları.

Jel Kodu	Gözenek Boyutu (μm)
DN4	10 ± 3
DN4’	13 ± 7
DN4’’	14 ± 4

İkinci ağyapıda azalan BDDE miktarıyla gözenek boyutlarında az bir artış olmaktadır. Ancak standart sapma değerleri de dikkate alınırsa gözenek boyutlarının fazla değişmediği söylenebilir. Diğer yandan; malzemelerin mekanik dayanımının bir ölçüsü olan gözenek duvarlarının kalınlığı, azalan BDDE miktarıyla azalmıştır. İkinci ağyapıda 1,5 mmol/g epoksi içeren DN4 kriyojelinin gözenek duvarlarının diğerlerine göre daha kalın olduğu görülmektedir. Bu da DN4 kriyojelinin diğer jellere göre mekanik dayanımının daha iyi olmasını sağlamaktadır. Malzemelerin mekanik özellikleri, ileriki bölümlerde daha ayrıntılı bir şekilde incelenecektir.

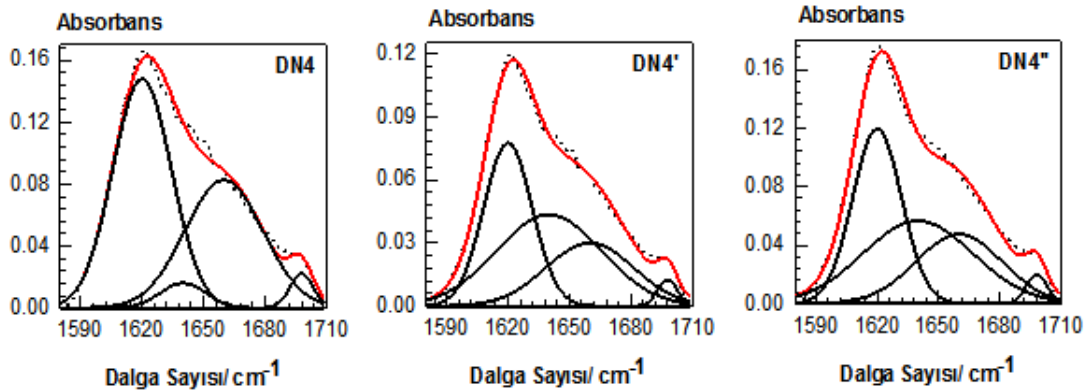
4.2.3 ATR-FTIR analizleri

Fibroin konformasyon analizleri ATR-FTIR cihazı ile yapılan DN4, DN4’ ve DN4’’ kriyojelleri için Amid-I bölgesinin ($1580\text{-}1710\text{ cm}^{-1}$) spektrumları Şekil 4.19’da verilmiştir. Şekilde, 1640 cm^{-1} dalga sayısındaki kriyojelleşme öncesi dondurmalı kurutucuda kurutulan fibroine ait olan pikin; BDDE ile gerçekleşen jelleşme ile β -tabaka yapılarının oluşmasından dolayı 1620 cm^{-1} dalga sayısına kaydığı görülmektedir.



Şekil 4.19 : Jelleşme öncesi ipek fibroinin ve jelleşme sonrası DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin ATR-FTIR spektrumları.

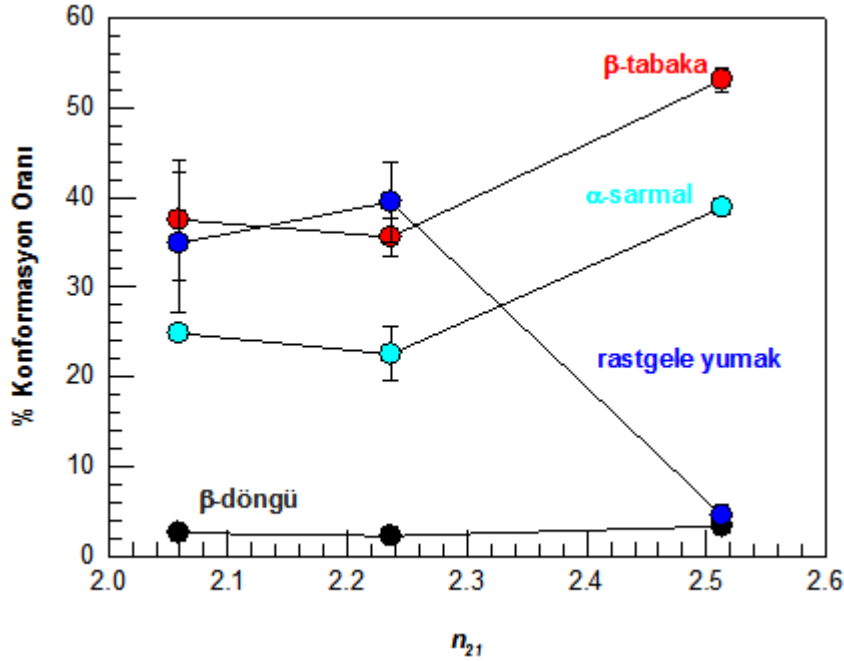
DN4, DN4' ve DN4'' kriyojelleri için Peak Fit yazılımıyla elde edilen grafikler ise Şekil 4.20'de görülmektedir. Grafiklerde noktalı çizgiler orjinal spektrumu; kırmızı çizgiler ise Peak Fit yazılımıyla ve eğri uydurma yoluyla elde edilen spektrumları göstermektedir.



Şekil 4.20 : DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin ATR-FTIR spektrumlarına PeakFit yazılımıyla Gauss modelinin uygulanmasıyla elde edilen eğriler.

DN4, DN4' ve DN4'' fibroin kriyojellerinin yapısında bulunan β -tabaka, rastgele yumak, α -sarmal ve β -döngü yüzdeleri PeakFit yazılımı sayesinde belirlenmiştir. Şekil 4.20'de orjinal ve eğri uydurma yoluyla elde edilen spektrumların altında kalan 1620 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} ve 1698 cm^{-1} dalga sayılarına karşılık gelen siyah çizgiler, bu yazılım sayesinde ortaya çıkarılmış ve sırasıyla β -tabaka, rastgele yumak, α -sarmal ve β -döngü yapılarına karşılık gelen gizli piklerdir. Bu piklerin altında

kalan alanların hesaplanmasıyla β -tabaka, rastgele yumak, α -sarmal ve β -döngü yapılarının fibroin kriyojellerindeki miktarları % olarak belirlenmiştir. Elde edilen % konformasyon oranları Şekil 4.21’de kriyojellerin n_{21} değerlerine karşı grafiğe çizilmiştir.



Şekil 4.21 : Rastgele yumak (●), β -tabaka (●), β -döngü (●) ve α -sarmal yapı (●) yüzdelерinin n_{21} oranıyla değişimi.

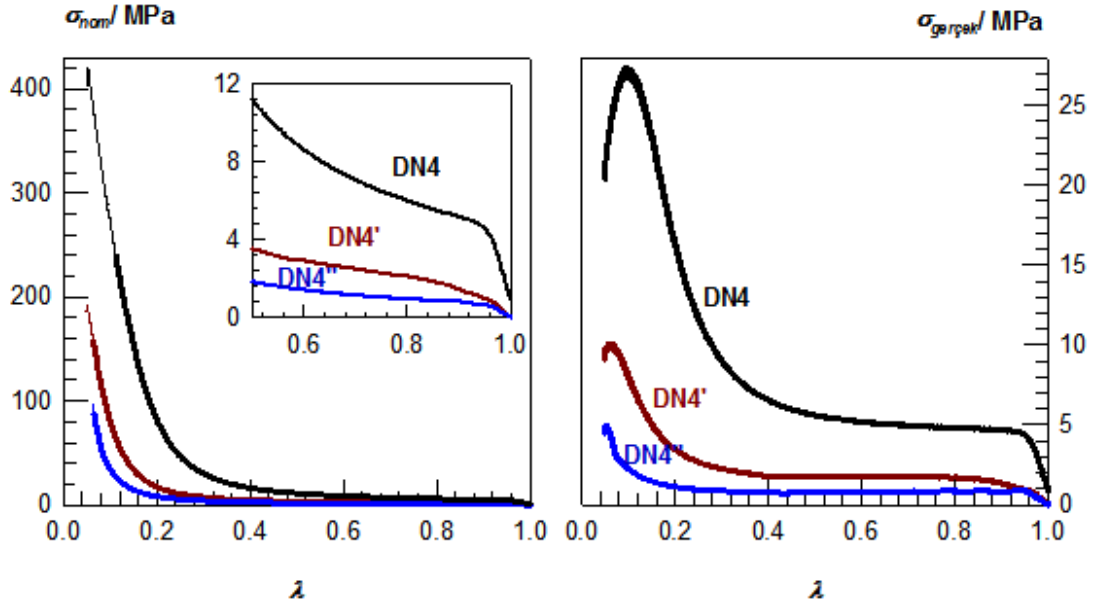
Artan n_{21} oranıyla yani ikinci ağyapıda artan BDDE miktarıyla fibroinin yapısındaki β -tabaka ve α -sarmal yapı yüzdeleri artmaktadır. Artan BDDE miktarıyla fibroin zincirleri daha çok noktadan birbirine çapraz bağlanmakta ve böylece β -tabaka yüzdesi artmaktadır.

4.2.4 Mekanik testler

Kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin mekanik özellikleri Zwick-Roell Z 0.05 ve Devotrans mekanik test cihazlarıyla incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak çift-ağyapılı fibroin kriyojellerinde ikinci ağyapıdaki BDDE miktarının kriyojellerin mekanik özelliklerine nasıl etki ettiği ortaya konmuştur.

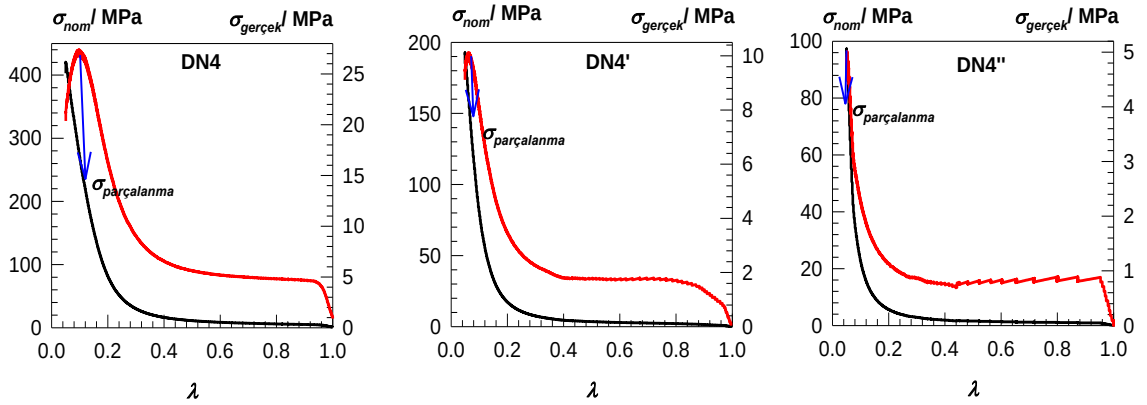
4.2.4.1 Kuru durumdaki kriyojellerin karşılaştırılması

Şekil 4.22’de kuru durumdaki DN4, DN4' ve DN'' kriyojellerinin λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri görülmektedir.



Şekil 4.22 : Kuru durumdaki DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin mekanik testleri sonucunda elde edilen λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri.

Kuru durumdaki kriyojellerden mekanik olarak en dayanıklı olanı DN4 kriyojelidir. İkinci ağyapıda artan BDDE miktarı ile kriyojellerin mekanik olarak daha dayanıklı hale geldikleri, jellerin kırıldığı maksimum noktasının ve plato bölgesinin yükselmesinden anlaşılmaktadır. Şekil 4.23'de ise her bir kriyojel için λ - σ_{nom} (siyah eğriler) ve λ - $\sigma_{gerçek}$ (kırmızı eğriler) eğrilerinin aynı grafiğe çizilerek gerçek parçalanma geriliminin belirlendiği grafikler görülmektedir.



Şekil 4.23 : Kuru durumdaki DN4, DN4' ve DN4'' kriyojelleri için parçalanma gerilimlerinin ($\sigma_{parçalanma}$) belirlendiği grafikler.

Çizelge 4.9'da ise kriyojellerin mekanik testleri sonucunda elde edilen tüm sonuçlar verilmiştir.

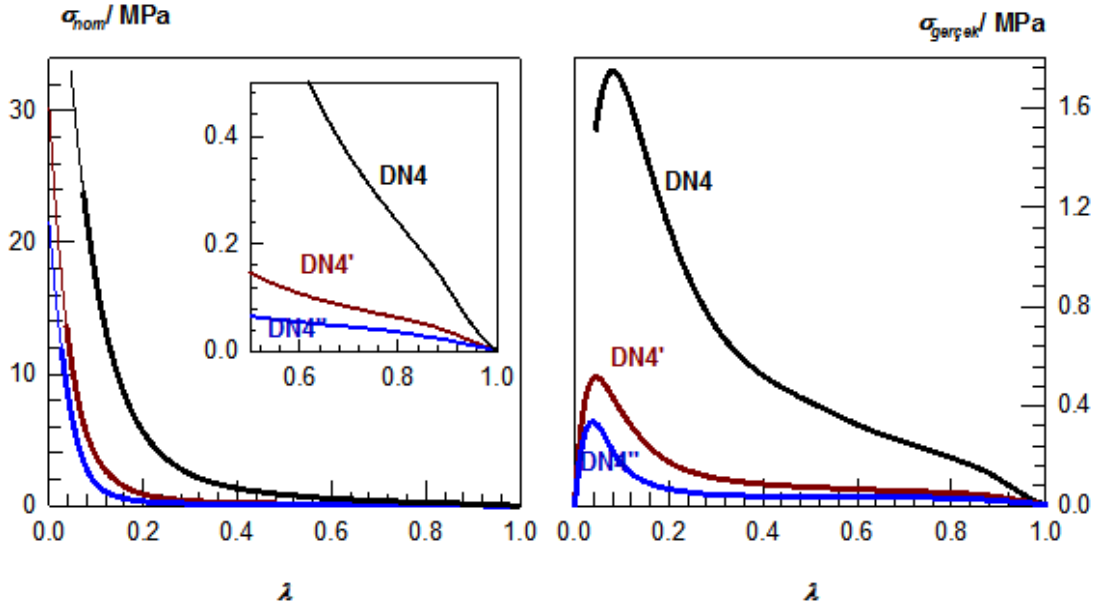
Çizelge 4.9 : Kuru durumdaki DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin mekanik test sonuçları.

Jel Kodu	E (MPa)	σ_{plato} (MPa)	σ_{comp} (MPa)	$\sigma_{parçalanma}$ (MPa)	λ
DN4	58±15	4,7±0,5	2,8±0,8	240±24	0,097±0,006
DN4'	25±4	1,1±0,5	1,42±0,04	156±15	0,065±0,005
DN4''	19±5	0,96±0,32	0,6±0,1	88±12	0,05±0,01

Çizelge 4.9'da görüldüğü üzere kuru durumdaki kriyojellerde ikinci ağyapıdaki BDDE miktarı azaldıkça malzemenin mekanik özelliklerinde düşüş olmaktadır. Bu sonuçlar diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlarla da uyumludur. Örneğin; şişme çalışmalarında ikinci ağyapıda azalan BDDE ile jel kesrinin de düştüğü görülmüştür. Yani, reaksiyona giren fibroinin tamamı polimerik ağyapıya girmemiştir. Ayrıca mekanik dayanımın bir ölçüsü olan n_{21} değerindeki düşüş de malzemelerin mekanik özelliklerini etkilemiştir. Azalan BDDE ile SEM görüntülerinde malzemelerin gözenek duvar kalınlıklarının ve ATR-FTIR analizlerinde de β -tabaka yüzdelерinin azaldığı da görülmüştür. Tüm bu sonuçlar düşünüldüğünde çift-ağyapılı fibroin kriyojellerinde ikinci ağyapıdaki BDDE miktarının azalmasıyla kriyojellerin mekanik özelliklerindeki düşüş mantıklıdır.

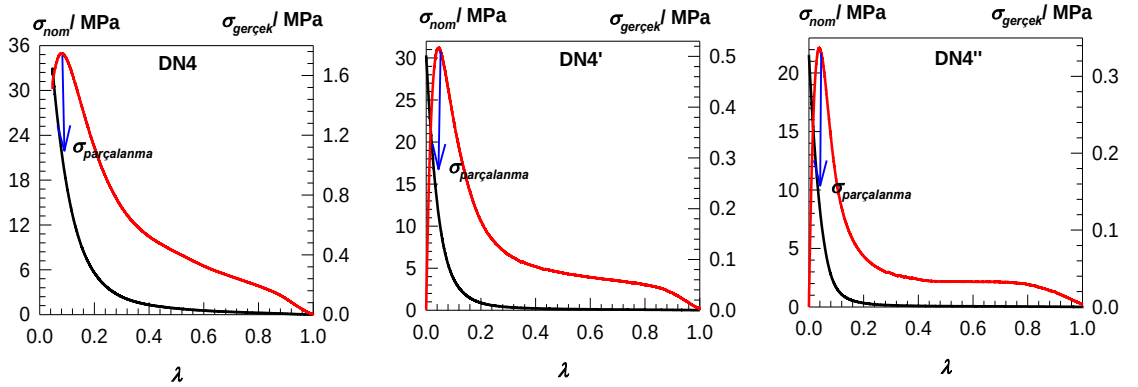
4.2.4.2 Şişmiş durumdaki kriyojellerin karşılaştırılması

Kuru durumdaki kriyojellerde olduğu gibi şişmiş durumdaki kriyojeller de birbiriyle karşılaştırılarak ikinci ağyapıdaki BDDE miktarının kriyojellerin mekanik özelliklerine etkisi şişmiş durumdaki kriyojeller için de ortaya konmuştur. Şekil 4.24'de şişmiş durumdaki kriyojellerin λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri görülmektedir.



Şekil 4.24 : Şişmiş durumdaki DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin mekanik testleri sonucunda elde edilen λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri.

Şekil 4.24'den şişmiş durumdaki kriyojellerde de kuru durumda olduğu gibi DN4 kriyojelinin diğerlerinden daha üstün mekanik özellikler gösterdiği görülmektedir. Şekil 4.25'de ise şişmiş kriyojeller için λ - σ_{nom} (siyah eğriler) ve λ - $\sigma_{gerçek}$ (kırmızı eğriler) eğrileri aynı grafiğe çizilmiş; gerçek parçalanma gerilimleri λ - $\sigma_{gerçek}$ eğrilerinden λ - σ_{nom} eğrilerine inilen oklarla şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.25 : Şişmiş durumdaki DN4, DN4' ve DN4'' kriyojelleri için parçalanma gerilimlerinin ($\sigma_{parçalanma}$) belirlendiği grafikler.

Çizelge 4.10'da ise şişmiş durumdaki DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin mekanik test sonuçları görülmektedir.

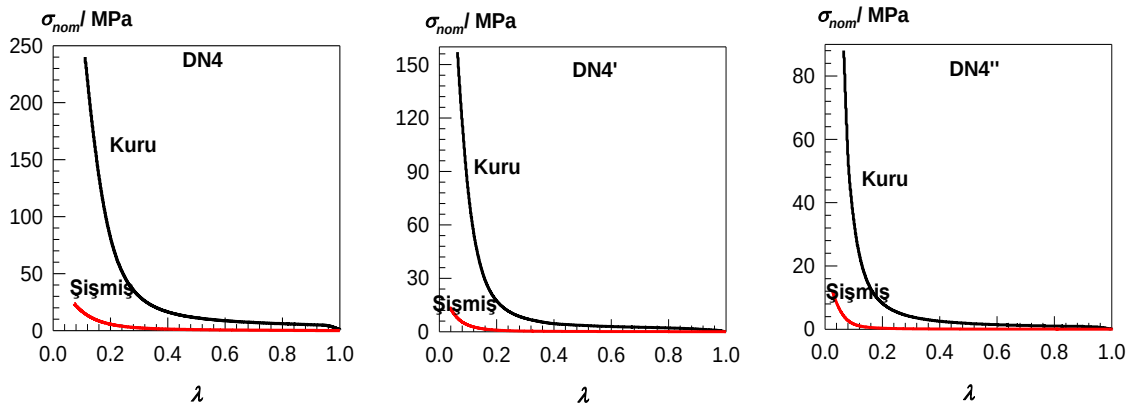
Çizelge 4.10 : Şişmiş durumdaki DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin mekanik test sonuçları.

Jel Kodu	E (MPa)	σ_{plato} (MPa)	σ_{comp} (MPa)	$\sigma_{parçalanma}$ (MPa)	λ
DN4	1,6±0,6	0,22±0,03	0,037±0,015	24±4	0,07±0,01
DN4'	0,5±0,1	0,07±0,02	0,015±0,002	14±3	0,05±0,01
DN4''	0,3±0,1	0,03±0,01	0,010±0,003	12±2	0,037±0,003

İkinci ağyapıda değişen BDDE miktarıyla birlikte kriyojellerin mekanik özelliklerinde değişme olmaktadır. Değişen BDDE miktarıyla birlikte jel kesri, β -tabaka yüzdeleri ve gözenek yapılarının değişmesi; kriyojellerin hem kuru hem de şişmiş durumdaki mekanik özelliklerinin değişmesine neden olmaktadır.

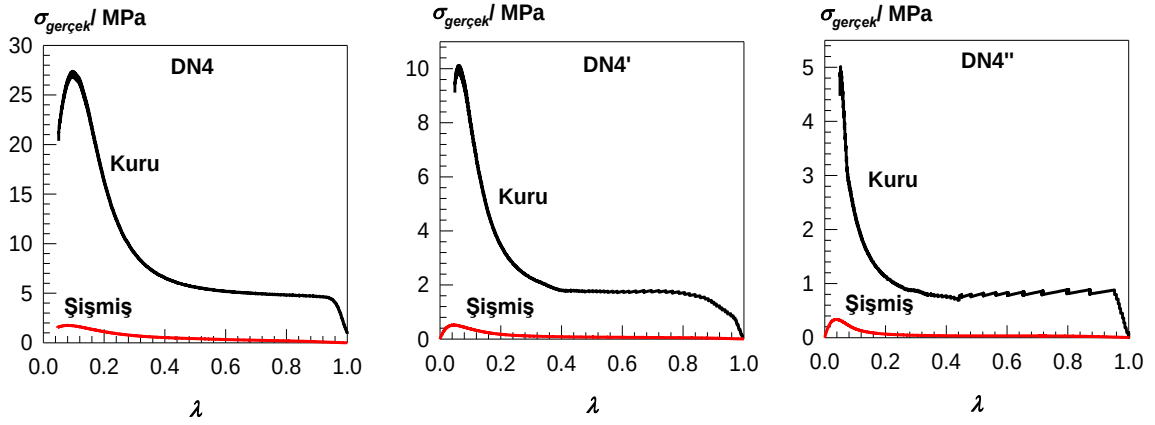
4.2.4.3 Kuru durumdaki kriyojellerin şişmiş durumdaki kriyojellerle karşılaştırılması

Şekil 4.26'da kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki DN4, DN4' ve DN4'' kriyojelleri için; parçalanma gerilimleri bulunduğundan sonra nominal gerilim değerlerine düzeltme uygulanarak çizilen λ - σ_{nom} eğrileri karşılaştırılmıştır.



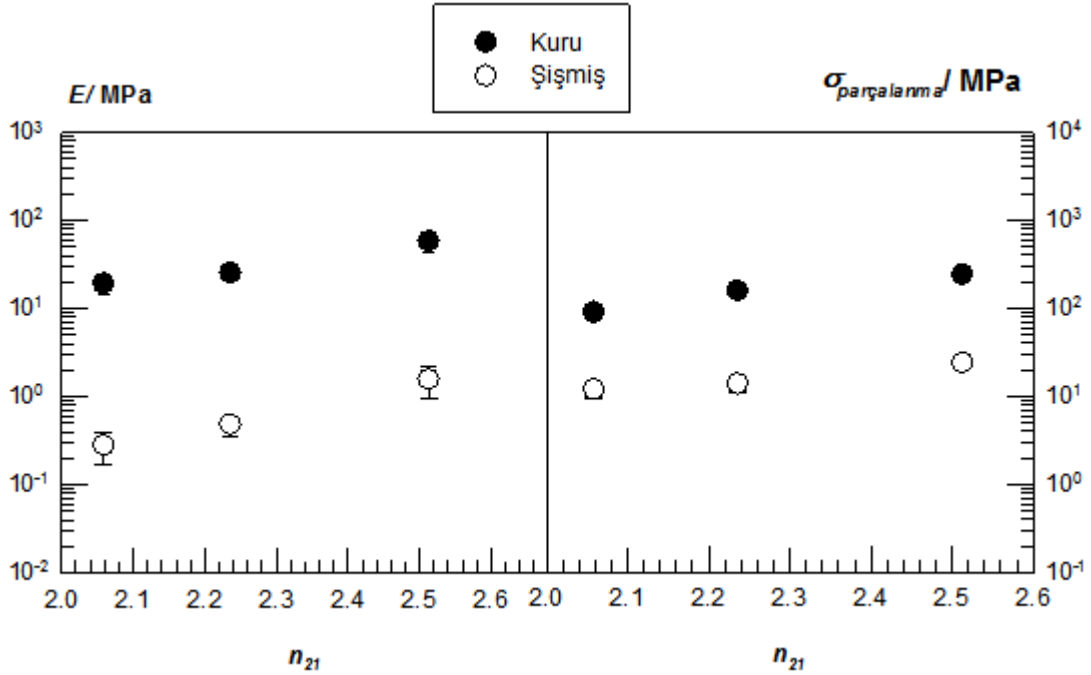
Şekil 4.26 : Kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin mekanik özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla çizilen λ - σ_{nom} eğrileri.

Şekil 4.26'da λ - σ_{nom} eğrileri incelenirse kuru durumdaki kriyojellerin şişmiş durumdaki kriyojellere göre mekanik olarak daha dayanıklı oldukları görülmektedir. Şekil 4.27'de ise λ - $\sigma_{gerçek}$ eğrilerinin karşılaştırılması yapılarak kuru durumdaki kriyojellerin şişmiş durumdaki kriyojellere göre üstünlükleri ortaya konmuştur.



Şekil 4.27 : Kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin mekanik özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla çizilen λ - $\sigma_{gerçek}$ eğrileri.

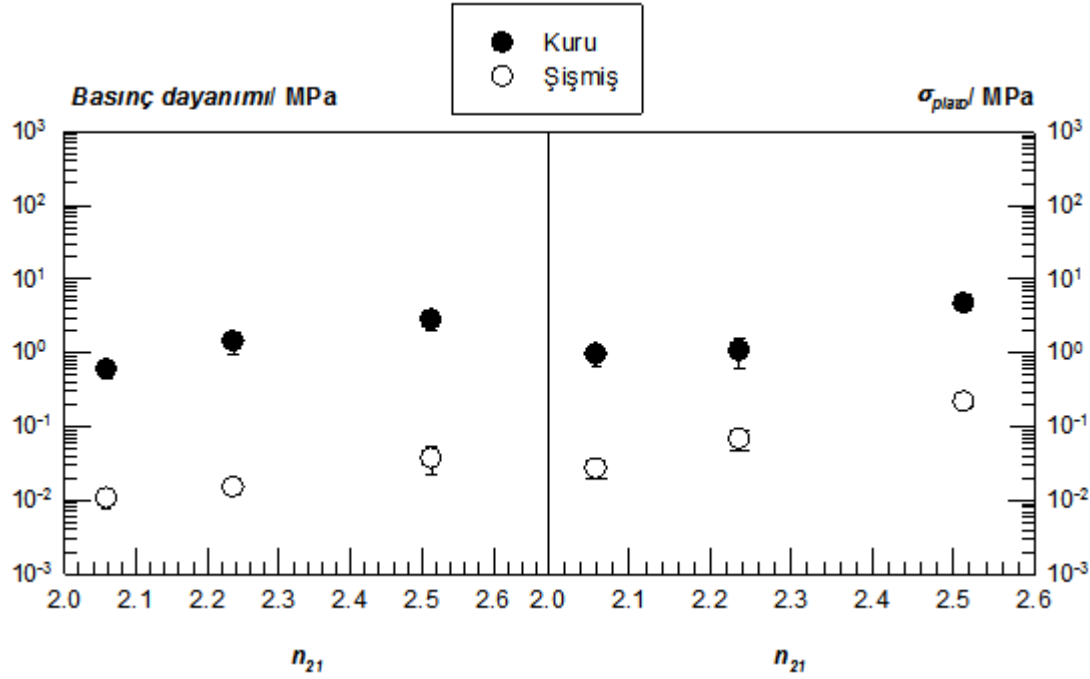
Şekil 4.28'de n_{21} oranına karşı çizilen Young modül (E) ve parçalanma gerilimi ($\sigma_{parçalanma}$) grafikleri görülmektedir. Artan n_{21} oranıyla birlikte (ikinci ağıyapıda artan BDDE ile birlikte) E ve $\sigma_{parçalanma}$ değerlerinde hem kuru durumdaki hem de şişmiş durumdaki kriyojellerde artış olmaktadır.



Şekil 4.28 : Kriyojellerin Young modülleri (E) ve parçalanma gerilimleri ($\sigma_{parçalanma}$) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi.

Şekil 4.29'da ise basınç dayanımı (σ_{comp}) ve plato gerilimi (σ_{plato}) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi verilmektedir. Bu grafiklerde de ikinci ağıyapıda artan BDDE miktarından dolayı n_{21} değerinin artmasıyla basınç dayanımı ve plato gerilimi

değerlerinin hem kuru hem de şişmiş durumdaki kriyojellerde artarak malzemelerin daha dayanıklı hale geldikleri görülmektedir.



Şekil 4.29 : Kriyojellerin basınç dayanımı (σ_{comp}) ve plato gerilimi (σ_{plato}) değerlerinin n_{21} oranı ile değişimi.

DN4, DN4' ve DN4'' kriyojellerinin özellikleri incelenerek, fibroin kriyojelleri gibi gözenekli bir malzemede ikinci ağyapıdaki BDDE miktarının etkisi ortaya konmuştur. Özet olarak, ikinci ağyapıda BDDE miktarının artmasıyla jel kesrinde artma olmuştur. Ayrıca yapıya sertlik ve dayanıklılık kazandıran β -tabaka yapılarının da artan BDDE ile birlikte arttığı görülmüştür. SEM sonuçlarında ise gözenek duvar kalınlıklarının BDDE miktarıyla değiştiği gözlenmiştir. Tüm bu değişimler, malzemelerin mekanik özelliklerine de etki etmiş ve ikinci ağyapıda artan BDDE ile malzemelerin mekanik özelliklerinde iyileşme olmuştur.

4.3 Üç-Ağyapılı (TN) Fibroin Kriyojellerinin Özellikleri

Bu bölümde % 7,2 konsantrasyonundaki fibroin çözeltisinde elde edilen DN kriyojelinden (DN1 kodlu kriyojel) sentezlenen ve 3. ağyapısının fibroin konsantrasyonu % 20 olan üç-ağyapılı (TN) fibroin kriyojelinin özellikleri incelenmiş ve TN kriyojelinin özellikleri bu kriyojelin sentezinde kullanılan SN ve DN ile kıyaslanmıştır.

4.3.1 Kriyojellerin suda ve fibroin çözeltilerinde şişmeleri

4.3.1.1 DN1 kriyojelinin fibroin çözeltilerinde şişmesi ve $n_{32/1}$ değerinin hesaplanması

TN kriyojelinin sentezi için % 20 fibroin konsantrasyonundaki çözeltiye atılan DN1 kriyojelinin, bu fibroin çözeltisindeki şişmesi incelenmiş ve DN1 kriyojeli için kütlece şişme oranı (q_{wDN}) 3,15 olarak bulunmuştur. Ayrıca TN kriyojeli için üçüncü ve ikinci ağyapıdaki fibroinin birinci ağyapıdakine molar oranı ($n_{32/1}$); 4.2 numaralı eşitlik yardımıyla hesaplanarak değeri 1,87 olarak bulunmuştur.

$$n_{32/1} = [(m_{DN\text{şişmiş}} - m_{DN\text{kuru}})/m_{SN\text{kuru}}] * C_{IF(3)} + n_{21} \quad (4.2)$$

Bu denklemde $m_{DN\text{şişmiş}}$ % 20'lik fibroin çözeltisinde şişmiş DN1 kriyojelinin ağırlığı; $m_{DN\text{kuru}}$ bu fibroin çözeltisine atılan kuru durumdaki DN1 kriyojelinin ağırlığı, $m_{SN\text{kuru}}$ ise DN1 kriyojelinin sentezinde kullanılan SN kriyojelinin kuru durumdaki ağırlığıdır. $C_{IF(3)}$; % olarak üçüncü ağyapıdaki fibroin konsantrasyonunu göstermektedir. n_{21} ise DN1 kriyojeli için daha önce 4.1 numaralı formülle hesaplanan ve değeri 0,997 olan ikinci ağyapıdaki fibroinin birinci ağyapıdakine molar oranıdır.

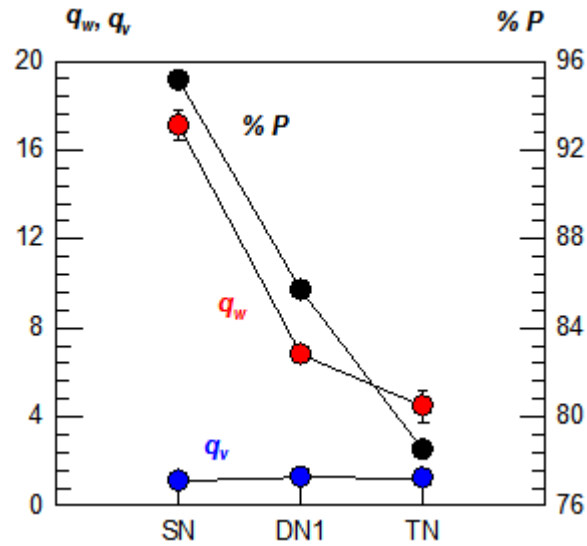
4.3.1.2 TN kriyojelinin sudaki şişmesi

TN kriyojelinin sudaki şişme davranışları incelenmiş ve elde edilen sonuçlar TN kriyojelinin sentezinde kullanılan DN1 ve SN'nin sonuçlarıyla birlikte Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11 : SN, DN1 ve TN kriyojellerinin sudaki şişmeleri.

Jel Kodu	q_w	q_v	m_{rel}	v_{rel}	w_g	% P
SN	17±1	1,11±0,03	0,88±0,01	0,90±0,06	1,2±0,1	95
DN1	6,8±0,3	1,27±0,07	0,98±0,17	0,91±0,09	1,5±0,1	86
TN	4,5±0,7	1,22±0,03	1,7±0,1	0,98±0,03	0,97±0,01	79

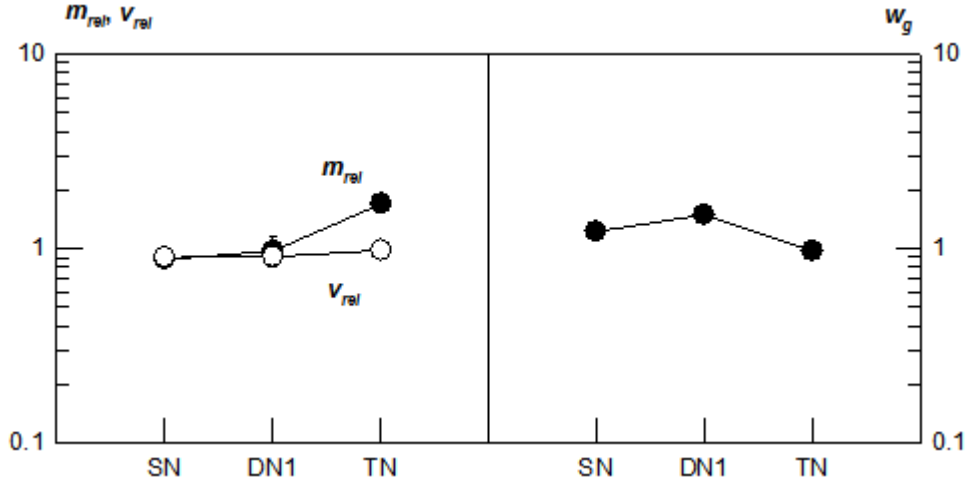
Şekil 4.30'da ise SN, DN1 ve TN kriyojelleri için çizilen q_w , q_v ve P değerlerinin grafiği görülmektedir.



Şekil 4.30 : SN, DN1 ve TN kriyojelleri için çizilen q_w (●), q_v (●) ve % P (●) grafiği.

Şekil 4.30 ve Çizelge 4.11’de görüldüğü üzere SN’den TN’ye gidildikçe q_w değerinin düştüğü, q_v değerinin değişmeyip 1 civarında kaldığı ve q_w değerinin düşmesinden dolayı % gözenekliliğin de düştüğü görülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar, diğer jellerin şişme çalışması sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. SN kriyojelinden DN; DN kriyojelinden de TN üretimi sırasında yapıya ilave fibroin girmekte ve bundan dolayı jellerin sudaki kütlece şişmesi azalmaktadır. Diğer yandan, malzemeler gözenekli bir yapıya sahip olduklarından dolayı su, malzemenin gözeneklerine girmekte ve böylece malzemenin hacminde fazla bir değişiklik olmamakta; q_v değeri 1 civarında çıkmaktadır. Önceki sonuçlardan da görüleceği üzere; gözeneklilik q_w ve q_v değerlerine bağlıdır ve bu iki değer arasındaki farkın azalmasıyla % gözeneklilik de azalmaktadır.

Şekil 4.31’de SN, DN1 ve TN kriyojelleri için m_{rel} , v_{rel} ve w_q grafikleri görülmektedir.

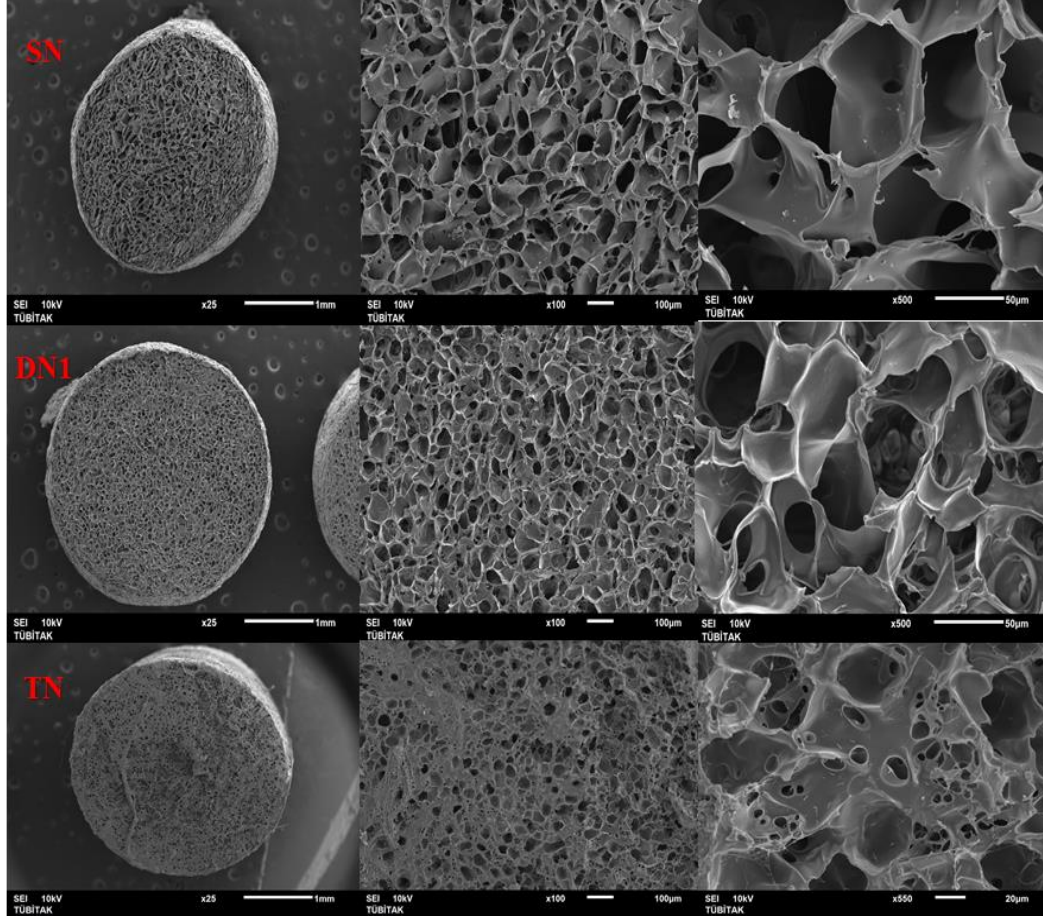


Şekil 4.31 : SN, DN1 ve TN kriyojelleri için çizilen m_{rel} (●), v_{rel} (○) ve w_g (●) grafiği.

Kütlece bağıl şişme (m_{rel}) değeri artıp, hacimce bağıl şişme (v_{rel}) değeri ise değişmemektedir. m_{rel} değerinin artma sebebinin, TN kriyojelinde artan fibroin konsantrasyonu ile jelin yük yoğunluğunun artması ve su moleküllerinin osmotik basınç sebebiyle jele akarak jelin şişmesini sağlaması olduğu düşünülmektedir. Sentez sonrası jeller suya atıldığında hacimlerinde fazla bir değişiklik olmadığından dolayı da v_{rel} değerleri 1 civarında çıkmıştır. w_g değerinin ise üç jel için de 1 civarında çıkması, fibroinin tamamının polimer ağı yapısına girdiğini göstermektedir.

4.3.2 Morfolojik özellikler

Şekil 4.32’de TN kriyojelinin SEM görüntüleri 3 farklı büyütme oranında (x25, x100 ve x500) verilmiştir. Gözenek yapılarını karşılaştırmak amacıyla TN kriyojelinin sentezinde kullanılan DN1 ve SN kriyojelinin de SEM görüntüleri Şekil 4.32’ye eklenmiştir. SEM görüntülerinden anlaşılabileceği üzere, SN’den TN’ye gittikçe kriyojellerin gözenek boyutu küçülmektedir.



Şekil 4.32 : SN, DN1 ve TN kriyojellerinin SEM görüntüleri.

SEM görüntülerinden hesaplanan ortalama gözenek boyutları Çizelge 4.12’de verilmiştir.

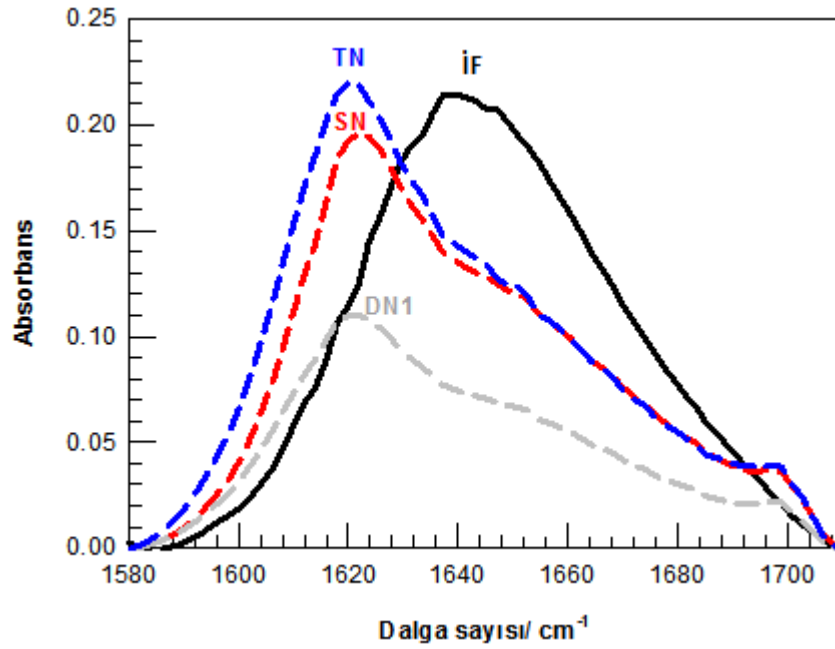
Çizelge 4.12 : SN, DN1 ve TN kriyojellerin gözenek boyutları.

Jel Kodu	Gözenek Boyutu (μm)
SN	33 ± 7
DN1	25 ± 6
TN	6 ± 3

Çift-ağyapılı jellerde ve üç-ağyapılı jellerde, ilk ağyapı içine dışarıdan ilave fibroinin girmesi ve bu fibroinin de kriyojelasyon işlemiyle gözenekli bir polimerik çerçevesinin oluşmasından dolayı malzemelerin gözenek boyutları daha küçük olmaktadır. Bu olay, kolay anlaşılabilmesi için “gözenek içinde gözenek oluşumu” şeklinde de ifade edilebilir.

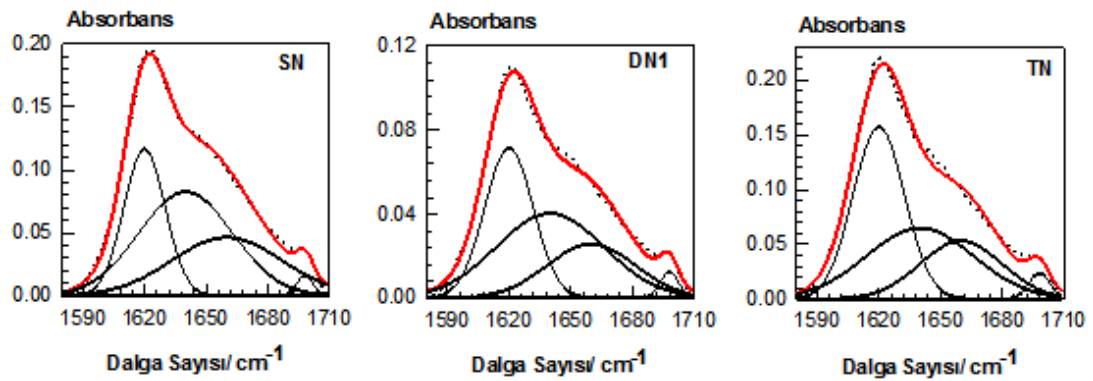
4.3.3 ATR-FTIR analizleri

Şekil 4.33’de jelleşme öncesi fibroinin ve jelleşme sonrası SN, DN1 ve TN kriyojellerinin Amid-I bölgesinin ($1580-1710\text{ cm}^{-1}$) ATR-FTIR spektrumları verilmiştir. 1640 cm^{-1} dalga sayısındaki pikin, jelleşmeyle birlikte β -tabaka oluşumu ile SN, DN1 ve TN kriyojellerinde 1620 cm^{-1} dalga sayısına kaydığı görülmektedir.



Şekil 4.33 : Jelleşme öncesi ipek fibroinin ve jelleşme sonrası SN, DN1 ve TN kriyojellerinin ATR-FTIR spektrumları.

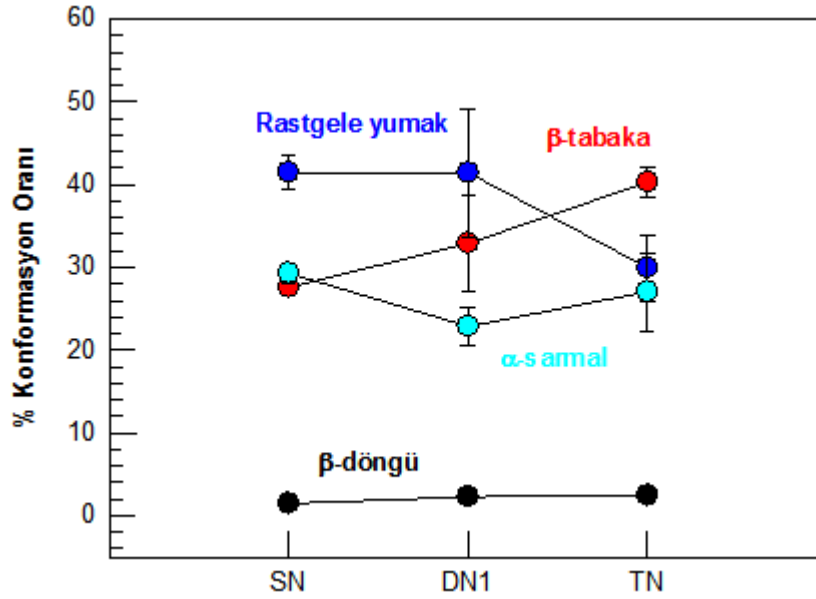
PeakFit yazılımı kullanılarak SN, DN1 ve TN kriyojelleri için oluşturulan Absorbans-Dalga sayısı grafikleri ise Şekil 4.34’de verilmiştir.



Şekil 4.34 : SN, DN1 ve TN kriyojellerinin ATR-FTIR spektrumlarına PeakFit yazılımıyla Gauss modelinin uygulanmasıyla elde edilen eğriler.

1620 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} ve 1698 cm^{-1} dalga sayılarına karşılık gelen piklerin altındaki alanların hesaplanmasıyla β -tabaka, rastgele yumak, α -sarmal ve β -döngü

yapılarının fibroin kriyojellerindeki miktarları % olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.35’de görülmektedir. SN’den TN’ye doğru rastgele yumak yüzdesindeki azalma; buna karşılık β -tabaka yüzdesindeki artış dikkat çekmektedir. Çift-ağyapılı ve üç-ağyapılı jellerde yapıya dışardan giren ilave fibroinler sebebiyle β -tabaka yüzdesi artmaktadır. Rastgele yumak halde bulunan kısımların jelleşme ile β -tabaka yapısına dönüşmesi β -tabaka yüzdesinin artmasını sağlamaktadır.



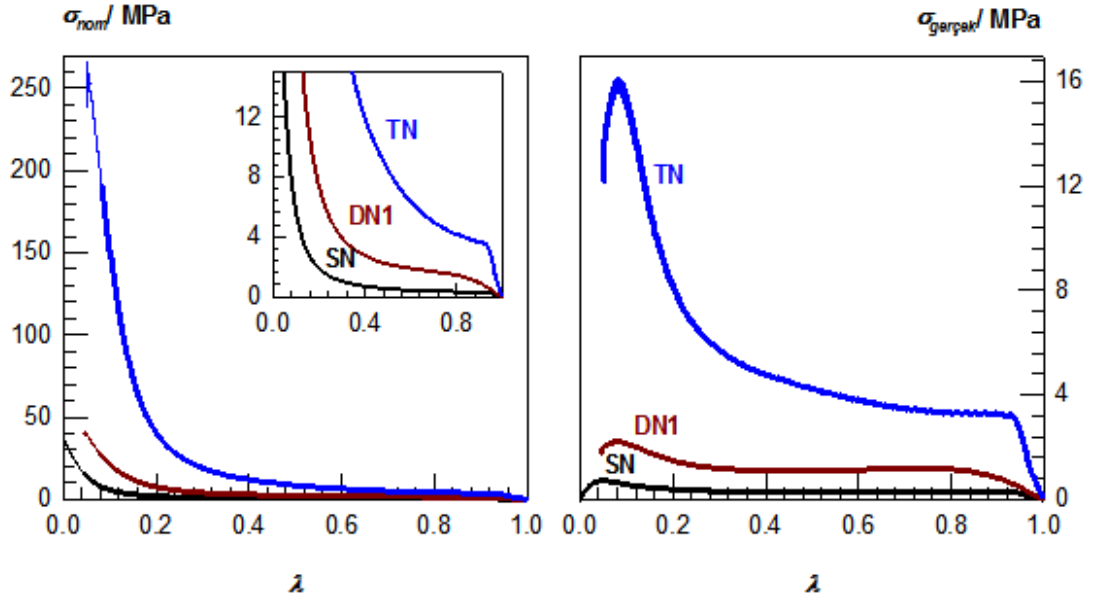
Şekil 4.35 : SN, DN1 ve TN fibroin kriyojellerindeki rastgele yumak (●), β -tabaka (●), β -döngü (●) ve α -sarmal yapı (●) yüzdeleri.

4.3.4 Mekanik testler

Bölüm 4.1’de DN kriyojellerinin SN kriyojellerine mekanik üstünlükleri ortaya konularak çift-ağyapı tekniğinin başarılı bir şekilde fibroin kriyojelleri için uygulanabileceği gösterilmiştir. Bu çalışma kapsamında çift-ağyapılı kriyojellerin dışında üç-ağyapılı fibroin kriyojelleri de üretilmiş ve mekanik özellikleri incelenmiştir. Bu bölümde, kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki üç-ağyapılı (TN) fibroin kriyojellerinin mekanik özellikleri Zwick-Roell Z 0.05 ve Devotrans mekanik test cihazlarıyla incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, TN kriyojelinin sentezinde kullanılan SN ve DN1 ile karşılaştırılarak TN kriyojelinin üstünlükleri ortaya konmuştur.

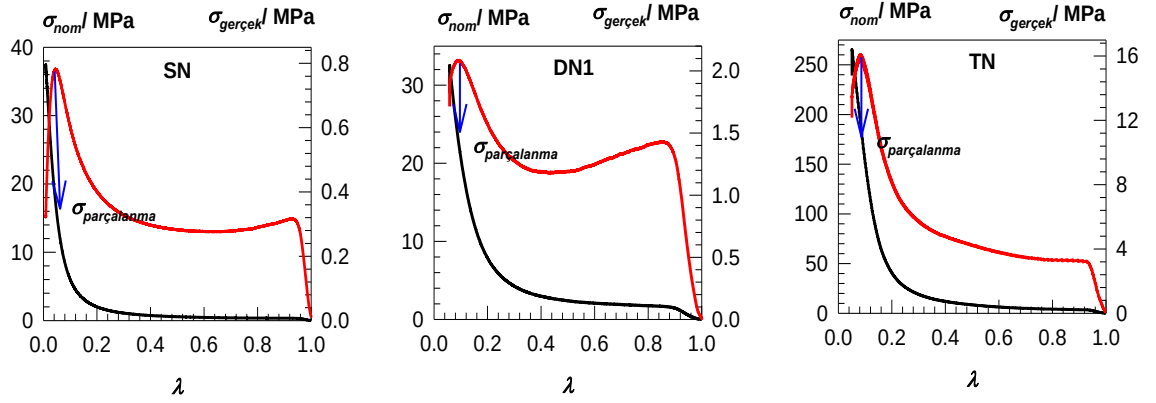
4.3.4.1 Kuru durumdaki kriyojellerin karşılaştırılması

Şekil 4.36’da kuru durumdaki kriyojellerin λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri görülmektedir.



Şekil 4.36 : Kuru durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojellerinin mekanik testleri sonucunda elde edilen λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri.

Şekil 4.37’de ise her bir kriyojel için λ - σ_{nom} (siyah eğriler) ve λ - $\sigma_{gerçek}$ (kırmızı eğriler) eğrilerinin aynı grafiğe çizilerek gerçek parçalanma geriliminin belirlendiği grafikler görülmektedir.



Şekil 4.37 : Kuru durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojelleri için parçalanma gerilimlerinin ($\sigma_{parçalanma}$) belirlendiği grafikler.

Kuru durumdaki TN kriyojelleri için belirlenen mekanik özellikler toplu halde Çizelge 4.13’de verilmiştir. Karşılaştırma amacıyla SN ve DN1 kriyojellerinin de mekanik özellikleri çizelgeye eklenmiştir.

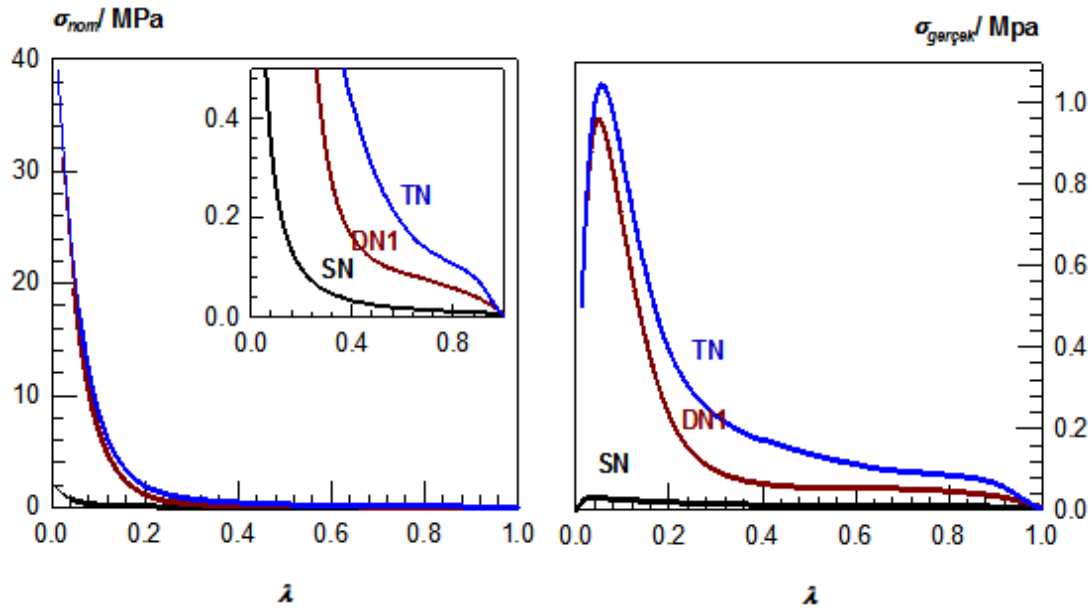
Çizelge 4.13 : Kuru durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojellerinin mekanik test sonuçları.

Jel Kodu	E (MPa)	σ_{plato} (MPa)	σ_{comp} (MPa)	$\sigma_{parçalanma}$ (MPa)	λ
SN	7±1	0,33±0,02	0,16±0,03	15±3	0,05±0,01
DN1	11,2±0,1	1,7±0,1	0,24±0,05	28±5	0,085±0,006
TN	48±11	3,4±0,5	1,5±0,7	190±12	0,08±0,01

Fiziksel olarak iç içe geçmiş üç ağyapıdan oluşan TN kriyojelinin mekanik özellikleri, bu jelin sentezinde kullanılan SN ve DN1 kriyojelinin mekanik özelliklerinden daha iyidir. Üçüncü ağyapı sayesinde Young modülü (E), plato gerilimi (σ_{plato}), basınç dayanımı (σ_{comp}), parçalanma gerilimi ($\sigma_{parçalanma}$) ve deformasyon oranı (λ) değerlerinde iyileşme olmaktadır.

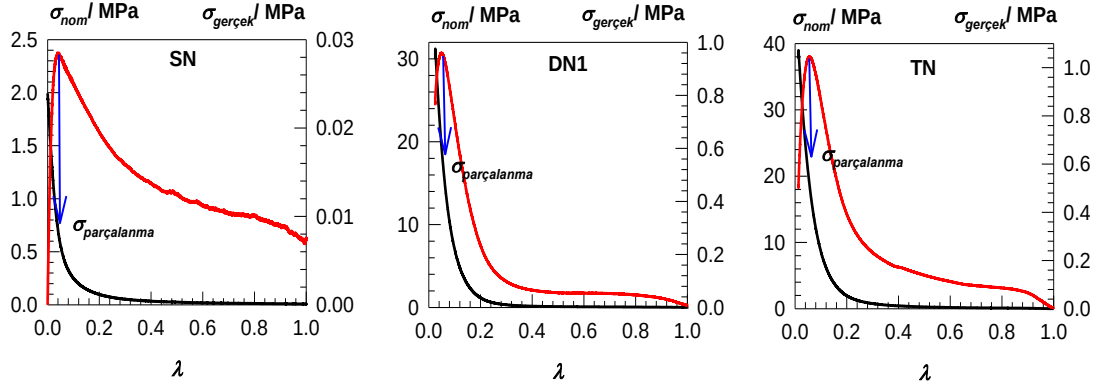
4.3.4.2 Şişmiş durumdaki kriyojellerin karşılaştırılması

Şekil 4.38’de şişmiş durumdaki kriyojellerin λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri görülmektedir.



Şekil 4.38 : Şişmiş durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojellerinin mekanik testleri sonucunda elde edilen λ - σ_{nom} ve λ - $\sigma_{gerçek}$ grafikleri.

Şekil 4.39’da ise SN, DN1 ve TN kriyojelleri için λ - σ_{nom} (siyah) ve λ - $\sigma_{gerçek}$ (kırmızı) eğrileri aynı grafikte karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.39 : Şişmiş durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojelleri için parçalanma gerilimlerinin ($\sigma_{parçalanma}$) belirlendiği grafikler.

Şişmiş durumdaki TN kriyojellerinin mekanik test sonuçları SN ve DN1 kriyojelinin mekanik test sonuçlarıyla beraber Çizelge 4.14’de verilmiştir.

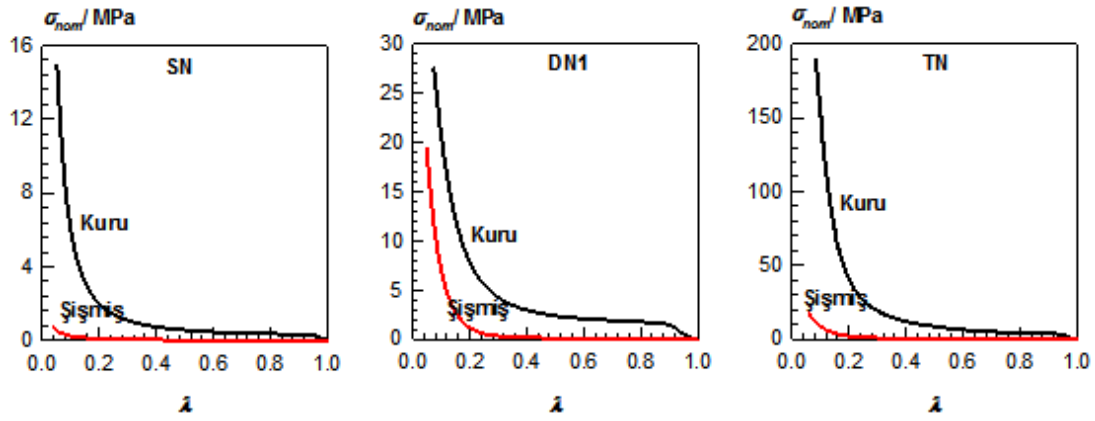
Çizelge 4.14 : Şişmiş durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojellerinin mekanik test sonuçları.

Jel Kodu	E (MPa)	σ_{plato} (MPa)	σ_{comp} (MPa)	$\sigma_{parçalanma}$ (MPa)	λ
SN	$0,03 \pm 0,01$	$0,009 \pm 0,003$	$0,008 \pm 0,003$	$0,7 \pm 0,3$	$0,04 \pm 0,01$
DN1	$0,43 \pm 0,09$	$0,050 \pm 0,002$	$0,021 \pm 0,004$	19 ± 2	$0,049 \pm 0,001$
TN	$0,82 \pm 0,14$	$0,09 \pm 0,01$	$0,023 \pm 0,002$	18 ± 3	$0,057 \pm 0,002$

TN kriyojelinin mekanik üstünlükleri, kuru durumdaki kriyojellerde olduğu gibi, şişmiş durumdaki kriyojeller için de ortaya konmuştur. Önceki bölümlerde de gözlendiği gibi, kuru durumdaki kriyojellerin şişmiş durumdaki kriyojellere kıyasla mekanik özellikleri daha iyidir. Kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki kriyojellerin ayrıntılı karşılaştırılması bir sonraki bölümde yapılmıştır.

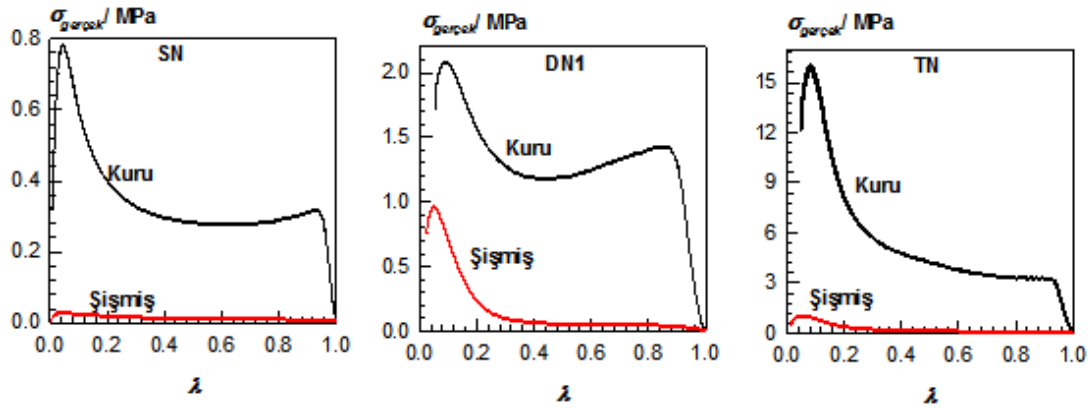
4.3.4.3 Kuru durumdaki kriyojellerin şişmiş durumdaki kriyojellerle karşılaştırılması

Şekil 4.40’da kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojelleri için λ - σ_{nom} eğrileri aynı grafikte karşılaştırılmıştır.



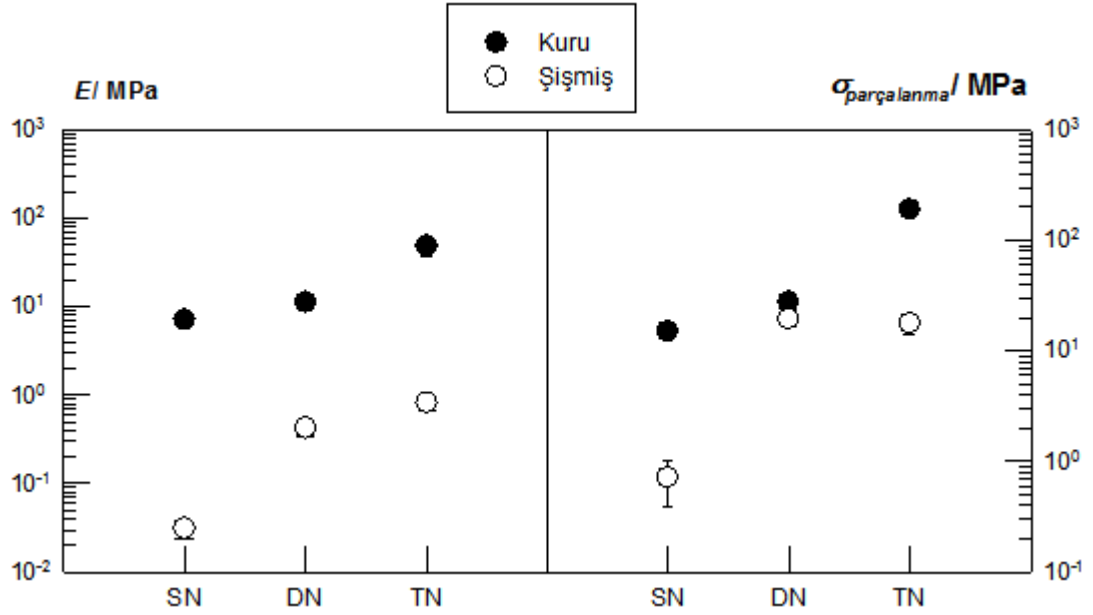
Şekil 4.40 : Kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojellerinin mekanik özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla çizilen λ - σ_{nom} eğrileri.

Şekil 4.41’de ise SN, DN1 ve TN kriyojelleri için λ - $\sigma_{gerçek}$ eğrilerinin karşılaştırılması yapılmıştır.



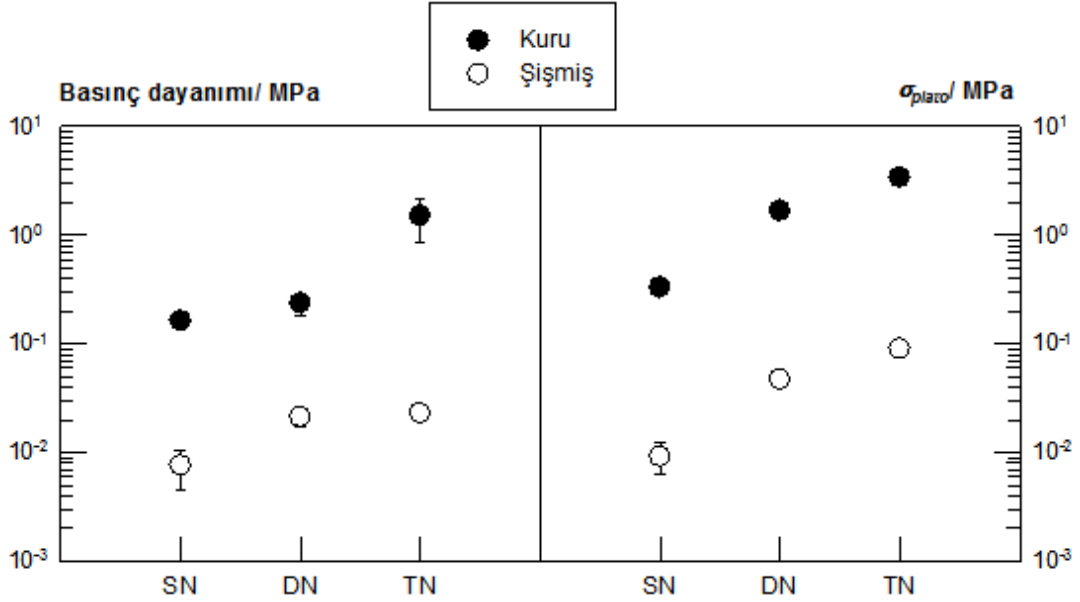
Şekil 4.41 : Kuru durumdaki ve şişmiş durumdaki SN, DN1 ve TN kriyojellerinin mekanik özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla çizilen λ - $\sigma_{gerçek}$ eğrileri.

Şekil 4.42’de kriyojeller için Young modül (E) ve parçalanma gerilimi ($\sigma_{parçalanma}$) grafikleri görülmektedir. SN’den TN’ye doğru E ve $\sigma_{parçalanma}$ değerlerinde hem kuru durumdaki hem de şişmiş durumdaki kriyojellerde artış olmaktadır.



Şekil 4.42 : SN, DN1 ve TN kriyojelleri için çizilen Young modül (E) ve parçalanma gerilimi ($\sigma_{parçalanma}$) grafikleri.

Şekil 4.43’de ise basınç dayanımı (σ_{comp}) ve plato gerilimi (σ_{plato}) değerlerinin SN, DN1 ve TN kriyojelleri için değişimi verilmiştir. Basınç dayanımı ve plato gerilimi değerlerinde de aynı doğrultuda artış olmaktadır.



Şekil 4.43 : SN, DN1 ve TN kriyojelleri için çizilen basınç dayanımı (σ_{comp}) ve plato gerilimi (σ_{plato}) grafikleri.

Hem kuru durumdaki hem de şişmiş durumdaki kriyojellerde SN’den TN’ye doğru mekanik özelliklerde iyileşme olmaktadır. Bu sonuçlar, diğer sonuçlarla da desteklenmektedir. Örneğin, aynı doğrultuda ATR-FTIR spektrumlarında β -tabaka

yapılarının arttığı ve SEM görüntülerinde gözenek boyutunun küçülüp gözenek duvarlarının kalınlaştığı görülmektedir.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, çift-ağyapı tekniği ile kriyojelasyon tekniği ilk kez birleştirilerek mekanik olarak dayanıklı ipek fibroin iskeletleri elde edilmiştir. Elde edilen tüm kriyojeller karakterize edilerek ağyapıyı oluşturan fibroinin konformasyonu, kriyojellerin gözenek yapıları, şişme davranışları ve mekanik özellikleri belirlenmiştir.

% 4,2 fibroin konsantrasyonunda elde edilen tek-ağyapılı (SN) fibroin kriyojeli, bu kriyojelden yola çıkarak ikinci ağyapıdaki fibroin konsantrasyonu % 7,2, % 14,3, % 20 ve % 28,6 olan dört adet DN kriyojeli sentezlenmiştir. Jelleşme öncesi fibroindeki β -tabaka oranı $\% 12 \pm 2$ iken jelleşme sonrası SN kriyojelinde bu oran $\% 28 \pm 1$ değerine kadar çıkmıştır. DN tekniği ile ise β -tabaka oranı $\% 53 \pm 1$ olan DN kriyojelleri üretilebilmiştir. Fibroin çözeltisine eklenen BDDE ile, fibroin zincirlerindeki hidrofobik kısımlar arasında β -tabaka oluşumu kolaylaşmakta ve kısa sürede jelleşme gerçekleşmektedir. SEM analizleriyle, tüm kriyojellerin makrogözenekli bir yapıya sahip olduğu, ikinci ağyapıda artan fibroin konsantrasyonu ile de gözenek boyutlarının küçülüp gözenek duvarlarının kalınlaştığı görülmüştür. Aynı doğrultuda, kriyojellerin mekanik özelliklerinde de iyileşme olduğu saptanmıştır. DN tekniği sayesinde kuru durumdaki basınç dayanımı $2,8 \pm 0,8$ MPa ve parçalanma gerilimi 240 ± 24 MPa olan fibroin kriyojelleri üretilebilmiştir.

İkinci ağyapıdaki çapraz bağ miktarının kriyojellerin özelliklerine etkisi de bu çalışma kapsamında incelenmiştir. İkinci ağyapının hazırlanmasında kullanılan BDDE miktarının artışı ile kriyojellerin gözenek boyutu küçülmekte ve gözenek duvarları kalınlaşmakta, jel kesri ve β -tabaka oranları artmaktadır. Ayrıca, kriyojeller mekanik olarak daha dayanıklı hale gelmektedir.

Bu çalışmada çift-ağyapılı (DN) kriyojellerin dışında üç-ağyapılı (TN) kriyojeller de elde edilmiştir. TN kriyojelinin mekanik özellikleri, bu kriyojelin üretiminde kullanılan SN ve DN ile karşılaştırılmış ve TN kriyojelinin mekanik üstünlükleri

ortaya konmuştur. Üretilen mekanik olarak dayanıklı, biyouyumlu, biyobozunur ve makrogözenekli fibroin iskeletlerinin kemik doku mühendisliğinde kullanıma uygun olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Vepari, C. ve Kaplan, D.L.** (2007). Silk as a biomaterial, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 991-1007.
- [2] **Murphy, A. R. ve Kaplan, D. L.** (2009). Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin, *Journal of materials chemistry.*, **19**, 6443-6450.
- [3] **Van Vlierberghe, S., Dubruel, P. ve Schacht, E.** (2011). Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review, *Biomacromolecules.*, **12**(5), 1387-1408.
- [4] **Kundu, J., Dewan, M., Ghoshal, S. ve Kundu, S.C.** (2008a). Mulberry non-engineered silk gland protein vis-à-vis silk cocoon protein engineered by silkworms as biomaterial matrices, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **19**, 2679-2689.
- [5] **Kundu, S.C., Kundu, B., Talukdar, S., Bano, S., Nayak, S., Kundu, J., Mandal, B.B., Bhardwai, N., Botlagunta, M., Dash, B.C., Acharya, C. ve Ghosh, A.K.** (2012). Invited review nonmulberry silk biopolymers, *Biopolymers.*, **97**, 455-467.
- [6] **Wray, L.S., Hu, X., Gallego, J., Georgakoudi, I., Omenetto, F.G., Schmidt, D. ve Kaplan, D.L.** (2011). Effect of processing on silk-based biomaterials: reproducibility and biocompatibility, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, **99**, 89-101.
- [7] **Shankar, H., Scarlett, J.A. ve Abram, S.E.** (2009). Anatomy and pathophysiology of intervertebral disc disease, *Tech Reg Anesth Manage.*, **13**, 67-75.
- [8] **Chang, G., Kim, H. J., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D. L. ve Kandel, R.** (2010). Enhancing annulus fibrosus tissue formation in porous silk scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A.*, **92**(1), 43-51.
- [9] **Chang, G., Kim, H. J., Kaplan, D., Vunjak-Novakovic, G. ve Kandel, R. A.** (2007). Porous silk scaffolds can be used for tissue engineering annulus fibrosus, *European Spine Journal.*, **16**(11), 1848-1857.
- [10] **Langer, R. ve Vacanti, J.P.** (1993). Tissue engineering, *Science.*, 260:920.
- [11] **Mikos, A.G. ve Temenoff, J.S.** (2000). Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering, *Electronic Journal of Biotechnology.*, **3** (2), 23-24.
- [12] **Gong, J.P.** (2010). Why are double network hydrogels so tough?, *Soft Matter.*, **6**, 2583-2590.
- [13] **Tanaka, T.** (1981). Gels, *Sci Am.*, **244**, 110-123.

- [14] **Shibayama, M. ve Tanaka, T.** (1993). Phase transition and related phenomena of polymer gels, *Adv. Polym. Sci.*, **109**, 1-62.
- [15] **Köse, G.T., Kenar, H., Hasırcı, N. ve Hasırcı, V.** (2003). Macroporous Poly(3-hydroxybutyrate-co-3 hydroxyvalerate) matrices for bone tissue engineering, *Biomaterials.*, **24**, 1949-1958.
- [16] **Kim, U.J., Park, J., Kim, H.J., Wada, M. ve Kaplan, D.L.** (2005). Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin, *Biomaterials.*, **26**, 2775-2785.
- [17] **Arafat, M.T., Lam, C.X.F., Ekaputra, A.K., Wong, S.Y., He, C., Hutmacher, D.W., Li, X. ve Gibson, I.** (2011). High performance additive manufactured scaffolds for bone tissue engineering application, *Soft Matter.*, **7**, 8013-8022.
- [18] **Okumara, Y. ve Ito, K.** (2001). The polyrotaxane gel: A topological gel by figure-of-eight cross-link, *Adv. Mater.*, **13**, 485-487.
- [19] **Haraguchi, K. ve Takehisa, T.** (2002). Nanocomposite hydrogels: a unique organic- inorganic network structure with extraordinary mechanical, optical, and swelling/ deswelling properties, *Adv. Mater.*, **14**, 1120-1124.
- [20] **Gong, J.P., Katsuyama, Y., Kurokawa, T. ve Osada, Y.** (2003). Double-network hydrogels with extremely high mechanical strength, *Adv. Mater.*, **15**, 1155-1158.
- [21] **Okay, O.** (2000). Macroporous copolymer networks, *Prog. Polym. Sci.*, **25**, 711-779.
- [22] **Lozinsky, V.I.** (2002a). Cryogels on the basis of naturel and synthetic polymers: Preparation, properties and application, *Russ. Chem. Rev.*, **71**, 489-511.
- [23] **Karakutuk, I., Ak, F. ve Okay, O.** (2012). Diepoxide-Triggered Conformational Transition of Silk Fibroin: Formation of Hydrogels, *Biomacromolecules.*, **13**, 1122-1128.
- [24] **Gupta, P., Vermani, K. ve Garg, S.** (2002). Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery, *Drug Discovery Today.*, **7**, 569-579.
- [25] **Oh K.S., Oh J.S., Choi H.S. ve Bae Y.C.** (1998). Effet of crosslinking density on the swelling behavior of NIPA gel particles, *Macromolecules.*, **31**, 7328-7335.
- [26] **Yoshida R., Ushida K., Kaneko Y., Sakai K., Kikuchi A., Sakurai Y. ve Okano T.** (1995). Comb-type grafted hydrogels with rapid de-swelling response to temperature changes, *Nature.*, **374**, 240-242.
- [27] **Na Y., Kurokawa T., Katsuyama Y., Tsukeshiba H., Gong J.P., Osada Y., Okabe S., Karino T. ve Shibayama M.** (2004). Structural Characteristics of Double Network Gels with Extremely High Mechanical Strength, *Macromolecules.*, **37**, 5370-5374.
- [28] **Kosmala, L.D., Henthorn, D.B. ve Peppas, L.B.** (2000). Preparation of interpenetrating network of gelatin and dextran as degradable biomaterials, *Biomaterials.*, **21**, 2019-2023.

- [29] **Bischoff, R. ve Cray, S.E.** (1999). Polysiloxanes in macromolecular architecture, *Progress in Polymer Science.*, **24**, 185-219.
- [30] **Sperling, L.H.** (1981). Interpenetrating Polymer Networks and Related Materials, New York: Plenum Press., Sayfa:1.
- [31] **Dusek K.,** (1982). Network formation in chain cross-linking (co)polymerization. İçinde: Developments in Polymerization 3, Haward, R.N., Ed., London, Applied Science., Sayfa:143.
- [32] **Okay O.,** (1994). Kinetic Modelling of Network Formation and Properties in Free-radical Crosslinking Copolymerization, *Polymer.*, **35**, 796-807.
- [33] **Okay O.,** (1999). Phase separation in free-radical cross-linking copolymerization: formation of heterogeneous polymer networks, *Polymer.*, **40**, 4117-4129.
- [34] **Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H. ve Mattiasson, B.** (2003). Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *TRENDS in Biotechnology.*, **21**(10), 445-451.
- [35] **Ak, F., Oztoprak, Z., Karakutuk, I. ve Okay O.** (2013). Macroporous silk fibroin cryogels, *Biomacromolecules.*, **14**, 719-727.
- [36] **Dainiak, M. B., Galaev, I. Y., Kumar, A., Plieva, F. M. ve Mattiasson, B.** (2007). Chromatography of living cells using supermacroporous hydrogels, cryogels. In *Cell Separation* (pp. 101-127). Springer Berlin Heidelberg.
- [37] **Lozinsky V.I., Plieva F.M., Galaev I.Y. ve Mattiasson B.** (2002b). The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation.*, **10**, 163-174.
- [38] **Ozmen M. M. ve Okay O.** (2005). Superfast responsive ionic hydrogels with controllable pore size, *Polymer.*, **46**, 8119-8127.
- [39] **Dinu M.V., Ozmen M.M., Dragan E.S. ve Okay O.** (2007). Freezing as a path to build macroporous structures: Superfast responsive polyacrylamide hydrogels, *Polymer.*, **48**, 195-204.
- [40] **Okay O.** (2007a) Macroporous hydrogels from smart polymers, İçinde: B. Mattiason ve I. Galaev, Ed, Smart Polymers: Application in Biotechnology and Biomedicine, 2. Baskı, Sayfa 269-299, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL.
- [41] **Tuncaboylu D.C. ve Okay O.** (2010). Hierarchically macroporous cryogels of polyisobutylene and silica nanoparticles, *Langmuir.*, **26** (10), 7574-7581.
- [42] **Ivanov R.V., Babushkina T.A. ve Lozinskii V.I.** (2005). Specifics of acrylamide cryopolymerization at temperatures above and below the eutectic point of the frozen reaction system, *Polymer Science Series.*, **A47**, 791.
- [43] **Ceylan, D. ve Okay, O.** (2007). Macroporous polyisobutylene gels: A novel tough organogel with superfast responsivity, *Macromolecules.*, **40**, 8742-8749.

- [44] **Arvidsson, P., Plieva, F.M., Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y. ve Mattiasson, B.J.** (2003). Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on continuous supermacroporous adsorbent, *Chromatogr. A.*, **986**, 275-290.
- [45] **Plieva, F.M., Karlsson, M., Aguilar, M-R., Gomez, D., Mikhlovsky, S. ve Galaev, I.Y.,** (2005). Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels, *Soft Matter.*, **1**, 303-309.
- [46] **Hakimi, O., Knight, D. P., Vollrath, F. ve Vadgama, P.** (2007). Spider and mulberry silkworm silks as compatible biomaterials, *Composites Part B: Engineering.*, **38**(3), 324-337.
- [47] **John G. Hardy, Lin M. Römer, Thomas R. Scheibel.** (2008). Polymeric materials based on silk proteins, *Polymer.*, **49**, 4309-4327.
- [48] **Sashina E.S., Bocek A.M., Novoselov N.P. ve Kirichenko D.A.** (2006). Structure and solubility of naturel Silk Fibroin, *Russian Journal of Applied Chemistry.*, **79**, 869-876.
- [49] **Mondal, M., Trivedy, K. ve Kumar, S.N.** (2007). The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn.,-a review, *Caspian Journal of Environmental Sciences.*, **5**, 63-76.
- [50] **Kim U., Park J., Li C., Jin H.J., Valuzzi R. ve Kaplan D.L.** (2004). Structure and properties of silk hydrogels, *Biomacromolecules.*, **5**, 786-792.
- [51] **Zhou C.Z., Confalonieri F., Medina N., Zivanovic Y., Esnault C., Yang T., Jacquet M., Janin J., Duguet M., Perasso R. ve Li Z.G.** (2000). Fine organization of *Bombyx Mori* fibroin heavy chain gene, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2413-2419.
- [52] **Sofia S., McCarthy M.B., Gronowicz G. ve Kaplan D.L.** (2001). Fuctionalized silk-based biomaterials for bone formation, *J. Biomed. Mater. Res.*, **54**, 139-148.
- [53] **Jin H.J., Fridrikh S.V., Rutledge G.C. ve Kaplan D.L.** (2002). Electrospinning *Bombyx mori* silk with Poly(ethylene oxide), *Macromolecules.*, **3**, 1233-1239.
- [54] **Jin H.J. ve Kaplan D.L.** (2003). Mechanism of silk processing in insects and spiders, *Nature.*, **424**, 1057-1061.
- [55] **Murray R.K., Mayes P.A., Granner D.K., Rodwell V.W.** (1993). Harper's Biochemistry.
- [56] **Magoshi J., Magoshi Y. ve Nakamura S.** (1994). Mechanism of fiber formation of silkworm. İçinde: Kaplan, D.; Adams, W.W.; Farmer, B.; Viney, C.; Ed. Silk polymers. Washington: American Chemical Society, Sayfa: 292-310.
- [57] **Magoshi J.** (1996). Biospinning (silk fiber formation, multiple spinning mechanisms). İçinde: Salamone, J.C., Ed. Polymeric Materials Encyclopedia. New York: CRC Press, Sayfa: 667-679.
- [58] **Knight D.P. ve Vollrath F.** (2001). Changes in element composition along the spinning duct in a *Nephia* spider, *Naturwissenschaften.*, **88**, 179-182.

- [59] **Chen X., Knight D.P., Shao Z.Z. ve Vollrath F.** (2002). Conformation transition in silk protein films monitored by time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy: effect of potassium ions on *Nephila* spidroin films, *Biochemistry.*, **41**, 14944-14950.
- [60] **Chen X., Shao Z.Z., Knight D.P. ve Vollrath F.** (2007). Conformation Transition Kinetics of *Bombyx mori* Silk Protein, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, **68**, 223-231.
- [61] **Terry A.E., Knight D.P., Porter D. ve Vollrath F.** (2004). pH induced changes in the rheology of silk fibroin, *Biomacromolecules.*, **5**, 768-772.
- [62] **Dicko C., Vollrath F. ve Kenny J.M.** (2004). Spider silk-protein refolding is controlled by changing pH, *Biomacromolecules.*, **5**, 704-710.
- [63] **Zong X.H., Zhou P., Shao Z.Z., Chen S.M., Chen X., Hu B.W., Deng F. ve Yao W.H.** (2004). Effect of pH and Copper (II) on the Conformation Transitions of Silk Fibroin Based on EPR, NMR, and Raman Spectroscopy, *Biochemistry.*, **43**, 11932-11941.
- [64] **Hossain K.S., Ochi A., Magoshi J. ve Nemoto N.** (2003). Dynamic Light Scattering of Native Silk Fibroin Solution Extracted from Different Parts of the Middle Division of the Silk Gland of the *Bombyx mori* Silkworm, *Biomacromolecules.*, **4**, 350-359.
- [65] **Zhou L., Chen X., Shao Z.Z., Zhou P., Knight D.P. ve Vollrath F.** (2003). Copper in the Silk Formation Process of *Bombyx mori* Silkworm, *FEBS Lett.*, **554**, 337-341.
- [66] **Leisk G.G., Lo T.J., Yucel T., Lu Q. ve Kaplan D.L.** (2010). Electrogelation for protein adhesives, *Adv. Mater.*, **22**, 711-715.
- [67] **Winkler S. ve Kaplan D.L.** (2000). Molecular biology of spider silk, *Rev. Mol. Biotechnol.*, **74**, 85-93.
- [68] **Matsumoto A., Chen J., Collette A.L., Kim U.J., Altman G.H., Cebe P. ve Kaplan D.L.** (2006). Mechanisms of silk fibroin sol-gel transitions, *J. Phys. Chem. B.*, **110**, 21630-21638.
- [69] **Um I.C., Kweon H.Y., Lee K.G. ve Park Y.H.** (2003). The role of formic acid in solution stability and crystallization of silk protein polymer, *Int. J. Biol. Macromol.*, **33**, 203-213.
- [70] **Ayub Z.H., Arai M. ve Hirabayashi K.** (1993). Mechanism of the gelation of fibroin solution, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1910-1912.
- [71] **Lu, X., Xu, Y., Zheng, C., Zhang, G. ve Su, Z.** (2006). Ethylene glycol diglycidyl ether as a protein cross-linker: a case study for cross-linking of hemoglobin, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, 767-775.
- [72] **Nazarov, R., Jin, H. ve Kaplan, D.L.** (2004). Porous 3-D Scaffolds from Regenerated Silk Fibroin, *Biomacromolecules.*, **5**, 718-726.
- [73] **Ki C.S., Park S.Y., Kim H.J., Jung H.M., Woo K.M., Lee J.W. ve Park Y.H.** (2008). Development of 3-D nanofibrous fibroin scaffold with high porosity by electrospinning: implications for bone regeneration, *Biotechnol. Lett.*, **30**, 405-410.

- [74] **Hutmacher D.W.** (2000) Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage, *Biomaterials.*, **21**, 2529-2543.
- [75] **Li M.Z., Lu S.Z., Wu Z.Y. Yan H.J.** (2001a). Study on porous silk fibroin materials. I. Fine structure of freeze dried silk fibroin, *J. Appl. Polym. Sci.*, **79**, 2185-2191.
- [76] **Li M.Z., Wu Z.Y., Zhang C.S., Lu S.Z., Yan H.J., Huang D., Ye H.L.,** (2001b). Study on porous silk fibroin materials. II. Preparation and characteristics of spongy porous silk fibroin materials, *J. Appl. Polym. Sci.*, **79**, 2192-2199.
- [77] **Lv Q., Feng Q.L.** (2006). Preparation of 3-D regenerated fibroin scaffolds with freeze drying method and freeze drying/foaming technique, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **17**, 1349-1356.
- [78] **Liu X., Ma P.X.** (2004). Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Ann. Biomed. Eng.*, **32**, 477-486.
- [79] **Karakutuk, I., Okay, O.,** (2010). Macroporous rubber gels as reusable sorbents for the removal of oil from surface waters, *Reactive Functional Polymers.* **70**, 585-595.
- Url-1** <<http://faculty.ccbcmd.edu/~gkaiser/biotutorials/proteins/fg4a.html>>, erişim tarihi 15.07.2015.
- Url-2** <<http://www.nku.edu/~russellk/tutorial/peptide/peptide.html>>, erişim tarihi 15.07.2015.

ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad : Berkant YETİŞKİN

Doğum Tarihi ve Yeri : 09.01.1990/ Lüleburgaz

E-Posta : yetiskinb@itu.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2013, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü
- **Yükseklisans** : 2016, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Kimya Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2008-2013 yılları arasında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde okudu.
- 2012-2013 yılları arasında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Nanobilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde nanoteknoloji, hidrojen enerjisi ve metal nanopartikül yüklü hidrojeller üzerine çalıştı.
- 2013 yılında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Kimya Bölümü lisans programını tamamladı ve aynı sene İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Kimya Programı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.
- 2013-2016 yılları arasında İstanbul Teknik Üniversitesi Polimerik Jeller Araştırma Laboratuvarı'nda hidrojeller, kriyojeller ve biyomalzemeler üzerine çalıştı.
- 2015 yılında KKTC Yakın Doğu Üniversitesi'nde yapılan "International Biomedical Engineering Congress" adlı kongrede "Macroporous Double-Network Silk Fibroin Cryogels" adlı sunumuyla En İyi Sözlü Sunum Üçüncülük Ödülü'nü kazandı.
- 2016 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi'nde yüksek lisansını tamamladı.

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Yetişkin B., Okay O., 2015. Mekanik Dayanımı Yüksek İpek Fibroin Kriyojelleri. 27. *Ulusal Kimya Kongresi*, Ağustos 23-28, 2015 Çanakkale, Türkiye.
- Yetişkin B., Okay O., 2015. Macroporous Double-Network Silk Fibroin Cryogels. *International Biomedical Engineering Congress*, Mart 12-14, 2015 Lefkoşa, KKTC.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Seven F., Yetişkin B., Turhan T., Karacan E., Şahiner N., 2013. Imprinting Hydrogels with Metal Ions for Metal Nanoparticle Preparation and Use in Hydrogen Production as Catalysis Media. *245th American Chemical Society National Meeting and Exposition, Chemistry of Energy and Food*, Nisan 7-11, 2013 New Orleans, ABD.