

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Poly-3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate
(PHBV) ve Lif Kabağı Temelli Hidrojel Menisküs
Doku İskelelerinin Histoloji, Biyokimyasal ve
Biyomekanik Analizleri**

Gizem BAYSAN

**BİYOMEKANİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İzmir-2018

TEZ KODU: DEU. HSI. MSc-2014970141

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Poly-3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate
(PHBV) ve Lif Kabağı Temelli Hidrojel Menisküs
Doku İskelelerinin Histoloji, Biyokimyasal ve
Biyomekanik Analizleri**

Gizem BAYSAN

**BİYOMEKANİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Hasan HAVİTÇİOĞLU

İzmir-2018

TEZ KODU: DEU. HSI. MSc-2014970141

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyomekanik Anabilim Dalı, Biyomekanik Yüksek Lisans programı öğrencisi Gizem BAYSAN ‘Poly-3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHBV) ve Lif Kabağı Temelli Hidrojel Menisküs Doku İskelelerinin Histoloji, Biyokimyasal ve Biyomekanik Analizleri’ konulu Yüksek Lisans tezini 04.06.2018 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. Hasan HAVİTÇİOĞLU

BAŞKAN

DEÜ Tıp Fakültesi



Doç. Dr. Aylin ZİYLAN ALBAYRAK

ÜYE

DEÜ Metalurji ve Mlz. Müh. Böl.



Prof. Dr. Bülent YARDIMOĞLU

ÜYE

İYTE Makine Mühendisliği Böl.



Doç. Dr. Ahmet KARAKAŞLI

YEDEK ÜYE

DEÜ Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Funda TIHMINLIOĞLU

YEDEK ÜYE

İYTE Kimya Mühendisliği Böl.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	iii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR	vi
TEŞEKKÜR	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Menisküsün Morfolojisi	4
2.1.1. Menisküs Anatomisi ve Kanlanması	4
2.1.2. Menisküs Biyokimyası	7
2.1.3. Menisküs Biyomekanigi	7
2.2. Menisküs Yaralanmaları ve Tedavi Yöntemleri	9
2.2.1. Menisküs Yırtık Tipleri ve Görülme Sıklığı	9
2.2.2. Menisküs Yırtığı Tedavi Türleri	11
2.3. Menisküs Doku Mühendisliği	12
2.3.1. Doğal ve Sentetik Malzemeler İle Doku İskelesi Üretimi ve Kullanılan Yöntemler	13
2.3.2. Tıbbi Amaçlı Kullanımda Olan Doku İskeleleri	14
2.4. Çalışmada Doku İskelesi Üretilirken Kullanılan Malzemeler Hakkında Genel Bilgi	15
2.4.1. Kitosan	16
2.4.2. Lif Kabağı (Luffa Cylindrica)	17
2.4.3. Poli (3-hidroksibütrat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV)	18
2.4.4. Genipin	19
2.5. Kullanılan Yöntemler Hakkında Genel Bilgi	20
2.5.1. Elektro Eğirme Yöntemi İle Doku İskelesi Üretimi	20
2.5.2. Liyofilizasyon Yöntemi İle Doku İskelesi Üretimi	22

3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Araştırmanın Tipi	23
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	23
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları	23
3.4. Çalışma Materyali	23
3.4.1. Menisküs Doku İskelelerinin Hazırlanma Prosedürü	24
3.4.2. Menisküs Doku İskelelerinin Karakterizasyonları	27
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	29
3.6. Veri Toplama Araçları	30
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	32
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	32
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	33
3.10. Etik Kurul Onayı	33
4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
7. KAYNAKLAR	55
8. EKLER	65
8.1. Ek-1. Arbis Özgeçmiş	65
8.2 Ek-2 Etik Kurul Onayı	68

TABLO DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: Menisküsün ölçülerinin minimum, maksimum değerleri ve fark yüzdeleri	4
Tablo 2: Medial ve lateral menisküsün farklı kısımlarından alınan ölçüleri	5
Tablo 3: Sentetik, protein bazlı ve karbonhidrat bazlı doku iskelesi malzeme örnekleri	13
Tablo 4: Elektro eğirme yöntemi ile en sık kullanılan polimerlerden kıkırdak doku iskelesi üretimi ve lif kalınlıkları	14
Tablo 5: Kitin ve kitosan kaynakları	16
Tablo 6: Yıllara göre elektro eğirme tekniğini içeren yayın sayısı	21
Tablo 7: Çalışmada kullanılan cihazların listesi	30
Tablo 8: DMA analizinde depolama modülü, kayıp modülü ve $\tan(\delta)$ değerleri	40
Tablo 9: Diferansiyel Termal Analiz(DTA) sonuçları	43
Tablo 10: Kitosan, Kitosan L ve Kitosan F serilerine ait elastisite modülü değerleri	45
Tablo 11: Çalışmadaki Analizlerin Sonuçları	53

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: a)Menisküs anatomik yapısı b) Ölçüm alınan kısımlar	4
Şekil 2: Menisküsün farklı kesitlerindeki kollajen liflerin dizilimi	6
Şekil 3: Medial menisküs damarlanmasının artroskopik görünümü.....	7
Şekil 4: Gerilme deneyi yapılmış olan çalışmalarda kesit alınan yerler	8
Şekil 5: Menisküsün farklı yırtık tipleri	10
Şekil 6: Menisküs yırtıklarının farklı onarım teknikleri	11
Şekil 7: Doku mühendisliği kavramının özeti.....	12
Şekil 8: Tıbbi amaçlı menisküs implantları a) Medial Poliüretan b) Lateral Poliüretan c) Poliüretan Menisküs İmplantı SEM görüntüsü d) Menaflex TM Kollajen Menisküs İmplantı(KMİ) e) Menaflex TM Kollajen Menisküs İmplantı SEM görüntüsü	15
Şekil 9: Kitin ve Kitosan kimyasal yapıları ve dönüşümlerinin şematizasyonu.....	16
Şekil 10: Luffa Cylindrica bitkisinin görünümü a) meyvesi b) dışarıdan görünen kabuk kısmı c) kabuğu soyulmuş lif kabağı görünümü d)liflerin içerisindeki çekirdekli yapı e) Lif kabağından ara kesit görünümü f) lif kabağının fibriler yapısı g) NaOH ile farklı sürelerde işlem görmüş lif kabağının SEM görüntüsü.....	18
Şekil 11: PHB ve PHBV kimyasal içerikleri	19
Şekil 12: Genipinin üretim şeması	20
Şekil 13: Genipin ile amin gruplarının çapraz bağlanması	20
Şekil 14: Elektro eğirme sisteminin şematik gösterimi	21
Şekil 15: Lif kabaklarının a) NaOH işleminden önceki b) NaOH işleminden sonraki görüntüleri ve c) doku iskelesinin hazırlanması için kesilip kurutulan lif kabakları	24
Şekil 16: Kendi tasarlamış olduğumuz ıslak elektro eğirme düzeneği a) şırınga pompası b) koagülasyon banyosu c) küt uçlu şırınga ucu d) voltaj kaynağı.....	25
Şekil 17: Farklı süre ve farklı oranlarda genipin çapraz bağlanması sırasıyla 0,1-0,3-0,5% oranlarında genipin ilavesinden a)12 saat b) 24 saat c) 48 saat sonra.....	34
Şekil 18: Genipin ile çapraz bağlanmış kitosan sünger	34
Şekil 19: Kitosan serisine ait farklı genipin konsantrasyonlarında FTIR spektrumları	35
Şekil 20: Kitosan L serisine ait farklı genipin konsantrasyonlarında FTIR spektrumları	36
Şekil 21: Kitosan F serisine ait farklı genipin konsantrasyonlarında FTIR spektrumları	36
Şekil 22: Kitosan serisinin SEM ile 100x büyütme görüntüleri a) %0 b) %0,1 c) %0,3 d) %0,5 genipin ile çapraz bağlanmış menisküs doku iskeleleri	37

Şekil 23: Kitosan L serisinin SEM ile 100x büyütme görüntüleri a) %0 b) %0,1 c) %0,3 d) %0,5 genipin ile çapraz bağlanmış menisküs doku iskeleleri	38
Şekil 24: Kitosan F serisinin SEM ile 100x büyütme görüntüleri a) %0 b) %0,1 c) %0,3 d) %0,5 genipin ile çapraz bağlanmış menisküs doku iskeleleri e) PHBV fiberlerin yapıya entegre olduğu 500x büyütme ile çekilmiş SEM görüntüsü	38
Şekil 25: Farklı genipin oranlarında çapraz bağlanmış Kitosan serisine ait DMA analizi sonuçları; soldaki grafik depolama modülü- logaritmik frekans ve sağdaki grafik $\tan(\delta)$ -logaritmik frekans eğrileri	39
Şekil 26: Farklı genipin oranlarında çapraz bağlanmış Kitosan L serisine ait DMA analizi sonuçları; soldaki grafik depolama modülü- logaritmik frekans ve sağdaki grafik $\tan(\delta)$ -logaritmik frekans eğrileri	39
Şekil 27: Farklı genipin oranlarında çapraz bağlanmış Kitosan F serisine ait DMA analizi sonuçları; soldaki grafik depolama modülü- logaritmik frekans ve sağdaki grafik $\tan(\delta)$ -logaritmik frekans eğrileri	40
Şekil 28: Kitosan serisine ait TGA eğrileri	42
Şekil 29: Kitosan L serisine ait TGA eğrileri	42
Şekil 30: Kitosan ve Kitosan L serisinin şişme testi sonuçları	43
Şekil 31: Kitosan serisine ait basma deneyi gerilim-gerinim eğrileri	44
Şekil 32: Kitosan L serisine ait basma deneyi gerilim-gerinim eğrileri	44
Şekil 33: Kitosan F serisine ait basma deneyi gerilim-gerinim eğrileri	45

KISALTMALAR

MCL		Medial Kollateral Ligament
GAG		Glikozaminoglikan
MPa		Mega Pascal
ACL		Ön çapraz bağ
LML		Lateral Menisküs Uzunluğu
LMW		Lateral Menisküs Kalınlığı
LMC		Lateral Menisküs Çapı
LMBW		Lateral Menisküs Vücut Kalınlığı
MML		Medial Menisküs Uzunluğu
MMC		Medial Menisküs Çapı
MMW		Medial Menisküs Kalınlığı
MMBW		Medial Menisküs Vücut Kalınlığı
ISAKOS		Uluslararası Artroskopi, Diz Cerrahisi ve Ortopedi Spor Hekimliği Derneği
ECM		Ekstrasellüler Matriks/ Hücre Dışı Matriks
PLA		Polylactic Acid
PGA		Polyglycolic Acid
PCL		Polycaprolactone
PLGA		Polylactic-co-glycolic Acid
CMI		Kollajen Menisküs İmplantları
NaOH		Sodyum Hidroksit
PHBV		Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate
SEM		Taramalı Elektron Mikroskopu
FTIR		Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi
TGA		Termal Gravimetrik Analiz
DTG		Diferansiyel Termo Gravimetrik Analiz
DTA		Diferansiyel Termal Analiz
PHA		Poly(β -hydroxyalcanoate)
PHB		Poly(hydroxybutyrate)
ICI		Imperial Chemical Industries
PBS		Phosphate Buffered Saline
BTEAC		Benzyltriethylammonium Chloride
CH ₃ COOH		Asetik Asit
N ₂		Azot Gazı
T _{onset}		Bozunma Başlangıç Sıcaklıkları

T _d	Maksimum Bozunma Sıcaklığı
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-diphenyltetrazolium bromür
LDH	Laktat Dehidrogenaz
Kitosan L	Kitosan/Lif Kabağı Doku İskelesi
Kitosan F	Kitosan/Lif Kabağı/PHBV Fiber Doku İskelesi
Kitin	2-asetamido-2-deoksi-b-D-glukopiranoz
-NHCOCH ₃	Asetamid grubu
UVA	Ultra viyole A ışını



TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilimsel bilgilerini benimle paylaşan ve her türlü konuda büyük desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım değerli hocam Sn. Prof. Dr. Hasan HAVİTÇİOĞLU'na,

Fikirlerime değer vererek beni dinleyen, hiçbir kısıtlamaya gitmeden bana laboratuvarlarını açıp zamanlarını ayıran Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü'ndeki yardımları için değerli hocam Sn. Doç. Dr. Aylin ZİYLAN ALBAYRAK'a ve Araştırma görevlisi Sn. Oylum ÇOLPANKAN GÜNEŞ'e,

Mekanik dayanıklılık analizlerinin gerçekleştirilmesi ve yorumlanması sırasında göstermiş olduğu sabır ve destekten dolayı Sn. Reşit Buğra HÜSEMOĞLU'na,

Ortopedi ve Travmatoloji Bölümündeki değerli hocalarıma ve Biyomekanik Bölümündeki tüm diğer yüksek lisans ve doktora öğrencilerine, sekreterlerine, teknisyen ve hizmetlilerine,

Son olarak ama en önemlisi bulunduğum yere gelmeme yardımcı olan, benim ve eğitimimin her zaman arkasında duran annem Sn. Aynur ÇİNER, babam Sn. Kemal ÇİNER, anneannem Sn.Yaşar UYGUNER ile hayallerimi takip etmem konusunda hiçbir zaman desteğini esirgemeyen sevgili eşim Sn. Fırat BAYSAN'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Gizem BAYSAN
Haziran, 2018

Poly-3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHBV) ve Lif Kabağı Temelli Hidrojel Menisküs Doku İskelelerinin Histoloji, Biyokimyasal ve Biyomekanik Analizleri

Gizem BAYSAN, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Biyomekanik Anabilim Dalı, gizemciner@gmail.com, Balçova –İZMİR

ÖZET

Son yıllarda kişilerin günlük aktivitelerinin değişmesi sebebiyle menisküs yaralanmaları ortopedi cerrahisinin dolayısıyla da kas-iskelet doku mühendisliği uygulamalarının ilgi noktası olmuştur. Bu çalışmada da menisküs yaralanmalarının tedavisine yönelik kompozit yapıda bir doku iskelesi üretilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada kitosan, kitosan/lif kabağı ve kitosan/lif kabağı/PHBV içerikli üç farklı doku iskelesi üretilerek bu iskelelerin farklı genipin oranlarında özellikleri araştırılmıştır. Doku iskelelerinin oluşturulması için ıslak elektro eğirme ve liyofilizasyon yöntemlerinden yararlanılmıştır. Doku iskelelerinin kimyasal yapısının incelenebilmesi için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), morfolojik incelemeleri için Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), bası yüklenmelerine dayanımının ölçülebilmesi için basma testi gibi analizlerinin yanısıra Termal Gravimetrik Analiz (TGA), Dinamik Mekanik Analiz (DMA) ve şişme testleri gerçekleştirilmiştir.

Amaçlandığı gibi doğal malzemeler kullanılarak kompozit yapıda yeni bir doku iskelesi üretimi yapılmıştır. Genipin ile çapraz bağlanan doku iskelelerinin diğerlerinden daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Doğal bir selüloz kaynağı olan lif kabağının doku iskelelerine eklenmesi, hem dayanıklılık hem de şişme özellikleri üzerinde olumlu sonuçlar vermektedir. Ancak, çalışmanın başında PHBV katkısının doku iskelelerini güçlendireceği ve diğer gruplar ile arasında yüksek oranda fark olacağı düşünülmektedir. Sonuçlar ise aralarında anlamlı bir fark olduğunu düşündürmemektedir.

Anahtar Sözcükler: Kıkırdak Doku Mühendisliği, Lif Kabağı, Kitosan, PHBV

Histology, Biochemical and Biomechanical Analyzes of Poly-3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHBV) and Loofah Based Hydrogel Meniscus Scaffolds

Gizem BAYSAN, Dokuz Eylul University, Faculty of Health Sciences,
Biomechanics Department, gizemciner@gmail.com, Balçova –İZMİR

ABSTRACT

In the recent years, meniscus injuries have been the focus of orthopedic surgeons and musculoskeletal tissue engineering applications due to the changing daily activities of people. In this study, it was aimed to produce a composite scaffold for the treatment of meniscus injuries.

In the study, three different scaffolds which contain chitosan, chitosan/loofah and chitosan/loofah/PHBV were produced. Properties of these scaffolds were investigated at different genipin ratios. In order to produce these scaffolds, wet electro spinning and lyophilization techniques were used. There were several characterizations performed such as Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for the investigation of chemical structure, Scanning Electron Microscopy (SEM) for morphological analysis, compression test due to the axial loads meniscus faced, also Thermo Gravimetric Analysis (TGA), Dynamic Mechanical Analysis (DMA) and swelling tests.

A new composite meniscus scaffold was produced by using natural materials. The ones with genipin cross-linked have been shown to give better results than others.

The addition of loofah as a natural cellulose source, has a positive effect on both durability and swelling properties of the scaffolds. However, at the beginning of the study it was thought that the PHBV additive would strengthen the scaffolds and it was thought to show a huge difference among the other groups. As a result, there is not a significant difference among the three scaffold groups.

Key Words: Cartilage Tissue Engineering, Loofah, Chitosan, PHBV

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda kişilerin yaşam standartlarının değişmesi ile birlikte diz eklemi yaralanmalarında bir artış meydana gelmiştir. Bu yaralanmalar, kişilerde Ortopedi cerrahisinde kullanılan tedavi yöntemlerinin ilerleyen dönemlerde yetersiz hale gelmesi sebebiyle kişilerde diz protezine kadar gitmektedir. Bu sebeple, Ortopedi cerrahları doku mühendisliği uygulamalarından yararlanmaya başlamışlardır.

Önceleri işlevsiz bir doku kalıntısı olduğu düşünülen menisküs dokusunun 1950'lerin ortalarına gelindiğinde aslında diz eklemine stabilitesi üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Bu sebeple cerrahlar, çeşitli sebeplerle yaralanmış olan bu dokunun alınması yerine onarılması için yeni yöntemler geliştirmeye başlamıştır.

Özellikle 20. yüzyılın sonlarına doğru, doku mühendisliğinde menisküs protezlerine yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Polylactic acid (PLA), Polyglycolic acid (PGA), Polycaprolactone (PCL), Polylactic-co-glycolic acid (PLGA) ve ipek gibi birçok doğal kökenli malzemeden menisküs protezi üretilerek *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmıştır. Ancak, günümüzde tıbbi amaçlı kullanılan menisküs implantları kollajen ve poliüretan malzemelerinden üretilmiş olanlardır. Ancak, bu implantların en önemli sorunu uzun süre dayanıklılıklarının olmasıdır. Bu sebeple halen menisküs doku mühendisliğine ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmada, doğal kaynaklı malzemeler olan kitosan, lif kabağı ve PHBV kullanılarak üç farklı doku iskelesi tasarlanmıştır. Kompozit doku iskelelerinin eldesi için ıslak elektro eğirme ve liyofilizasyon yöntemlerine başvurulmuştur. Sadece kitosan içeren doku iskelesi için kitosan çözeltisi içeren kalıplar liyofilizatörde kurutulmuştur. Kitosan/lif kabağı içeren doku iskelesinde NaOH ile yıkanıp kurutulmuş lif kabaklarına kitosan çözeltisi emdirilerek liyofilizatörde kurutulmuştur. Kitosan/lif kabağı/PHBV içeren doku iskelelerinde ise PHBV fiberler ıslak elektro eğirme ile elde edildikten sonra liyofilizasyon işlemi ile lif kabaklarına entegre edilmiş ve tüm yapı kitosan çözeltisi emdirilerek tekrardan liyofilizatörde kurutulmuştur. Bu üç doku iskelesi için de %0, %0,1, %0,3 ve %0,5 genipin oranları denenmiştir.

Bu malzemeler doku mühendisliği ve ortopedi alanında çok sık rastlanılan malzemeler olmakla beraber birlikte kullanımlarına literatürde rastlanmamıştır. Ayrıca, kullanılan çapraz bağlayıcı genipinin bu malzemeler ile olan etkisi hakkında da literatür bilgisi yetersiz olduğundan ötürü çalışma bu alanda büyük yarar sağlayacaktır. Kullanılan tüm bu katkıların çalışmada üretilen doku iskelelerinin dayanıklılığını arttırması amaçlanmıştır. Üretilen menisküs doku iskelelerinin *in vitro* çalışmalarının geliştirilmesi ve deney hayvanları üzerinde *in vivo* denemeler yapılması ile doku mühendisliği için yeni bir yaklaşım geliştirilebilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

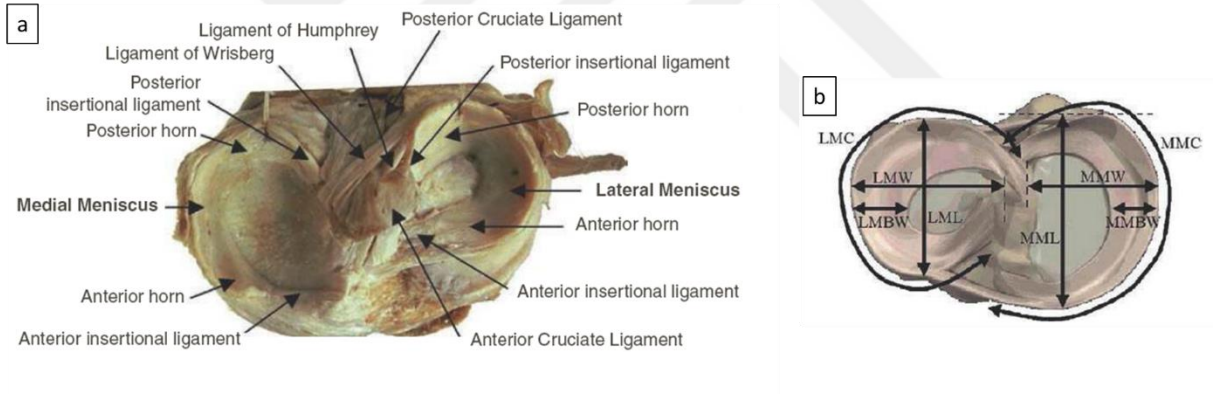
2.1. Menisküsün Morfolojisi

2.1.1. Menisküs Anatomisi ve Kanlanması

Neredeyse 20. yüzyılın ortalarına kadar menisküs dokusu bacakta kasların işlevsiz bir kalıntısı olarak kabul edilmiştir. Ancak, 1936 yılında King'in makalesi sayesinde menisküsün diz ekleminde çeşitli fonksiyonel görevleri üstlendiği anlaşılmıştır (1).

Şekil 1-a' da görüldüğü üzere menisküs, her iki dizde femoral kondil ve tibial plato arasında bulunan ve fibrokartilajdan oluşan hilal şeklindeki yapılardır (2).

Menisküsten enine kesit alındığı zaman kama şeklindeki yapılar olduğu görülmektedir. Bu yapılar, eklem kapsülüne anterior ve posteriordan ligamanlar yardımıyla bağlanmaktadır. Ayrıca, tibio-femoral eklem yüzeyini kısmen kapatan bu yapılar eklem yüzeylerine dış büküye çevre kenarından tutunmaktadırlar (2).



Şekil 1: a)Menisküs anatomik yapısı b) Ölçüm alınan kısımlar

Tablo 1: Menisküsün ölçülerinin minimum, maksimum değerleri ve fark yüzdeleri

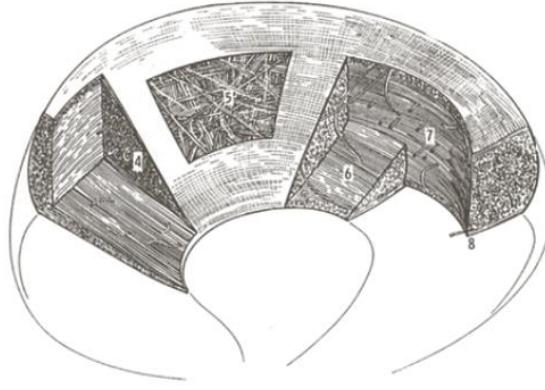
	En küçük değer(mm)	En büyük değer(mm)	Fark yüzdesi(max-min)
Medial Menisküs Kalınlığı	6.7	12.4	85.1
Lateral Menisküs Kalınlığı	8.3	14.5	74.7
Medial Menisküs Uzunluğu (MML)	30.1	56.1	86.4
Lateral Menisküs Uzunluğu (LML)	29.5	51.2	73.6
Medial Menisküs Genişliği()	23.3	32.7	40.3
Lateral Menisküs Genişliği	26.3	36.3	38.0

Tablo 2: Medial ve lateral menisküsün farklı kısımlarından alınan ölçüleri

	Ortalama(mm)	Standart Sapma	Değer Aralığı(mm)
Medial Menisküs Çapı(MMC)	99.0	9.3	84–119
Medial Menisküs Vücut Kalınlığı (MMBW)	9.3	1.3	6.7–12.4
Medial Menisküs Uzunluğu(MML)	45.7	5.0	30.1–56.1
Medial Menisküs Kalınlığı(MMW)	27.4	2.5	23.3–32.7
Lateral Menisküs Çapı(LMC)	91.7	9.6	78–112
Lateral Menisküs Vücut Kalınlığı (LMBW)	10.9	1.3	8.3–14.5
Lateral Menisküs Uzunluğu (LML)	35.7	3.7	29.5–51.2
Lateral Menisküs Kalınlığı (LMW)	29.3	3.0	24.0–36.3

İnsanlarda menisküsün çevre kenarı yaklaşık olarak 110 mm uzunluğa sahiptir (3). Popliteus tendon bölgesindeki lateral menisküsün bir kısmı hariç menisküsler uzunlukları boyunca çevre kenarlarda eklem kapsülünün iç kısmı boyunca tutunur. Bu kapsüller bağlantı ise koroner ligaman olarak adlandırılmaktadır. Orta noktasında, medial menisküs, medial kollateral ligamanın derin kısmı ile sağlam bir şekilde tutunmaktadır. (2) Şekil 1-b’de gösterilen bölgelerden ölçüm alınmış ve bu sonuçlar Tablo 1 ve Tablo 2’de gösterilmiştir (2). Tablo 1’de medial ve lateral menisküsün ölçülen boyutlarının minimum ve maksimum değerleri gösterilmekte iken Tablo 2’de bu boyutların menisküsün farklı kısımlarından alınan değerleri verilmektedir.

Şekil 2’de menisküsün farklı bölgelerinden kesit alındığındaki dizilimler gösterilmektedir. Şekil 2’nin üzerindeki rakamlar kesitin alındığı düzlemi ve yeri belirlemek için kullanılmıştır. Menisküsün yapısındaki kollajen liflerinin dizilimi dokunun işlevleri ile doğrudan ilişkilidir (4). Bullough ve ark. kollajen liflerinin esas yöneliminin gerilme kuvvetlerine karşı koyabilmek için çevresel olduğunu bulmuşlardır (4). Bunlara ek olarak, çoğunlukla menisküsün orta kısmında radyal olarak yönelmiş kollajen lifleri olduğu da gözlemlenmiştir ki bu liflerin menisküsün uzunlamasına bölünmesini önlemek üzere konumlanan bağlar olduğu düşünülmektedir (2).

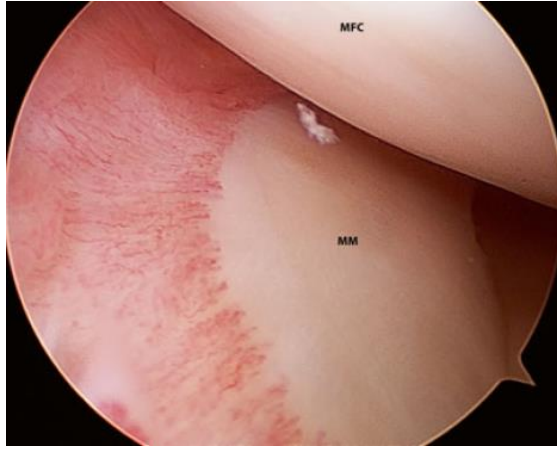


Şekil 2: Menisküsün farklı kesitlerindeki kollajen liflerin dizilimi

Menisküsün kanlanması bahsedecek olursak da yaşa ve belirli bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Medial menisküste beş anatomik bölgeden bahsedilebilir. Zone 1 medial menisküsün anterior kökünü kapsamaktayken Zone 2 antero-medial kısmını içerir. Zone 3 medial menisküsün medial kollateral ligament (MCL) seviyesinde yer almaktadır. Zone 4 ise medial menisküsün posterior boynuzuna denilmektedir. Son olarak da Zone 5, medial menisküsün posterior köküdür. Bu bölgelerin her birinde ayrı bağ ve yapılar bulunduğu için tamirinde farklı yöntemler kullanmak gerekmektedir (5).

Anatomik çalışmalar, menisküsteki damarlanmanın aslında medial ve lateral inferiordan ve orta geniküler arterlerden kaynaklandığını göstermiştir (6). Bu damarlanmanın dallanması ile ilk olarak perimeniskal kılcal plexus oluşur ve bu Policard tarafından tanımlanmış bir kavramdır (7). Bu perimeniskal kılcal plexustan radyal dallar menisküsün *periferine* aralıklarla penetre eder ve bu sayede ön ve arka boynuzlara daha zengin bir akış sağlanmış olur. Vaskülarizasyon her menisküs için farklılık göstermekte olup periferik vasküler bölgenin kapsamı da menisküs genişliğinin 10% ve 30%'u arasında değişmektedir. Bu oranların menisküs yırtıklarının iyileşmesinde önemli bir rolü bulunmaktadır (8).

Çalışmalar göstermiştir ki, doğduğumuz zaman menisküsün tamamı kanlanma özelliğine sahipken zaman içerisinde avasküler bölge oluşumu gerçekleşmiştir. Bu avasküler bölge oluşumu ilk olarak menisküsün iç bölgesinden başlar ve ikinci on yılda orta bölgeye kadar yayılarak kan damarlarının sadece dış bölgede görülmesine sebep olur. Bu ilerleyici damarlanma kaybının sebebinin diz hareketleri ve dizin taşıdığı ağırlığın artması olduğu düşünülmektedir. Menisküsün anterior ve posterior boynuzları damarlanma açısından en zengin kısımlardır (9). Şekil 3' te artroskopik olarak medial menisküsün çevresindeki sinoviyal vasküler beslenme gösterilmektedir. Orta geniküler arter, sinoviyal vasküler ağ ile menisküslere kan sağlamaktadır (5).



Şekil 3: Medial menisküs damarlanmasının artroskopik görünümü

2.1.2. Menisküs Biyokimyası

Sağlıklı bir menisküs dokusu 72% su, 22% kollajen, 0.8% glikozaminoglikan(GAG) ve 0.12% oranında DNA içeriğine sahiptir (10). Normal bir yetişkin menisküsü kuru ağırlık olarak 78% kollajen, 8% kollajen olmayan proteinler, 1% oranında hexosamine içeriğine sahiptir (11). Menisküs histolojik olarak incelendiğinde fibrokartilagenöz bir yapıda olduğu görülmüştür. Temelde, kollajen liflerinin hücreler, proteoglikan ve glikoproteinlerden oluşan bir hücre dışı matriks ile oluşturduğu ağ yapısına sahiptir (2).

Menisküste bulunan kollajen miktarının 90% dan fazlasını tip I kollajen oluşturmaktayken geri kalan miktarı tip II, III ve IV kollajen kaplamaktadır (12). Sığır menisküslerinde Cheung'un yaptığı çalışmalar ortaya koymuştur ki lokasyona göre kollajen tipleri farklılık göstermektedir (13).

Tip III ve V kollajenlerinin iz miktarları haricinde(< 1%), sığır menisküsünün çevresel üçte ikisi sadece tip I kollajen içerirken, tip II (60%) kollajen tip I'e (40%) göre baskındır (13). Bunlara ek olarak, kollajen liflerinin de hydroxypyridinium aldehytlerle yoğun şekilde çapraz bağlı oldukları gösterilmiştir (12).

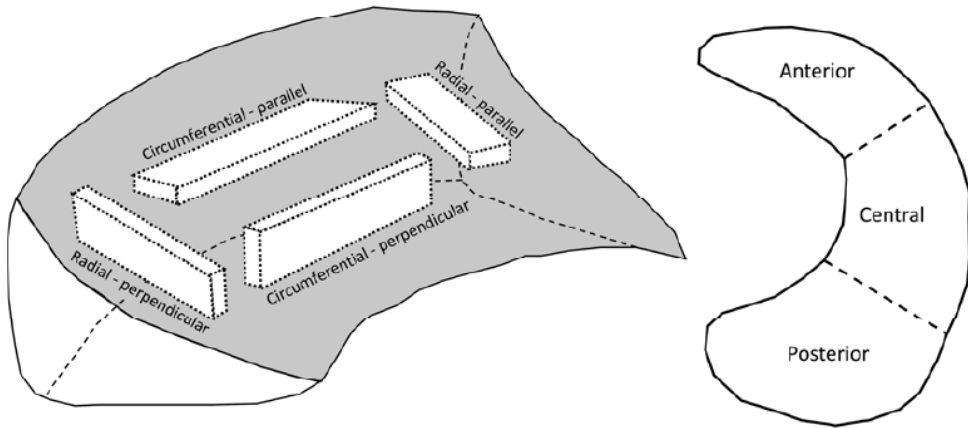
2.1.3. Menisküs Biyomekaniği

Bölüm 2.1.1.'de bahsedildiği üzere önceleri yararsız olduğu düşünülen menisküs dokusunun günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda aslında diz ekleminin stabilitesi ve yük dağılımında oldukça etkili olduğu ortaya konulmuştur. Bu dokunun varlığı sayesinde hem femurun distalinde hem de tibianın proksimalinde bulunan hiyalin kıkırdak dokusu korunmaktadır.

Menisküs dokusunun bu işlevleri kendine özgü geometrisi, malzeme özellikleri ve ligaman yapısının kombinasyonu sayesinde kazanılmıştır. Ayrıca, bu dokunun diz ekleminin yağlanması (14) ve propriyosepsiyonunda (15) önemli rolü olduğu düşünülmektedir. İyileşme yeteneğinin çok zayıf olması sebebiyle menisküs yaralanmalarının onarımı birçok araştırmacı için önemli bir hedeftir. Çünkü, bu zayıf iyileşme özelliğinden dolayı menisküs hasarları osteoartritin oluşumuna sebep olmakta veya ilerlemesini hızlandırmaktadır (16). Hatta ilerleyen dönemlerde diz protezine sebebiyet vermektedir.

Menisküs dokusunu biyomekanik açıdan değerlendirmek istediğimizde iki kuvvet temel alınabilir. Bunlardan ilki gerilme kuvveti olmakla birlikte bu konuda yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır (17) (18) (19). Menisküsün homojen olmayan yapısı nedeniyle, belirli geometrik şekillerdeki numuneler gerilme testine alınır. Bu numuneler Şekil 4'teki gibi çevresel veya radyal, menisküsün alt yüzeyine paralel veya dik olarak kesilerek şekillendirilebilir (16). Bunun yanı sıra, örnekler genellikle menisküs içindeki konumlarına göre yatay düzlemde sınıflandırılır: anterior, santral veya posterior. Çevresel olarak alınan kesitlerin, radyal olandan yaklaşık on kat daha güçlü olduğu (10 MPa'ya kıyasla yaklaşık 100 MPa) gösterilmiştir (16). Bu da menisküsün radyal olanlar yerine çevresel yırtıklara neden daha açık olduğunu açıklayabilir.

Radyal ve çevresel dayanım arasındaki farkın bir sonucu olarak, radyal yırtığın göreceli olarak nadir olduğu ve kollajen liflerini kırması gerektiği, dolayısıyla menisküsü bozduğu ve tamir edilmesi zor olduğu sonucuna varılmıştır. Bu durumun tersine, çevresel yırtıklarda tamir daha kolaydır. Çünkü menisküs dokusu radyal olarak gerilme kuvvetlerine dayanıksızdır. Ancak, bu yırtık boyunca daha düşük gerilme anlamına gelir. Bu sebeple tamiri göreceli olarak daha kolaydır. Çekme deney numunelerinin kesit alanının gerilme katsayısı üzerinde ters etkisi vardır. Kalın örneklerde, ince olanlara kıyasla daha fazla kollajen/su oranı bulunmaktadır (19).



Şekil 4: Gerilme deneyi yapılmış olan çalışmalarda kesit alınan yerler

Menisküs dokusunun karşılaştığı ve bahsedilmesi gereken bir diğer kuvvet ise bası kuvvetidir. İnsan menisküsünde üç farklı tipte bası testi yapılmıştır. Bunlar; serbest olmayan sıkıştırma, sınırlı sıkıştırma ve indentasyon deneyleridir (20) (21) (22). Bu test yöntemlerinin kombinasyonları, menisküs dokusunun lineer olmayan ve viskoelastik davranışları hakkında fikir sahibi olunmasını sağlamaktadır. Çalışmalar göstermektedir ki, menisküs dokusu basma kuvvetlerinde gerilimden (1 MPa'dan az) daha az sertliğe sahiptir. Bu özelliği, diz hareket ederken menisküsün kesitinin kondiler geometriye uymasını sağlar. Ayrıca, yaşı ilerlemiş kişilerde, posterior medial menisküste görülebilen menisküsün fonksiyon kaybı ve ekstrüzyonunu açıklamak için bir fikir verebilir. Derin fleksiyonlarda ise, tibial platonun kenarına sıkışarak, menisküsün enine kesitinde deformasyona neden olur (19).

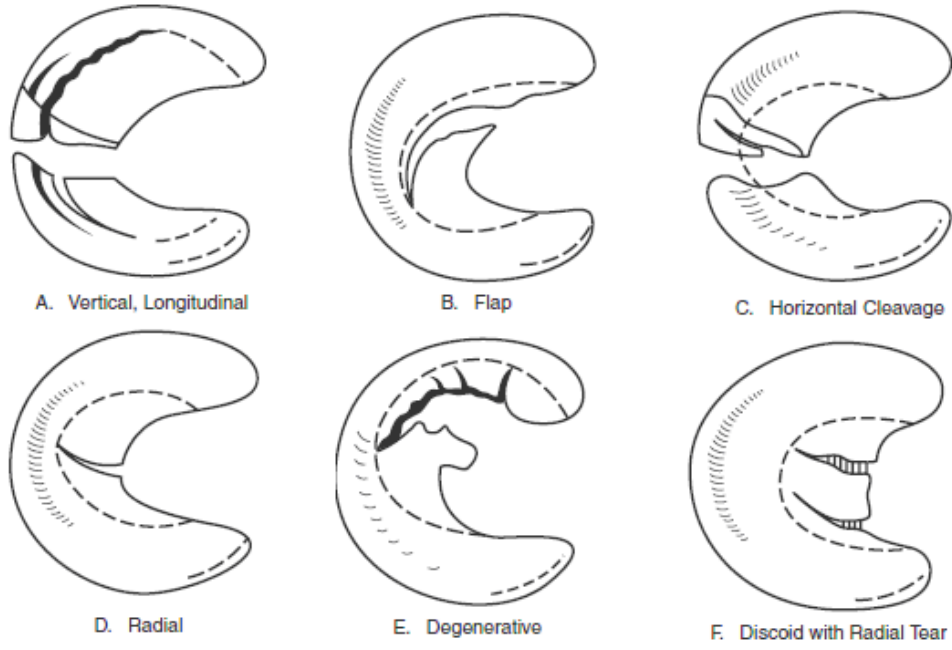
2.2. Menisküs Yaralanmaları ve Tedavi Yöntemleri

2.2.1. Menisküs Yırtık Tipleri ve Görülme Sıklığı

Diz ekleminin işlevselliği üzerinde önemli bir etkisi olan menisküs dokusunda oluşan lezyonlar dizde en sık görülen eklem içi yaralanmalarda ikinci sırada bulunmaktadır (23) (24). Bu sebeple ortopedik cerrahide en sık görülen hastalıklardandır (25) (26). Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde, menisküs lezyonlarının ortalama yıllık insidansının 100.000 kişi başına 61 ila 66 arasında değiştiği bildirilmiştir. Bu hastaların çoğu da menisektomi uygulanılarak tedavi edilmektedir (25). Menisküs yaralanmaları erkeklerde kadınlardan daha sık görülmektedir. En yüksek insidans her iki cinsin de 20-29 (25) (27) yaş aralığında olduğu dönemlerde ve en sık sağ dizde görülmektedir (24).

Sporcuların karşılaştığı diz eklemi yaralanmaları arasında en çok ön çapraz bağ (ACL) hasarları (20.34%) görülürken bu durumu medial (10.76%) ve lateral menisküs (3.66%) hasarları izlemektedir (28).

Menisküsün kısmen veya tamamen hasar görmesinin, uzun vadede dizlere olumsuz sonuçları olduğu belirtilmiştir (29). Son yıllarda, klinikte menisküs yaralanmalarına ilişkin önemli değişiklikler getirilmiş ve menisektomiden kaçınılarak yerine koyma yollarına gidilmeye başlanmıştır (30). Ayrıca, gelişen artroskopik teknikler ve geliştirilen cihazlar sayesinde bazı menisküs yaralanmalarında tedavi seçeneklerinde artış gözlemlenmeye başlanmıştır (31).



Şekil 5: Menisküsün farklı yırtık tipleri

2006 yılında, Uluslararası Artroskopî, Diz Cerrahisi ve Ortopedi Spor Hekimliği Derneği (ISAKOS) Diz Komitesinde standartlaştırılmış uluslararası meniskal dokümantasyon sistemi sunulmuştur ve bu sınıflama menisküs artroskopî cerrahisinde yırtıkların morfolojik özelliklerine dayandırılmaktadır (32).

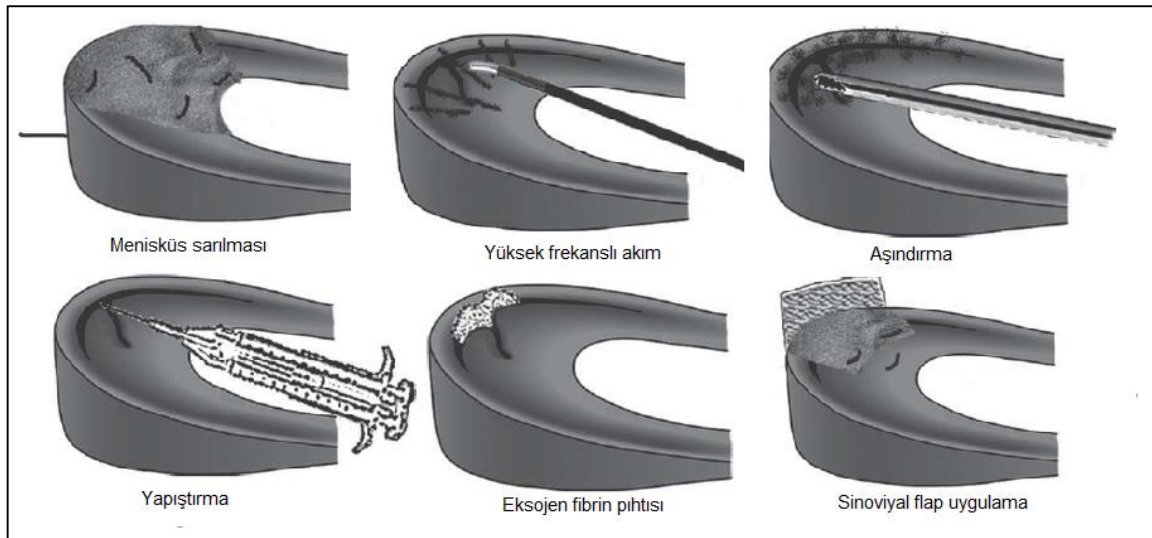
Menisküs yırtığı, bulunduğu bölgeye göre ve yırtığın oluşma şekline göre farklı isimler alabilir. Şekil 5'te altı farklı menisküs yırtık tipi gösterilmektedir. Bu sınıflandırma yırtığın şekline göre yapılmıştır. Örneğin, Şekil 5-a' da görülen boyuna-dikey yırtılma menisküs boyunca herhangi bir yere yerleşebilirken uzantısı bir kova sapı yırtığıyla sonuçlanabilir. Şekil 5-b'de görülen yırtık dikey veya yatay olabileceği gibi menisküsün alt veya üst yüzeyi, yatay kanat yırtılmasında bozulmadan kalabilir. Şekil 5-c'de yatayda oluşan yırtık, menisküsün iç kenarında başlar ve kapsüle doğru uzanır. Şekil 5-d'de oluşan yırtık tipi iç sınırda başlar ve kapsüle doğru uzanır. Bu tip yırtıklar genelde lateral menisküsün orta ve posterior üçte birlik kenarında bulunurken menisküsün kenarı boyunca uzanabilir. Şekil 5-e'deki yırtık tipinde ise çeşitli düzlemlerde yırtılma gösteren karmaşık desenler bulunmaktadır ve en sık rastlanan yırtık tiplerinden biridir. Son olarak da Şekil 5-e'de discoid yırtık gösterilmektedir. Diskoid menisküs, genellikle lateral olarak ortaya çıkan konjenital bir varyanttır. Watanabe bu anormalliği üç tipe ayırmıştır (33).

2.2.2. Menisküs Yırtığı Tedavi Türleri

Özellikle erken yaşlarda menisküs dokusunun kaybı diz eklemi için uzun dönemde zararlı sonuçlar doğurabilmektedir. Değişen mekanik yüklenmeler sebebi ile noktasal yüklenme artar, yük emilimi bozulur ve sonunda osteoartrit oluşumu gözlenir (34) (35). Bu durum protez ile sonuçlanabilmektedir. Bu da hem kişilerin yaşam kalitesi hem de maliyet açısından olumsuz etkilere sahiptir. Bu sebeplerle, ortopedi cerrahisi son yıllarda yapılmış olan araştırmaların ardından menisküs hasarlarını onarma yoluna girmiştir.

Menisküs iyileşmesinin geliştirilmesi, başarılı menisküs onarımı için gerekli olan bazı temel gereksinimlere dayanmaktadır. Menisküs onarımı için en çok dikiş tekniği kullanılmaktadır ve birçok farklı sütür teknikleri mevcuttur. Eğer, menisküs dokusunda dejeneratif değişiklikler olmadan önce onarım gerçekleştirilmişse başarı oranı daha fazladır. Gecikmiş cerrahi geçiren travmatik yırtıklar çoğunlukla bir miktar dejenerasyon gösterebilir. Bu durumlarda dikiş atmanın hala mümkün olup olmadığı genellikle subjektif bir karardır. Hasta gençken, bir miktar dejenerasyon mevcut olsa bile, menisküsün korunmasına duyulan ilgi artar (36).

Dikiş teknikleri kadar sık olmasa da kullanılan tedavi yöntemleri de mevcuttur. Bunlar Şekil 6'da görülmektedir. Aşındırma (37), sinoviyal flep uygulama (38), yüksek frekansta akım ile birleştirme (39), eksojen fibrin pıhtı (40) yardımı ile yırtığı tutturma ve yapıştırma (41) (42), kollajen zar (36) veya fascia ile yırtığı sarma (43) gibi yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerin kullanım sıklığı gittikçe artmaktadır. Ancak, tedavilerin başarı yüzdeleri istenilen sonuçları vermemektedir. Bu sebeplerden ötürü, günümüz araştırmacıları doku mühendisliği yöntemlerine başvurmaktadır.



Şekil 6: Menisküs yırtıklarının farklı onarım teknikleri

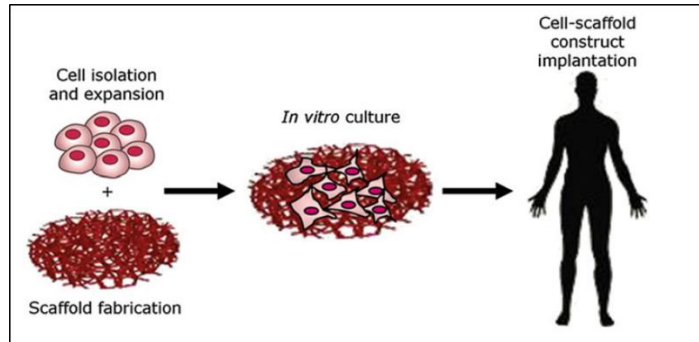
2.3. Menisküs Doku Mühendisliği

Menisküs, diz ekleminde kıkırdak üzerine binen aşındırıcı yüklenmeleri dağıtan bir yapıda olduğu ve hiyalin kıkırdakın bozulmasını önlediği için hem fizyolojik açıdan hem de biyomekanik açısından önemli bir göreve sahiptir (44). Ancak, menisküs yırtıkları diz ekleminin en sık görülen yaralanma tiplerindendir. Birçok vakada onarım prosedürleri yetersiz kalmakta ve hasarlı dokunun cerrahi yolla çıkarılması gerekmektedir. Buna rağmen, büyük oranda yapılan menisektomilerde kıkırdak yüzeylerinin temas alanında yüksek oranda azalma olduğu ve Bununla birlikte, büyük bir menisektomi, kıkırdak yüzeylerinin temas alanında muazzam bir azalmaya neden olur ve bu da ortalama ve tepe temas gerilmelerinin artmasına yol açar. Bu şekilde biyomekanik fonksiyonların bozulmasından dolayı, dizde geri dönüşümsüz dejeneratif değişiklikler ve osteoartrit oluşumu gözlemlenecektir (45) (46).

Doku ve organ kayıplarına yönelik güncel yaklaşımlar (allogreftler, ksenogreftler, otogreftler, biyomedikal cihazların implantasyonu, vb.) kişilerin yaşam kalitesini büyük ölçüde iyileştirmiş olmalarına rağmen enfeksiyon, zayıf entegrasyon ve implantın potansiyel reddi gibi istenmeyen durumlarla karşılaşılabilir (47). Bu tür sınırlamaların üstesinden gelmek, doku bozukluklarının onarımı ve hatta yeni doku ve organ üretimi düşüncesiyle rejeneratif tıp ortaya çıkmıştır (48).

Rejeneratif tıp konularına olan ilgi hızla artarak dünya çapında birçok bilim insanının ve cerrahın ilgisini çekmiştir. Günümüzde rejeneratif tıp uygulamaları, klonlama, hücre izolasyonu, hücresel olmayan yapıların kullanımı dahil birçok farklı konuyu barındırmaktadır. Son dönemlerde türemiş olan doku mühendisliği yaklaşımının da temeli rejeneratif tıptır.

“Doku mühendisliği” terimi ilk olarak 1980'lerin ortasında ele alınmış olmasına rağmen ilk olarak 1993'te Langer ve Vacanti'nin (49) doku mühendisliğini “mühendislik ilkelerini uygulayan disiplinler arası bir alan” olarak tanımlamasıyla ortak dilin bir parçası haline gelmiştir.



Şekil 7: Doku mühendisliği kavramının özeti

Şekil 7’ de şematik olarak doku mühendisliğinin amacı gösterilmektedir (50). Bu şekilde bahsedilen doku iskelesi kavramı, dokuların yerini almak, onarmak veya yenilemek için kullanılan hücrelerin veya biyoaktif maddelerin taşınmasını ve bağlanmasını kolaylaştırmak amacıyla kullanılan destek aracıdır (51). Bu yapılar sadece hücre büyümesini desteklemek için tasarlanmamıştır. Özellikle son dönemde üretilen doku iskeleleri hem özel işlevli biyoaktif molekülleri taşıyabilirken hem de morfoloji, mekanik özellikler ve yüzey kimyası açısından biyomimik olarak üretilmişlerdir.

2.3.1. Doğal ve Sentetik Malzemeler İle Doku İskelesi Üretimi ve Kullanılan Yöntemler

Hücre dışı matrisin 3 boyutlu ortamını taklit eden doku iskeleleri, hücrelerin kendi doğal fenotiplerini koruyarak çoğalması ve farklılaşabilmesi için gerekli desteği sağlamak amacıyla tasarlanmışlardır. Kimyasal özelliklerine göre birçok farklı tipte doku iskelesi sınıflandırabilmekteyiz. Bunlar, sentetik, protein veya karbonhidrat temelli doku iskeleleri olabilir. Tablo 3’te bu malzemelere en çok kullanılanlardan örnekler verilmektedir (52).

Tablo 3: Sentetik, protein bazlı ve karbonhidrat bazlı doku iskelesi malzeme örnekleri

Kullanılan Malzeme Türü	Kullanılan Malzeme Adı
Sentetik	Polylactic acid (PLA)
	Polyglycolic acid (PGA)
	Carbon fibre
	Calcium phosphate
	Polyesterurethane
	Polybutyric acid
	Polyethylmethacrylate
	Hydroxyapatite
	Dacron(Polyethyleneterephthalates)
	Teflon
	(Polytetrafluoroethylene)
Karbon Bazlı	Kollajen
	Fibrin
	Jelatin
Protein Bazlı	Selüloz
	Aljinat
	Kitosan
	Agar
	Hyaluronic acid

Biyo emilebilir polimerler doku iskeleleri oluşturmak için kullanılmaktadır. Bir doku iskelesinin başarılı şekilde üretildiğini gösteren belirteçlerinden biri de gözenekli yapısıdır. Bu sayede, hücre çoğalmasına izin verirler. Bununla birlikte, gözeneklerin boyutu, şekli ve birbirine bağlılığı, hızlı vaskülarizasyon ve büyümenin sağlanması için çok önemlidir (53).

Kıkırdak doku mühendisliği için birçok malzeme ile farklı yöntemlerde (liyofilizasyon, elektro eğirme, sprej tekniği, liflerin bağlanması, eriyik kalıplama, ekstrüzyon, gaz köpürtme ve faz ayrımı olabilir) doku iskelesi üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu sayede farklı gözenekte ve mekanik dayanımda yapılar elde edilebilmektedir. Tablo 4'te elektro eğirme yöntemi ile elde edilmiş olan ve lif kalınlıkları ölçülen en sık rastlanılan polimer malzemelerden birkaç örnek verilmektedir (54).

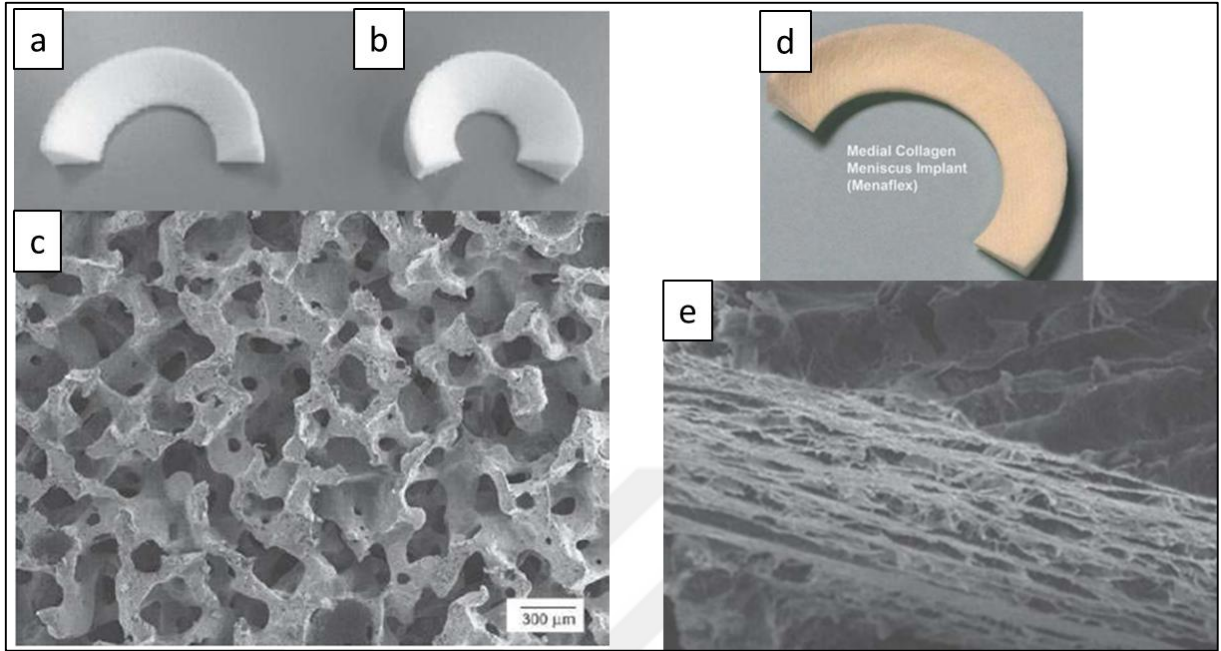
Tablo 4: Elektro eğirme yöntemi ile en sık kullanılan polimerlerden kıkırdak doku iskelesi üretimi ve lif kalınlıkları

Polimer çeşidi	Fiber kalınlığı(nm)	Referans makale
Polycaprolactone (PCL)	~700 400–800 ~438, ~519 ~700 ~500, ~3000	Li et al., 2005 Li et al., 2006a Li et al., 2007 Nam et al., 2007 Wise et al., 2009
PCL nano ve PLA macro	400–500 nano ~30 mm macro	Thorvaldsson et al., 2008
Polyglycolic acid (PGA)	300–600	Li et al., 2006a
Poly(lactic acid (PLA)	1000–1500	Li et al., 2006a
Poly(lactic-co-glycolic acid (PLGA)	500–1000 ~760	Li et al., 2006a Xin et al., 2007
Collagen II	~70, ~496	Shields et al., 2004
Chitin/chitosan	~40 – ~2000	Bhattarai et al., 2005
Silk	200–500	Zhang et al., 2009

2.3.2. Tıbbi Amaçlı Kullanımda Olan Doku İskeleleri

Menisküs doku iskelesi üzerine alınmış birçok patent ve literatürde deney hayvanlarında kullanılmış doğal içerikli birçok menisküs implantı olmasına rağmen günümüzde çoğunlukla Kollajen Menisküs İmplantları (CMI) tıbbi amaçlı kullanılmaktadır. Menaflex TM(kollajen) ve Actifit(poliüretan,vb.) gibi markalar tarafından üretilmiş olan menisküs implantları ile yapılmış olan çalışmalar yeni dokunun oluşumunu ve kayıp menisküs kıkırdağının yenilenmesini desteklediğini göstermiştir (55) (56). Bu çalışmalar menisektomi ile kıyaslandığında olumlu sonuçlar vermektedir. Ancak, degradasyonu malzeme içeriğinden ötürü çok hızlı olmaktadır.

Bu sebeple, özellikle ilerlemiş vakalarda uzun dönem sonuçları beklentiyi karşılamamaktadır. Şekil 8’de bu implantlardan Menaflex™ marka olana örnek gösterilmektedir. Şekil 8-b’de mikroskop altında gözeneklilik yapısı görülmektedir (2) (57).



Şekil 8: Tıbbi amaçlı menisküs implantları a) Medial Poliüretan b) Lateral Poliüretan c) Poliüretan Menisküs İmplantı SEM görüntüsü d) Menaflex™ Kollajen Menisküs İmplantı(KMI) e) Menaflex™ Kollajen Menisküs İmplantı SEM görüntüsü

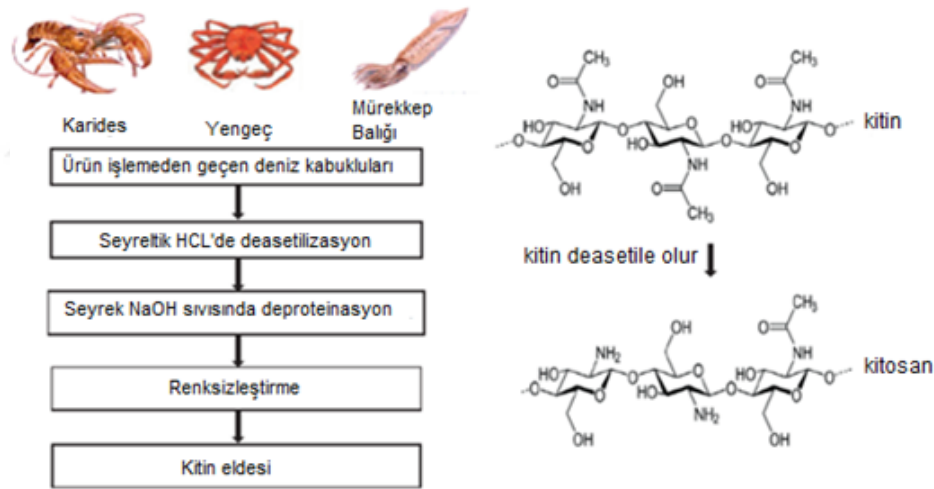
2.4. Çalışmada Doku İskelesi Üretilirken Kullanılan Malzemeler Hakkında Genel Bilgi

Bu çalışmada üretilmiş olduğumuz menisküs doku iskelesi üç tiptir. Her bir doku iskelesi için çapraz bağlayıcı oranları optimize edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla kullanmış olduğumuz çapraz bağlayıcı genipindir. Genipinsiz, 0.1% genipin, 0.3% genipin ve 0.5% genipin oranları denenmiştir. İlk doku iskelesi, sadece kitosandan çözeltisinin liyofilizasyon işleminden geçirilmesiyle elde edilen süngerdir. İkincisi, NaOH ile yıkanıp kurutulmuş olan lif kabağına kitosan çözeltisi emdirilerek aynı ilk doku iskelesinde olduğu gibi liyofilizasyon işleminden geçirilmesiyle elde edilmiştir. Son doku iskelesinde ise, NaOH ile yıkanıp kurutulmuş olan lif kabaklarının ıslak elektro eğirme yöntemi ile elde edilmiş olan PHBV nanofiberlere entegre edilmesinden sonra liyofilizatöre konulmuştur. Burada oluşturulmuş olan süngerler kitosan çözeltisi emdirilerek tekrardan liyofilizasyon işlemine tutulmuştur. Bu kısım, üç farklı tipteki doku iskelesinin oluştuğu bu malzemeler hakkında bilgi vermek amaçlıdır.

2.4.1. Kitosan

(1-4) ile bağlanmış 2-asetamido-2-deoksi-b-D-glukopiranoz birimlerinden oluşan lineer bir polisakkarit olan kitin (58) , doğada bulunan polimerize karbon formları arasında ikinci sıradadır. (59) Selüloz üreten organizmalarda görülmemesine rağmen, selüloz türevi olarak kategorize edilir. Yapısı selüloza benzer olmasına rağmen C2 pozisyonunda bir asetamid grubu ($-NHCOCH_3$) bulunmaktadır. Yumuşakçalar, kabuklular, böcekler, mantarlar, algler ve bu sayılanların akrabası olan türler her yıl yaklaşık 10 milyar ton kitin üretirler. Kitin biyolojik olarak yenilenebilir, çevre dostu, biyo-uyumlu, biyo-bozunur ve biyo-fonksiyonel bir materyaldir. Bu sebeple, birçok su arıtma maddesi, ilaç taşıyıcılar, yara iyileştirici ajanlar, vb. uygulamalarda yer almaktadır (60).

Kitosan ise kitinin N-deasetilasyon derecesinde türevidir, ancak bu N-deasetilasyon neredeyse hiçbir zaman tamamlanmamıştır. Kitin ve kitosan arasında N-deasetilasyon derecesine göre keskin bir terminoloji tanımlanmamıştır (61) (62). Kitin ve kitosan yapıları Şekil 9’da gösterilmektedir (60). Bunlara ek olarak Tablo 5’te ise kitin ve kitosan kaynaklarına örnek verilmektedir (60).



Şekil 9: Kitin ve Kitosan kimyasal yapıları ve dönüşümlerinin şematizasyonu

Tablo 5: Kitin ve kitosan kaynakları

Deniz Canlıları	Böcekler	Mikroorganizmalar
Kabuklular	Akrepler	Yeşil Alg
Sölenterler	Dallı Bacaklılar	Maya (B-Tipi)
Annelidler	Hamamböcekleri	Mantarlar (Hücre Duvarları)
Mollusk	Örümcekler	Mycelia Penicillium
Istakozlar	Böcekler	Kahverengi Alg
Karideslar	Karıncalar	Chytridiaceae
Dev Karidesler		Ascomydes
Krill		Blastocladiaceae
Yengeçler		Sporlar

Kitosanın biyolojik özelliklerinden bahsedecek olursak, bu malzeme sadece biyoyumlu olmakla kalmayıp aynı zamanda da biyo-adezivite, biyoaktivite, toksik etkisi olmama, biyolojik olarak parçalanabilirlik, emilebilirlik, antimikrobiyal aktivite (mantarlar, bakteriler, virüsler gibi birçok türe karşı), antiasit, anti ülser ve antitümöral özellikler, kan antikoagülanı olma, hipolipidemik aktivite gibi birçok özellik gösterebilmektedir (63). Bu özelliklerine ek olarak, çözünürlüğünden bahsedecek olursak hidrojen bağlarıyla kuvvetli moleküller arası bağlara sahip olan kitin benzeri selülozun çözünmesi zordur (64). Kitin birçok organik çözücünde çözünmezken, kitosan pH 6.0'ın altındaki seyreltik asidik çözeltilerde büyük ölçüde çözünebilir.

Kitin ve kitosan, günümüzde birçok sektörde tercih edilen malzemelerden olmuşlardır. Örneğin, kitosanın kullanım alanlarını ele alacak olursak; emilebilirlik yeteneği sayesinde fotoğrafçılık alanında, ilaç salınımında, asiti gördüğünde jelleşebilmesi nedeniyle kozmetik alanında, yara iyileştirici etkisi olması sebebiyle deri taklit eden suni yapılar geliştirilmesinde biyomedikal alana yönelik olarak, hayvancılıkta besin takviyesi olarak, su arıtımında, özellikle mekanik dayanımı sayesinde oftalmolojide, boya bağlayıcı özelliği sebebiyle tekstilde ve daha birçok üretim sektöründe kitosan ile karşılaşabilmekteyiz. Bu özellikler, kitosanı, mevcut ve gelecekteki uygulamalarda özellikle ilaç endüstrisi ve doku mühendisliği çalışmaları için heyecan verici ve umut verici bir yardımcı maddeye dönüştürmüştür.

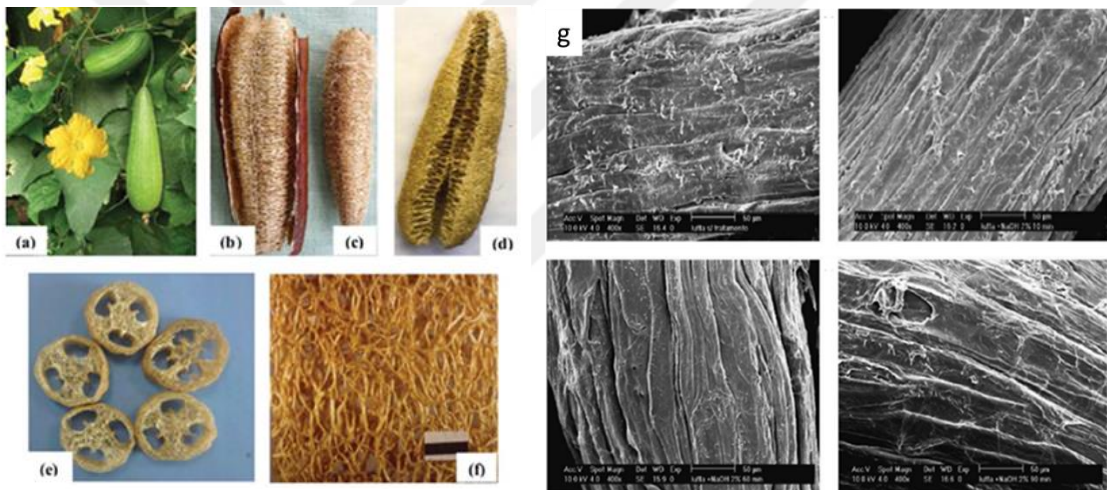
2.4.2. Lif Kabağı (*Luffa Cylindrica*)

Bu malzeme en çok lif kabağı olarak bilinmekle beraber bazıları tarafından *Luffa Cylindrica* veya *Sponge Gourd*(sünger kabak) olarak da tanınmaktadır. Doğal malzemelere olan ilginin artması ve düşük maliyetli malzeme arayışlarına girilmesiyle beraber bitki liflerine olan yönelim gittikçe artmaktadır. Çin, Japonya ve Asya ve Orta ve Güney Amerika'da diğer ülkelerden daha yaygın olarak bulunmasına rağmen, teknik literatürdeki özellikleri ve özellikleri hakkında kapsamlı bir çalışma olmaması, bu fiberi egzotik bir malzemeye dönüştürmektedir (65).

Curcubitacea ailesinden (66) olan sünger-kabak (*L. cylindrica*) bitkisinin meyvesi Şekil 10'da gösterilmektedir (65). Gösterilen olgun meyve, kalın bir kabuğa sahiptir ve doğal bir mat içeren çok yönlü bir lif dizisine sahiptir. İç kısmında çekirdekleri bulunmaktadır. Çoğunlukla kullanım alanı banyo süngeri veya kozmetik olmasına rağmen, küçük bir lif kabağı çeşidi olan *acutangula*, sinüslerde tıbbi amaçlı olarak proteinleri hareketsizleştiren yataklar olarak kullanılmaktadır (67). Lif kabaklarının uzunlukları genellikle 15-25 cm ile 1.20–1.50 m arasında değişebilmektedir (66) (68).

Lif kabağının doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak istenmesinin nedenleri arasında kimyasal kompozisyonu gelmektedir. İçeriğinde % 4.2 protein, % 1.08 lipit, % 1.04 kül, % 55.78 fiber ve % 37.81 (69) karbonhidrat bulunmaktadır. Esas kompozisyonu 60% selüloz, 30% hemiselüloz ve 10% lignin olarak sayılabilir (70). Bunlar sırasıyla, % 50-60, % 25-28 ve % 10-12 arasında değişen miktarlarda olabilir (71). Lignoselülozik liflerdeki lignin yüzdesindeki farklılıklar çevresel ve metabolik faktörlere bağlıdır. Ayrıca, meyvenin olgunlaşması sırasında hücre duvarları lignin ve selüloz çökmesi nedeniyle ilerleyici modifikasyonlara uğrar (72). Gözenekli yapı eldesi bu şekilde gerçekleşmiş olur.

Lif kabağının doku iskelesi olarak kullanılmasından önce birtakım işlemlerden geçmesi gerekmektedir. Bu sayede yıkanarak istenmeyen kalıntılardan arındırılmış olacaktır. Bu işlemi gören lif kabaklarına ait Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri Şekil 10-g'de verilmektedir (66). Sol üstteki işlenmemiş, diğerleri sırasıyla 10-60-90 dakika işlem görmüş olan lif kabaklarının görüntüsüdür.



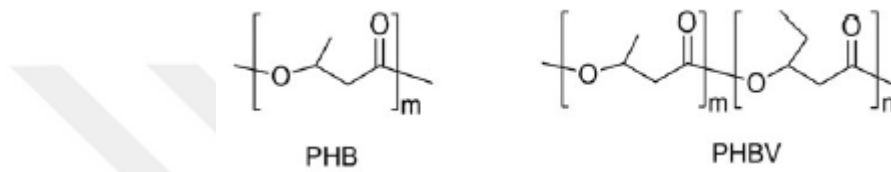
Şekil 10: Luffa Cylindrica bitkisinin görünümü a) meyvesi b) dışarıdan görünen kabuk kısmı c) kabuğu soyulmuş lif kabağı görünümü d)liflerin içerisindeki çekirdekli yapı e) Lif kabağından ara kesit görünümü f) lif kabağının fibriler yapısı g) NaOH ile farklı sürelerde işlem görmüş lif kabağının SEM görüntüsü

2.4.3. Poli (3-hidroksibütrat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV)

Poly(β -hydroxyalcanoate)(PHA)'lar arasında, biyolojik olarak parçalanabilen bu mikrobik polimer, temelde bir hidroksibutirat ve hidroksivalerat kopolimeridir. İlk olarak 1983 yılında ICI tarafından sentezlenmiştir (73). Propiyonik asidin bakteri ortamı için gereken besin maddelerine eklenmesiyle üretilir. Ayrıca, karışık karbon kaynağı içermektedir (74). PHBV, erime noktası 108 ° C ve cam geçiş sıcaklığı -5°C ila 20°C arasında olan yüksek

derecede kristal yapıdaki bir polimerdir (75). Aynı zamanda poly(hydroxybutyrate) (PHB)'den daha az kırılıgandır. Kopma noktasındaki uzama % 15'ten düşük oranda ve elastik modülü 1.2 GPa'dır (73).

PHB veya PHBV'nin zayıf mekanik özelliklerinin üstesinden gelmek ve bu polimerlerin bozunma hızını arttırmak için, diğer polimerler veya katkı maddeleri ile kompozisyonları kullanılmaktadır (76) (77). Ancak, kimyasal uyumsuzluk nedeniyle diğer polimerlerle karışımların elde edilmesi zordur. Buna rağmen polimer karıştırma oldukça sık karşılaşılan çalışmalardandır (78). Günümüzde, geniş bir ihtiyaç yelpazesini kapsayabilen spesifik bir özellik gösteren birçok karışım çalışılmış ve üretilmiştir (79). Şekil 11'de PHB ve PHBV'nin kimyasal kompozisyonları da gösterilmektedir (80).

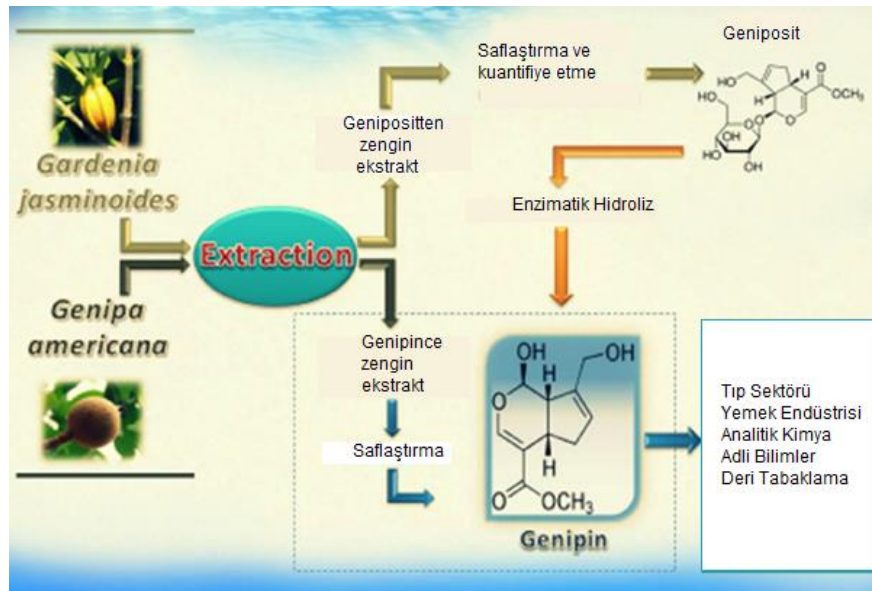


Şekil 11: PHB ve PHBV kimyasal içerikleri

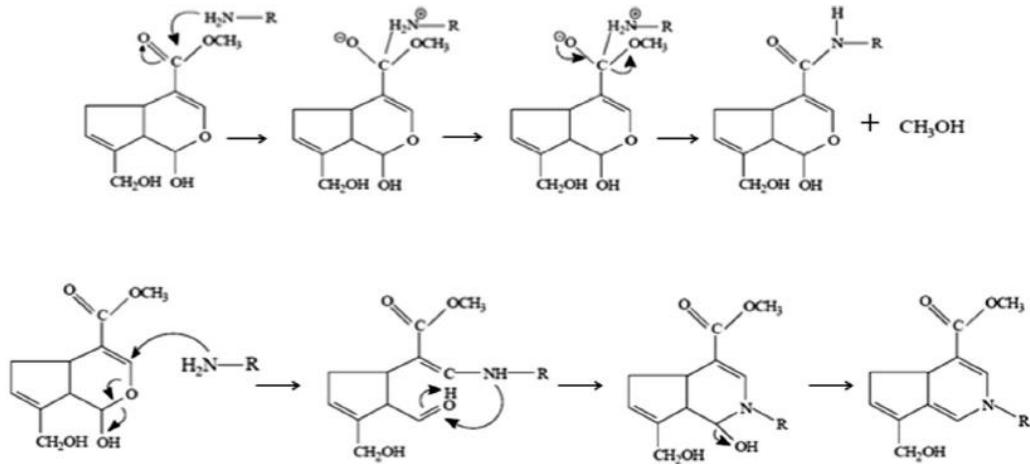
2.4.4. Genipin

Tıp ve gıda endüstrisi gibi farklı alanlarda uygulanması için büyük bir potansiyele sahip bir malzeme olan genipin, doğrudan *Genipa americana* veya *Gardenia jasminoides* meyvelerinden geniposid hidrolizinden sonra elde edilebilen iridoid çapraz bağlama bileşiğidir (81) (82).

1960'ların başlarında, Djerassi (83) ve meslektaşları, bu doğal ürün olan $C_{11}H_{14}O_5$ 'in yapısını genipin olarak adlandırmışlardır (84). Genipin, koyu mavi pigmentler oluşturarak kendiliğinden amino asitlerin, peptidlerin veya proteinlerin primer amin grupları ile reaksiyona girebilir. Suda, alkolde ve propilen glikolde çözünür. Bu özellikleri sebebiyle, içecek ve yiyecek sektörünün yanı sıra pamuk, yün ve derilerin boyanmasında bir renklendirici olarak kullanılmaktadır (85). Genipinin üretim şeması Şekil 12'de (86) ve ardından da genipin ile amino gruplarının çapraz bağlanması Şekil 13'te gösterilmektedir (87).



Şekil 12: Genipinin üretim şeması



Şekil 13: Genipin ile amin gruplarının çapraz bağlanması

2.5. Kullanılan Yöntemler Hakkında Genel Bilgi

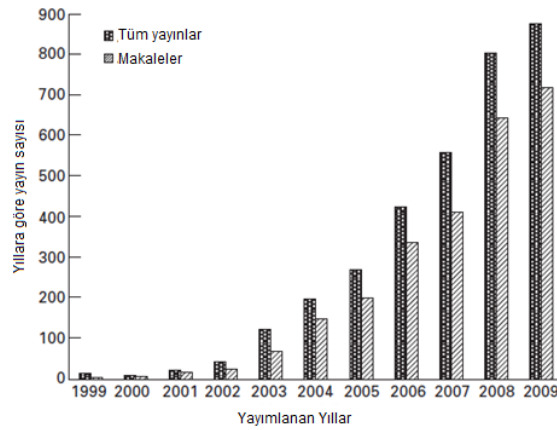
2.5.1. Elektro Eğirme Yöntemi İle Doku İskelesi Üretimi

Elektrostatik eğirme (veya püskürtme) işleminin bir türevi olarak düşünülebilecek elektroegirme, submikrometreden nanometre çaplarına kadar sürekli ultra ince lifler üretebilen bir tekniktir. Sıvı damlaların oluşumunu indüklemek için yüksek voltajlı elektrik akımı kullanma fikrinin temelleri bundan 100 yıldan öncelerine kadar dayanmaktadır (88) (89) (90) (91).

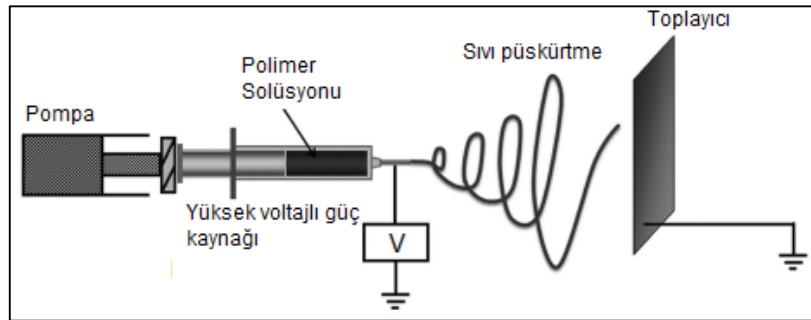
Elektroegirmeden ilk bahseden çalışma Formhals'in, yüzey yükleri arasındaki elektrostatik itilmelerden yararlanarak polimer filamentleri üretmek için bir cihazı açıkladığı

1934 yılında yapılmıştır (92). Bu erken keşiflere rağmen, 1990'ların başlarına kadar bu teknik ticarileştirilememiştir. Özellikle Reneker ve ark. geniş bir organik polimer yelpazesinde ince liflerin üretilmesini sağlayarak bu tekniğe olan ilgiyi arttırmışlardır (93) (94). Son yıllarda, bu alandaki yayınların sayısı, görüntüleme tekniklerindeki gelişmeler, karmaşık yapılarıdaki doku iskelelerinin üretilmesi ve doku mühendisliğinin uygulanması için nanoteknoloji ve biyoteknolojiden yararlanılması sayesinde katlanarak artmıştır. Bu da Tablo 6'da görülebilmektedir (95).

Tablo 6: Yıllara göre elektro eğirme tekniğini içeren yayın sayısı



Tipik bir elektroegirme işleminde, bir polimer çözeltisi veya eriyikten fiber oluşturabilmek için yüksek voltaj kullanılmaktadır (93). İşlemi tamamlamak için üç ana bileşen gereklidir: yüksek voltajlı bir güç kaynağı, kılcal borulu bir *spinner*(fiberi eğirmek için) ve normal olarak topraklanmış bir toplayıcı (96). Çoğu zaman, *spinneret*, polimer çözeltisini besleyen bir şırıngaya bağlanır ve çözelti, bir şırınga pompası kullanılarak sabit bir oranda beslenebilir. Yüksek bir voltaj uygulandığında, bu spinneret ucundaki damla statik olarak yüklenir ve yükler yüzeye eşit olarak dağıtılır (97). Yerçekimi, yüzey gerilmesi ve elektriksel gerilme kuvvetlerine maruz kalan bu damladan sıvı bir jet meydana gelir. Bu sıvı jetin uzaması ve toplayıcıya ulaşana kadar çözücünün buharlaşmasıyla sürekli fiberler elde edilir. Şekil 14'te elektroegirme sisteminin şematik gösterimi verilmektedir (95).



Şekil 14: Elektro eğirme sisteminin şematik gösterimi

2.5.2. Liyofilizasyon Yöntemi İle Doku İskelesi Üretimi

Yüksek oranda gözenekliliğe sahip doku iskeleleri üretebilmek için, dondurarak kurutma tekniği/ liyofilizasyon çok sık tercih edilmektedir. Dondurarak kurutma tekniği sayesinde % 90'dan daha fazla miktarda gözeneklilik oranına sahip doku iskeleleri üretilebilirken aynı zamanda gözenek boyutlarının kontrol edilmesi mümkündür (98). Temelde bu yöntem, bir polimer-çözücü çözeltisi ve suyun homojenleştirilmesi sayesinde emülsiyon oluşturulmasına dayanmaktadır. Sıvı hal yapısını kilitlemek ve çözücü ile suyu dondurarak kurutmak için emülsiyon hızla soğutulur (99). Polimer ve kompozit doku iskelelerinin üretilebilmesi için, dondurarak kurutma tekniği çok tercih edilen bir yöntemdir. Bu teknik sayesinde daha dayanıklı ve sert doku iskeleleri üretmenin mümkün olduğu gözlemlenmiştir (99). Farklı gözenekliliğe sahip örnekler, polimer konsantrasyonu ve dondurarak kurutma parametrelerinin değiştirilmesiyle elde edilebilir.

Önceki çalışmalarda gözenekli yapının polimer çeşidi, polimer çözeltisinin konsantrasyonu, çözücü ve su oranları, liyofilizasyon sıcaklığı vb. işlem parametrelerinin değiştirilmesiyle kontrol edilebileceği bildirilmiştir (99) (100). Bu yöntem ile üretilmiş olan poly(α -hydroxy acid) doku iskelelerinin gözeneklilik oranının %90'dan fazla, gözenek boyutlarının 100–350 μ m aralığında ve açık gözenek yapısında olduğu rapor edilmiştir (101). Bu çalışmada, PLA / PLGA çözeltileri -5 ila -198°C arasında çeşitli sıcaklıklarda dondurulmuş ve çözücünün 0°C'de 3 gün vakum altında (<50 mTorr) süblimleşmesi sağlanmıştır. Bu sayede farklı gözeneklilikleri oluşmuş olan polimer plakaları yine vakum altında 12 saat boyunca 30 ve 37°C'lik oda sıcaklığına ısıtılarak tüm çözücünden kurtulunması sağlanmıştır (101).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Çalışmamızda, yeni bir menisküs doku iskelesi tasarımı yapılmıştır. Tasarlanan üç farklı özellikte doku iskelelerinin optimum değerleri ve içlerinden hangisinin menisküs dokusunun yapısına daha uygun olduğu araştırılmıştır. Bu sebeple, tamamlanmış olan bu çalışmamız deneysel bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Tez için literatür taramaları ve tez verilerinin sunumuna kadar olan tarihler Nisan'17-Haziran'18 arasındadır. Çalışmamızda hazırlamış olduğumuz menisküs doku iskeleleri Ağustos'17-Nisan'18 tarihleri arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında hazırlanmış ve karakterizasyonları tamamlanmıştır. Ayrıca, doku iskelelerinin biyouyumluluk testleri için ön çalışmalar ve mekanik karakterizasyonları, Mart'18-Nisan'18 tarihleri arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi, Biyomekanik Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Tez sunumu Haziran'18 tarihinde yapılmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni Ve Örneklemi/ Çalışma Grupları

Tamamlanmış olan bu araştırmada, kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarına yönelik menisküs doku iskelesi üretimi ve bu doku iskelelerinin karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple, araştırmanın evreni kıkırdak doku mühendisliği ve örneklemi de menisküs doku iskeleleridir. Bu çalışma için üç farklı doku iskelesi üretilmiştir.

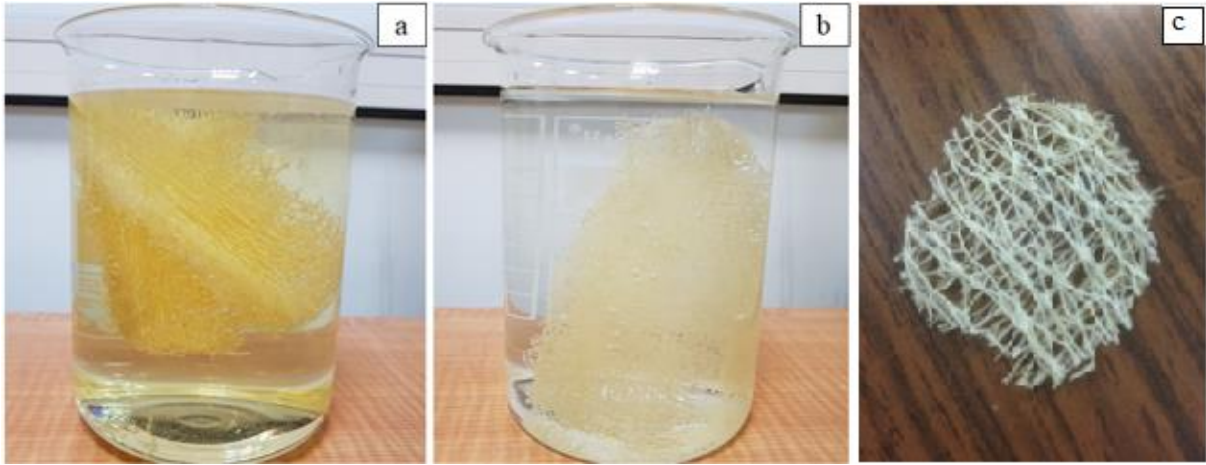
3.4. Çalışma Materyali

Çalışmamızda, üç farklı menisküs doku iskelesi hazırlanarak bu iskelelerin karakterizasyonları yapılmıştır. Hazırlanan ilk grup kontrol grubu olan ve sadece kitosan çözeltisinin liyofilizatörde kurutulmasıyla oluşturulmuş olan süngerlerdir. Deney grubu 1'de ise lif kabağına kitosan çözeltisi emdirilerek liyofilizasyon işlemine tabi tutulmasıyla elde edilen süngerler karşılaştırılmaktadır. Son grup olan Deney grubu 2'de ise ıslak elektro eğirme ile elde edilmiş olan PHBV fiberlerin lif kabaklarına entegrasyonu sonrası kitosan çözeltisinin emdirilmesiyle liyofilizasyon işleminden geçirilen süngerler bulunmaktadır. Bu doku iskelesi gruplarının herbiri için üç farklı genipin konsantrasyonu ile çapraz bağlanmaları gerçekleştirilerek her grup için optimum konsantrasyon araştırılmıştır. Her grup hem kendi arasında hem de birbiri ile kıyaslanmaktadır.

3.4.1. Menisküs Doku İskelelerinin Hazırlanma Prosedürü

Lif Kabaklarının Hazırlanması:

Bütün haldeki kurumuş lif kabağı bitkisi, çekirdekleri temizlenip ek yerlerinden makas yardımı ile kesilerek parçalara ayrılmıştır. Lif kabakları %2 (w/w) sodyum hidroksit (NaOH) içerisinde 90 dakika bekletildikten sonra nötral pH değerine ulaşabilmek için distile su ile tekrarlı yıkama yapılmıştır (65). Şekil 15-a' da NaOH ile işlem görmeden önce ve Şekil 15-b' de ise NaOH ile işlem gördükten sonra lif kabaklarının renginin değişimi görülmektedir. Bu işlemin ardından merdane yardımı ile açılarak düzleştirilen lif kabakları bir makas yardımıyla istenilen büyüklükte parçalara ayrılarak 60°C etüvde 24 saat kurutulmuşlardır. Şekil 15-c' de görülmekte olan lif kabağı parçasının boyutları yaklaşık 20 mm çapındadır.



Şekil 15: Lif kabaklarının a) NaOH işleminden önceki b) NaOH işleminden sonraki görüntüleri ve c) doku iskelesinin hazırlanması için kesilip kurutulmuş lif kabakları

PHBV Çözeltilisinin Hazırlanması:

%3 (w/v) konsantrasyonda PHBV (Sigma Aldrich, 80181-31-3 katalog no) çözeltisi iletkenliğin artması için kullanılan %0.2 (w/v) konsantrasyonda benzyltriethylammonium chloride (BTEAC)(Sigma Aldrich, 56-37-1 katalog no) eklenerek, kloroform içerisinde çözdürüldükten sonra su banyolu manyetik karıştırıcıda çözeltinin 50°C'de iki saat ve sonrasında gece boyu oda sıcaklığında karıştırılması ile elde edilmiştir.

PHBV İle Islak Elektro-Eğirilmiş Fiberlerin Hazırlanması:

Bu amaçla Şekil 16'da görüldüğü üzere, kendi kurmuş olduğumuz sistemde ıslak elektro eğirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Şekil 16-a' da kullanılmakta olan şırınga pompası, Şekil 16-b' de koagülasyon banyosu, Şekil 16-c' de küt uçlu iğne ve Şekil 16-d' de ise kullanılmakta olan voltaj kaynağı ile hazırlanmış olan ıslak elektro eğirme düzeneği görülmektedir. İşlemin gerçekleştirileceği günlerde üretimin etkilenmemesi için ortam sıcaklığı 21°C olarak sabit

tutulmuştur. Düzenekte, ıslak elektro eğirilmiş fiberlerin toplanacağı koagülasyon banyosu hacimce 9:1 oranında etanol-saf su karışımı konularak hazırlanmıştır. Hazırlanmış olduğumuz PHBV çözeltisini 10 ml'lik steril küt uçlu iğnesi olan steril şırıngaya çektikten sonra (Braun, 9180109 katalog no) düzeneğe yerleştirilmiştir. Eğirme işlemindeki standart işlem parametreleri, güç kaynağı (Gamma High Voltage ES30) 20 kV çalışma voltajına, şırınga pompası (NE-1000, New ERA Pump System, Inc, USA) 2.0 ml/h akış hızına ve 10 cm çalışma mesafesine(iğne ucu ile koagülasyon banyosu arasındaki mesafe) ayarlanmıştır. Islak elektroegirme işlemi 20 dk süresince gerçekleştirilmiş, toplanan PHBV fiberleri koagülasyon banyosundan alınarak saf su içeren kaplara aktarılmıştır. Alkol kalıntısından kurtulana ve fiberlerin su içinde açılması sağlanana kadar gün aşırı suları temiz saf su ile değiştirilerek beklenmiştir.



Şekil 16: Kendi tasarlanmış olduğumuz ıslak elektro eğirme düzeneği a) şırınga pompası b) koagülasyon banyosu c) küt uçlu şırınga ucu d) voltaj kaynağı

Asetik Asit Çözeltisinin Hazırlanması:

Bu çözeltinin hazırlanabilmesi için, 2 ml saf asetik asit(CH_3COOH)(MERCK, 100063 katalog no) 100 ml saf su içerisinde çözölmüştür. Manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra homojen kıvama gelen çözelti kullanıma hazırdır. Bu çözelti, kitosan çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Phosphate Buffered Saline(PBS) Çözeltisinin Hazırlanması:

Bu çözeltinin hazırlanabilmesi için, bir adet PBS tablet(Sigma Aldrich, P4417) 200 ml saf su içerisinde çözdürölmüştür. Manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra homojen kıvama gelen çözelti kullanıma hazırdır. Bu çözelti genipin çözeltisinin hazırlanması ve şişme oranı testlerinin gerçekleştirilmesinde kullanılmıştır.

Kitosan Çözeltisinin Hazırlanması:

Yüksek moleköl ağırlığına sahip %1 (w/v) oranında kitosan(Sigma Aldrich, 9012-76-4) çözeltisi için %2 (v/v)'lik asetik asit çözücü olarak kullanılmıştır. Homojen kitosan çözeltisi manyetik karıştırıcıda çözeltinin 50°C de üç saat ve sonrasında gece boyu oda sıcaklığında karıştırılmasının ardından sağlanmıştır.

Genipin Çözeltisinin Hazırlanması:

Çalışmada üç farklı oranda genipin(FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corp., 078-03021 katalog no) çözeltisi hazırlanmıştır. Amaçlanan ağırlık/hacim oranlarında genipin hazırlanması için, öncelikle bahsedilmekte olan PBS çözeltisi hazırlanmıştır. %0.1 (w/v) genipin için 10 ml PBS çözeltisi içerisine 0.01 gram, %0.3 (w/v) genipin için 10 ml PBS çözeltisi içerisine 0.03 gram ve %0.5 (w/v) genipin için 10 ml PBS çözeltisi içerisine 0.05 gram genipin tartılarak manyetik karıştırıcıda homojen kıvama gelinceye kadar karıştırılmıştır.

Genipin İle Çapraz Bağlanma:

Genipin ile çapraz bağlanmanın etkilerinin ölçülebilmesi için üç farklı genipin konsantrasyonu denenmiştir. Bu amaçla; bahsedilmiş olan %0.1, %0.3 ve %0.5 ağırlık/hacim oranlarında hazırlanan genipinden 4 ml doku iskelesi örneklerine eklenmiştir. 48 saat bekleme sonucunda kovalent çapraz bağlanma sağlanmıştır. Ardından, doku iskeleleri deiyonize su ile yıkanarak fazla genipinden arındırılmıştır.

Menisküs Doku İskelelerinin Dereceli Yıkaması:

Dereceli yıkama işlemi %100, %80, %60, %40, %20, %0, %0 ethanol kullanılarak kitosan çözeltisinde bulunan asetik asitten kurtulmak için gerçekleştirilmektedir. Her basamakta 30 dk beklenilerek işlem tamamlanmıştır.

Kontrol Grubu Olarak Sadece Kitosan Çözeltisi İçeren 1. Doku İskelesinin Üretimi:

%1'lik kitosan çözeltisi 4 ml pipet yardımıyla çekilerek 25 ml'lik 32 mm çapındaki şişelere boşaltılmıştır. -20°C dondurucuda iki saat ağızları kapalı biçimde tutularak çözeltinin katılaşması sağlanmıştır. Bu işlemin ardından, iki gün boyunca liyofilizatörde (FreeZone, Freeze Dry Systems) 0.1 mbar basınç altında -60°C'de tutularak süngerlerin oluşması sağlanmıştır. Bahsedilen dereceli yıkama işlemleri gerçekleştirildikten sonra genipin çözeltisi emdirilen doku iskeleleri çapraz bağlanma reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlanma işlemlerinin ardından son işlem olarak doku iskeleleri 0.1 mbar basınç altında, -60°C'de 24 saat boyunca kurutma işlemine tabi tutulmuşlardır.

Kitosan / Lif Kabağından Oluşan Doku İskelesinin Üretimi(1. Deney Grubu):

%1'lik kitosan çözeltisi 4 ml pipet yardımıyla çekilerek 25 ml'lik 32 mm çapındaki şişelere boşaltılmıştır. Yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan lif kabakları bu çözeltinin içerisine batırılarak, çözeltiyi emmesi sağlanmış ve tamamen donuncaya kadar -20°C'de tutulmuş ve

ardından liyofilizatöre alınarak iki gün boyunca 0.1 mbar basınç altında - 60°C’de kurutma işlemine tabi tutularak süngerlerin oluşması sağlanmıştır. Bahsedilen dereceli yıkama işlemleri gerçekleştirildikten sonra genipin çözeltisi emdirilen doku iskeleleri çapraz bağlanma reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlanma işlemlerinin ardından son işlem olarak doku iskeleleri 0.1 mbar basınç altında, -60°C’de 24 saat boyunca kurutma işlemine tabi tutulmuşlardır.

Kitosan/ Lif Kabağı/ PHBV Fiberden Oluşan Doku İskelesinin Üretimi(2. Deney Grubu):

Islak elektro eğirme ile üretilmiş PHBV fiberler 25 ml’lik içlerinde hazırlanmış lif kabağı bulunan şişelere aktarılmıştır. PHBV fiberlerin lif kabağı ile entegrasyonunun sağlanması amacıyla karışım bir gece boyunca bekletilmiştir. Ardından -20°C’de dondurularak liyofilizatör içerisine yerleştirilmiştir. Liyofilizatörde iki gün 0.1 mbar basınç altında ve 60°C’de tutularak süngerlerin oluşması sağlanmıştır. Hazırlanmış olan kitosan çözeltisinden 5 ml bu süngerlere emdirilerek liyofilizasyon işlemi tekrarlanmıştır. Bahsedilen dereceli yıkama işlemleri gerçekleştirildikten sonra genipin çözeltisi emdirilen doku iskeleleri çapraz bağlanma reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlanma işlemlerinin ardından son işlem olarak doku iskeleleri 0.1 mbar basınç altında, -60°C’de 24 saat boyunca kurutma işlemine tabi tutulmuşlardır.

3.4.2. Menisküs Doku İskelelerinin Karakterizasyonları

Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Çalışmamızda, üretilmiş olduğumuz menisküs doku iskelelerinin kimyasal yapı analizleri için FTIR cihazı(FTIR / Perkin Elmer Spectrum BX) kullanılmış olup dalga boyu 4000–650 cm^{-1} aralığında çalışılmıştır. Buna ek olarak, çözünürlük 4 cm^{-1} alınarak örnek başına 20 tarama yapılmış ve veriler kayıtlanmıştır. Elde edilen sonuçlara ait grafikler 4. Bölümde sunulmuştur.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Çalışmamızda, üretilmiş olduğumuz menisküs doku iskelelerinin morfolojik özelliklerinin karakterizasyonu için SEM cihazı (SEM/ JEOL JSM-6060) kullanılmıştır. Doku iskelelerinin üzeri *sputter coater* cihazı (Quorum Technologies, SC7620) ile Altın/Paladyum ile kaplanarak elektron mikroskobu ile yapısal özellikleri farklı büyütme ile incelenmiştir. Doku iskelelerinin içerdiği gözeneklerin ve fiberlerin yaklaşık çapları *Image J* programı ile belirlenmiştir. Bu amaçla 25 farklı noktadan ölçüm alınmış ve ortalamaları sunulmuştur.

Dinamik Mekanik Analiz (DMA)

Üretilmiş olan menisküs doku iskeleleri hidrojel karakterde olduğu için viskoelastik özelliklerinin belirlenebilmesi için DMA analizleri gerçekleştirilmiştir. Örnekler, yaklaşık 1 cm çapta daireler olarak kesilerek ölçüm alınmıştır (TAQ800 cihazı). Veriler 37°C’de sabit sıcaklıkta, ısısı sabitlenerek, frekans taraması modunda 0.1 Hz ve 40 Hz aralığında toplanmıştır.

Termal Gravimetrik Analiz (TGA)- Diferansiyel Termal Analiz (DTA)

Biyomineralizasyon işlemi öncesi ve sonrasında iskelelerin termal karakterizasyonu, termogravimetrik ve diferansiyel termal analiz (DTA/TGA) kullanılarak yapılmıştır (Shimadzu DTG-60H). Örnekler, 10°C/dk ısıtma hızında azot gazı altında 25 ila 700°C sıcaklıkları arasında taranmıştır. TGA eğrilerinden bozunma başlangıç sıcaklıkları (T_d) ve kömürleşme oranları, DTA eğrilerinden erime sıcaklıkları belirlenmiştir.

Şişme Testleri

Çalışmamızda gerçekleştirmiş olduğumuz şişme oranı testleri, hazırlanışı daha önceden anlatılmış olan PBS ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanmış olan menisküs doku iskelelerinin kuru ağırlıkları (w_0) tartılarak örnekler 37° C’de 24 saat boyunca PBS içerisinde bekletilmiştir. Doku iskeleleri sıvı içerisinden çıkartılıp üzerindeki fazla sıvı filtre kağıdı ile alındıktan sonra ağırlıklarının (w_s) belirlenmesi için tartılmıştır. Şişme oranı için aşağıda verilmekte olan formül kullanılmıştır.

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

Mekanik Analiz (Basma deneyi)

Menisküs doku iskelelerinin mekanik karakterizasyonu için örnekler bası yüklenmeleri altında dayanımlarının ölçülebilmesi için basma testi uygulanmıştır. Bu amaçla testler, aksiyel yük altında elektromekanik aküatör (5 kN AG-X; Shimadzu, Kyoto, Japan) ile gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 10 mm çapta dairesel görünüme sahip olan menisküs doku iskelelerinin kalınlıkları mekanik testler öncesinde kumpas yardımı ile ölçülmüştür. Test cihazı bu örneklerin boyutlarını ölçmeye uygun olmadığı için özel tasarım bir pot ve yaklaşık 10 mm çapında ucu düz bir indenter ile ölçümler yapılmıştır. Deney hızı 0.5 mm/dk olarak alınmıştır. Yer değiştirme maksimum örnek kalınlığına göre hesaplanarak hepsi için standart bir ölçüm alınmış ve herbiri için ayrı ayrı ölçümler yük almaya başladığı noktadan kalınlığın %80’ine kadar hesaplanmıştır. Makalelerde aksiyel yüklenmeler altında, insan menisküsünün basma yüklenmesinin yaklaşık %80’ine kadar dayandığı bilinmektedir (102).

Biyouyumluluk Analizleri ve Histolojik Boyamalar

Çalışmamızda, menisküs doku iskelelerinin içerisindeki tüm malzemeler için ayrı ayrı ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Her gruptan alınmış olan şişme oranı ve mekanik ölçüm sonuçlarına göre optimum genipin konsantrasyonuna sahip örnekler seçilmiştir. *In vitro* çalışmalar geliştirilerek örneklerin üzerine SW1353 (Chondrosarcoma) hücre hattı ile ekim yapılarak 37 °C sıcaklıkta %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda çoğalmaları sağlanacaktır. Ardından kültür süreci boyunca 0, 3, 7 ve 11. günlerde 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-diphenyltetrazolium bromür (MTT) formazan ile hücrelerin canlılıkları ve laktat dehidrogenaz (LDH) kiti ile toksisiteyi spektrofotometrik olarak ölçülecektir. Bu sayede malzemelerin birlikte kullanıldıkları biyouyumluluk ve sitosite analizleri iletilecektir.

In vitro testler geliştirilirken, %10'luk formaldehit ile fikse edilmiş olan menisküs doku iskeleleri, % 10'luk formik asitte üç hafta süreyle bekletilecek ve bir gece boyunca akarsu altında yıkanan örnekler, konsantrasyonu %70'ten %95'e kadar artan etil alkol ile dereceli yıkama yapılacaktır. Ardından 20'şer dakika aseton çözeltisinden geçirildikten sonra 30'ar dakika ksilolde tutulacak örnekler bir saat boyunca 60°C'lik etüvde parafin içerisine gömülmüş olan örneklerden mikrotom yardımıyla 5 µm'lik kesitler alınarak ışık mikroskobu ile görüntüleneceklerdir. Bu örnekler genel morfolojik görüntülemelerin alınabilmesi için Hematoxylin&Eosin boyaması, kollajen yapıları için Safranin O boyaması ve GAG yapıları için Alcian blue boyaması yapılarak istenilen gözlemler gerçekleştirilecektir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Doku iskelelerinin oluşturulmasında kullanılan malzeme türleri(lif kabağı, PHBV, kitosan, genipin, çözücü, vb.), kullanılan malzemelerin oranları, üretim ve karakterizasyon yapılan yerlerdeki ortam koşulları(sıcaklık, nem, vakum koşulları, CO₂ miktarı, vb.) bu araştırmanın gerçekleştirilmesindeki bağımlı değişkenlerdendir.

Biyouyumluluk analizleri için kullanılacak olan kitlerin markaları, immünohistokimyasal analizlerde kullanılacak olan boyalar, doku iskelelerinin karakterizasyonu için kullanılan yöntemler; FTIR (fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi), SEM (taramalı elektron mikroskobu), DMA (Dinamik Mekanik Analiz), Termal Gravimetrik Analiz (TGA), şişme testleri ve basma deneyi bağımsız değişkenlerdendir. Çünkü, bu değişkenler malzemenin yapısına etki etmez ve tüm örneklerde aynı şekilde uygulandığı için kendi aralarında bir tutarlılık söz konusudur.

3.6. Veri Toplama Araçları

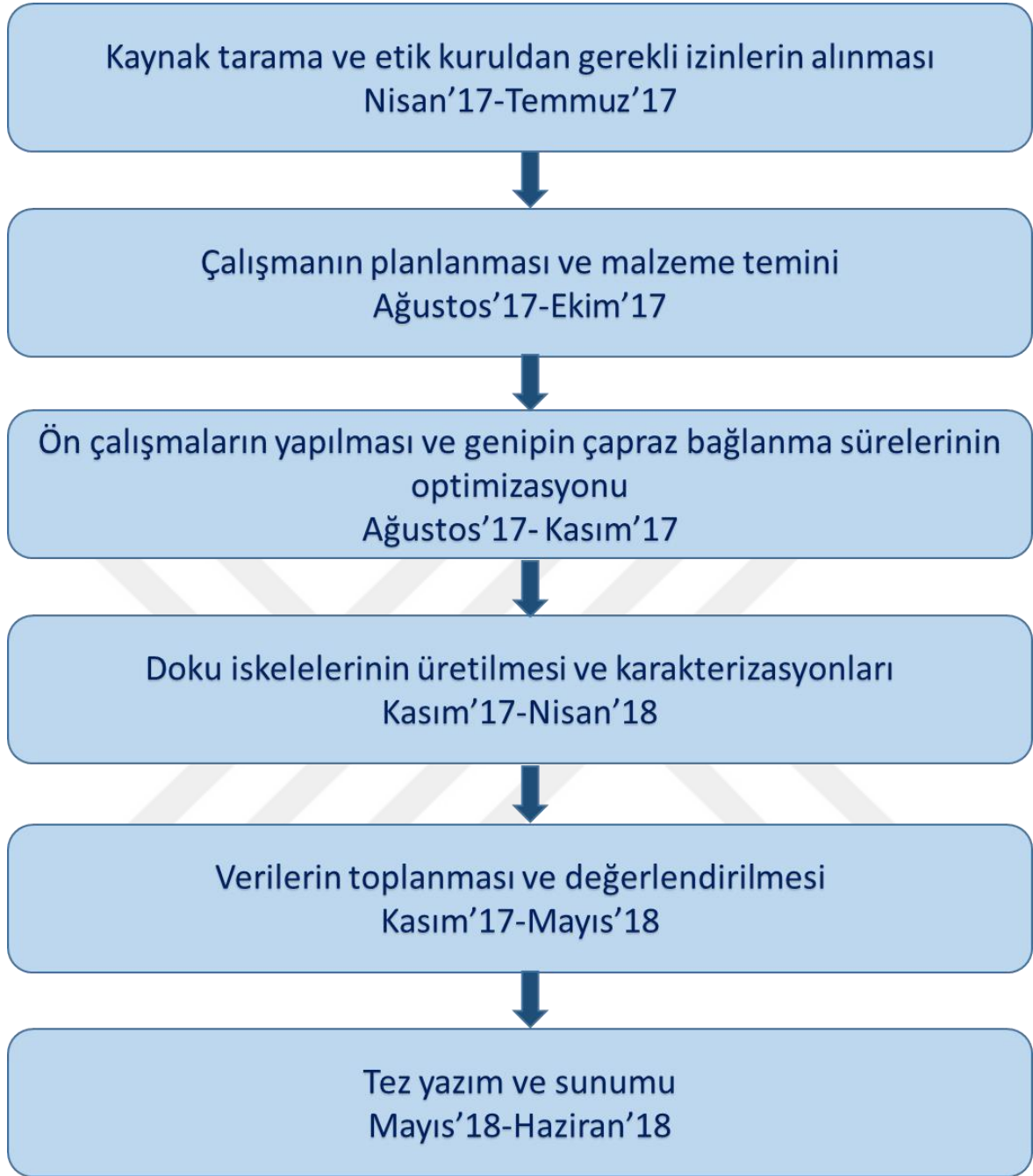
Tezde kullanılmış olan cihazların listesi Tablo 7’de gösterilmektedir.

Tablo 7: Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Altyapı/Ekipman Modeli	Bulunduğu Kurum	Kullanım Amacı
Inkübatör/Heraus,Heracell 150	Dokuz Eylül Üniversitesi, Biyomekanik AD.	Hücrelerin standart 37 °C ve %5 CO ₂ ortamda tutulması.
Santrifüj/Hettich, Universal 32	Dokuz Eylül Üniversitesi, Biyomekanik AD.	Hücre süspansiyonlarının ayrıştırılmasında.
Laminal flow/Nüve, MN 120	Dokuz Eylül Üniversitesi, Biyomekanik AD.	Hücre kültürü deneylerinin steril ortamda yapıldığı.
Su banyosu/Memmert, WB 7	Dokuz Eylül Üniversitesi, Biyomekanik AD.	Hücre kültürü için kimyasalların çözündürüldüğü.
Inverted mikroskop /Olympus CKX41SF, Japonya	Dokuz Eylül Üniversitesi, Biyomekanik AD.	Hücre kültüründe hücre yapılarının incelendiği.
+4°C Buzdolabı/Beko	Dokuz Eylül Üniversitesi, Biyomekanik AD.	Kimyasallar ve hücre kültürü medyumlarının saklanması.
Işık mikroskobu / Olympus BH50	Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD.	Doku takibinde kullanılmıştır.
Digital kamera / Olympus DP71	Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD.	Histolojik görüntülemelerde görüntü kaydedilmesi amacıyla kullanılmıştır.
Etüv / Dedeoğlu	Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD.	Doku iskelesi üretim ve karakterizasyonunda suyun uzaklaştırılması amacıyla.

Mikrotom / RM 2255, Leica	Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD.	Histolojik kesitleri alınması için kullanılmıştır.
FTIR / Perkin Elmer Spectrum BX	DEU Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü	Doku iskelelerinin kimyasal karakterizasyonu için kullanılmıştır.
SEM-EDS / JSM-6060 JEOL	DEU Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü	Doku iskelelerinin yüzey morfolojilerini görüntülemek için kullanılmıştır.
TGA-DTA	İYTE Makine Mühendisliği Bölümü	Doku iskelelerinin termal analizleri için kullanılmıştır.
DMA	DEU Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü	Doku iskelelerinin dinamik mekanik analizleri için kullanılmıştır.
Elektro-eğirme düzeneği	DEU Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü	Doku iskelesi üretiminde kullanılmıştır.
Liyofilizatör	DEU Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü	Doku iskelesi üretiminde kullanılmıştır.
Basma-çekme cihazı / Shimadzu	Dokuz Eylül Üniversitesi Biyomekanik AD.	Doku iskelelerinin basma yükü altında mekanik özellikleri incelenmiştir.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışma sonuçlarını değerlendirmek için henüz herhangi bir istatistik uygulanmamıştır. İstatistiksel analizlerin yapılabilmesi için tüm karakterizasyonlar tamamlanmadığından dolayı verilerin yetersiz olacağı düşünülmüş ve deneylerin tamamlanması uygun görülmüştür. Tüm veriler elde edildikten sonra, ölçülen sayımla elde edilen ve hesaplanan yüzde değerlerin grafiksel olarak normal dağılıma uygunluğu ve Shapiro-Wilk testi ile incelenecektir. Tanımlayıcı istatistikler ortalama±standart sapma ile verilecektir.

Sonuçlar; non parametric Kruskal Wallis h testi ile incelenecektir. Bu amaçla, kontrol grubu (sadece kitosan), deney grubu 1 (kitosan/lif kabağı) ve deney grubu 2 (kitosan/lif kabağı/PHBV) olan doku iskelelerinden elde edilmiş olan sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılabilecektir. Fark bulunduğunda ise, farkın kaynağını belirlemek ve post-hoc ikili karşılaştırmalar için Bonferroni yöntemine başvurulacaktır. İstatistiksel kararlarda; değerler $p \leq 0.05$ olduğunda istatistiksel farklılığın göstergesi olarak kabul edilecektir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Doku iskelelerinin hazırlanmasında, kitosan emdirilmiş süngerlere genipin ilavesi ile hidrojel oluşturulamaması bir risk faktörü olarak görülmektedir. Böyle bir durumla karşılaşmış olsaydı çapraz bağlanmasını sağlamak amacıyla, iskeleye fotosensitizör olarak sitotoksik olmayan ağırlıkça %0.5 riboflovin emdirilecek ve iskele 30 dakika süresince Ultra viyole A ışını (UVA) ışığı altında bekletilecekti. Ancak, böyle bir gereksinim duyulmamış ve sınırlılık ortadan kalkmıştır.

Kitosan/lif kabağı/PHBV doku iskelelerinin hazırlanması aşamasında PHBV'nin hidrofobik, lif kabağının ise hidrofilik bir malzeme olmasından dolayı süngerlerde liyofilizatör ile kurutma sonrasında bir miktar kuma olmuştur. Bu durumda süngerlerin kurutulması için tekrardan liyofilizatöre veya vakum etüvüne alınarak lif kabağının emdiği suyun atılması sağlanmıştır. Bu sayede sınırlılık ortadan kaldırılmıştır.

Doku iskelelerinin karakterizasyonu aşamalarında ise malzemenin termal, morfolojik ve kimyasal yapısının araştırılması yönlerinden herhangi bir sınırlılıkla karşılaşılmamıştır. Ancak, basma deneyi için kullanılmakta olan cihazın tasarımının daha büyük boyutlardaki örneklerle uygun olmasından ötürü çalışmada yeni bir düzeneğe gereksinim duyulmuştur. Bu sebeple, cihazın üzerine özel yapım bir aparat eklenilerek testler gerçekleştirilmiş ve sınırlılığın ortadan kaldırılması sağlanmıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

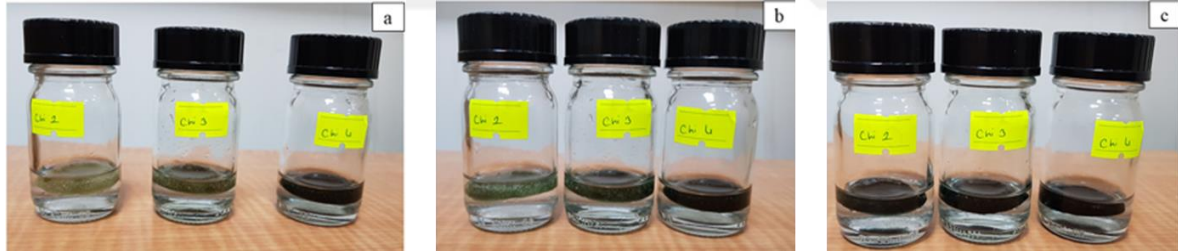
3322-GOA protokol numaralı çalışma 23 Haziran 2017 tarihinde 2017/17-40 karar numarasıyla Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'na kabul edilmiştir. Etik kurul onay belgesi Ek 2'de sunulmaktadır.

4. BULGULAR

Çalışmamızda Kontrol Grubu (kitosan), Deney Grubu 1 (kitosan/ lif kabağı) ve Deney Grubu 2 (kitosan/ lif kabağı/ PHBV) olarak üretilmiş doku iskelelerinin her alt grubu(%0, %0,1, %0,3 ve %0.5 genipin) için analizler tekrarlanmıştır. Bölüm 3.4'te bahsedilen karakterizasyonlardan elde edilen verilerin sonuçları bu bölümde verilmektedir. Sonuçlar kısmında kullanılan “Kitosan L” kısaltması deney grubu 1 olan kitosan/lif kabağı doku iskelelerini, “Kitosan F” kısaltması ise deney grubu 2 olan kitosan/lif kabağı/PHBV doku iskelelerini ifade etmektedir.

Genipin İle Çapraz Bağlanmanın Gerçekleştirilmesi:

Genipin ile çapraz bağlanmanın gerçekleştiğinin işareti şeffaf olan çözeltinin renginin koyu maviye dönmesidir. Üretmiş olduğumuz doku iskelelerine üç farklı genipin konsantrasyonu eklendikten sonra, Şekil 17'de farklı sürelerdeki renk değişimleri görülmektedir. Soldan sağa sırasıyla %0,1, %0,3 ve %0,5 genipin oranına sahip doku iskelelerinin çapraz bağlanmalarının 12, 24 ve 48 saat sonraki görüntüleri verilmektedir. Çapraz bağlanması tamamlanan doku iskeleleri fazla genipinden kurtulmak için saf su ile yıkandıktan sonra Şekil 18'deki süngerler elde edilmiştir. Bu resimde sadece kitosan içeren sünger gösterilmektedir.



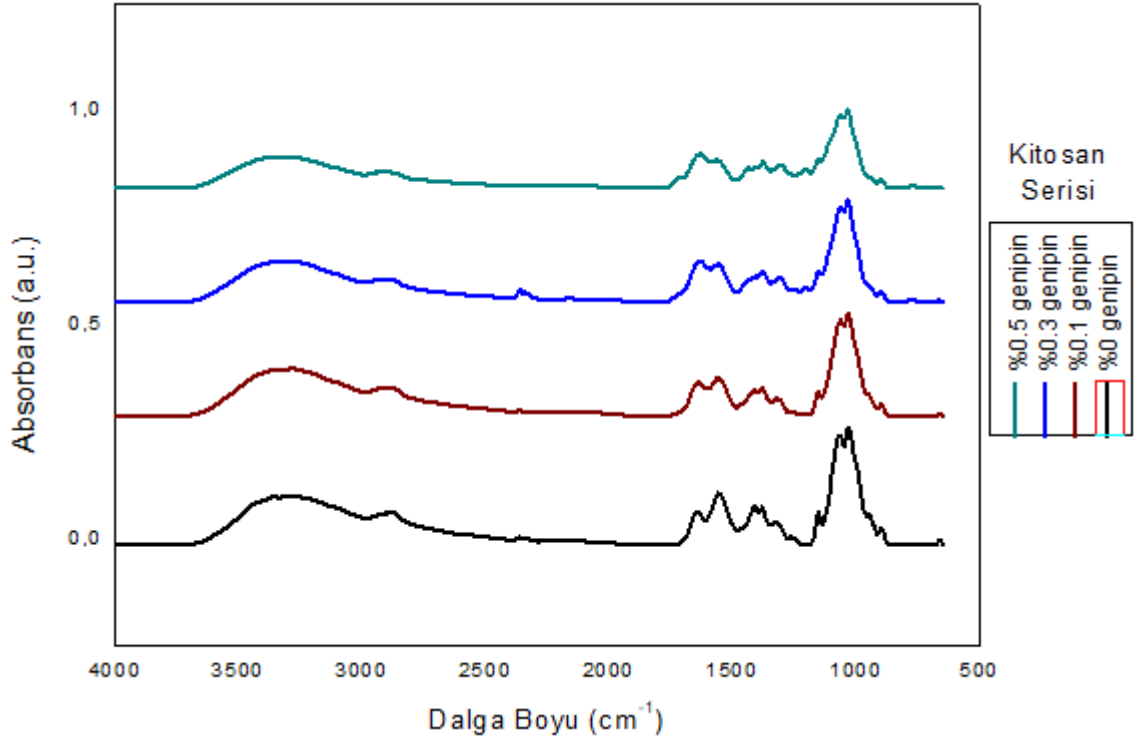
Şekil 17: Farklı süre ve farklı oranlarda genipin çapraz bağlanması sırasıyla %0,1-0,3-0,5 oranlarında genipin ilavesinden a)12 saat b) 24 saat c) 48 saat sonra



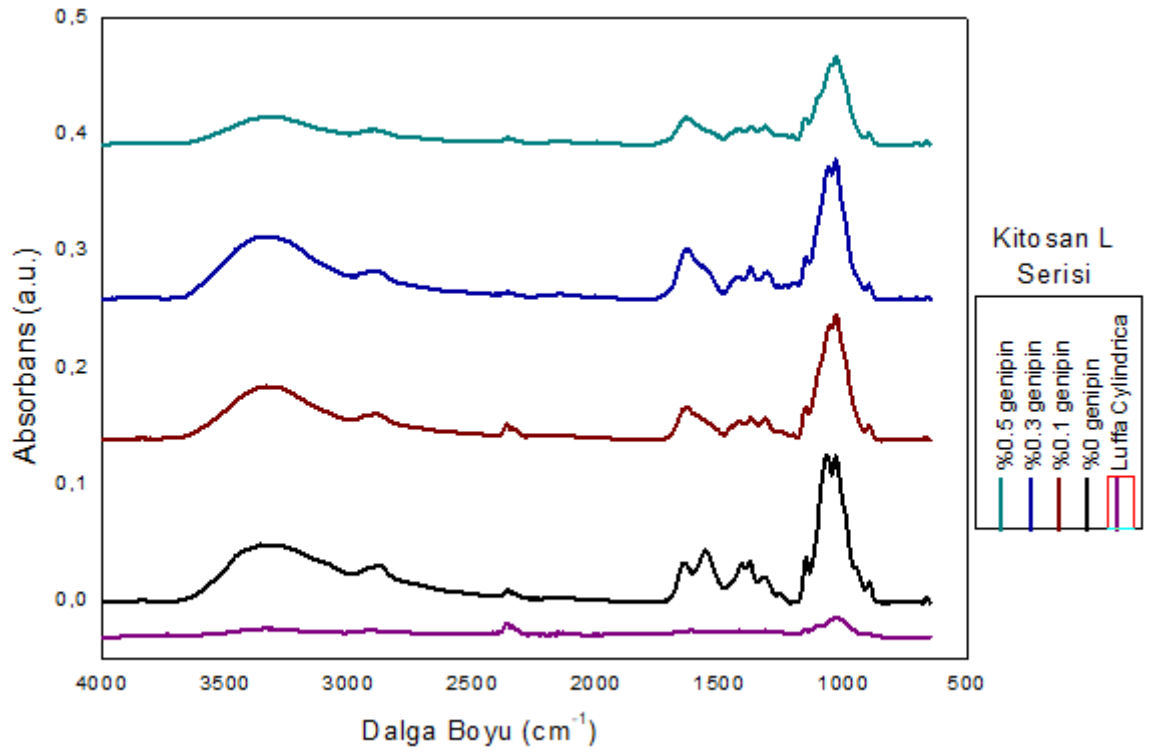
Şekil 18: Genipin ile çapraz bağlanmış kitosan sünger

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

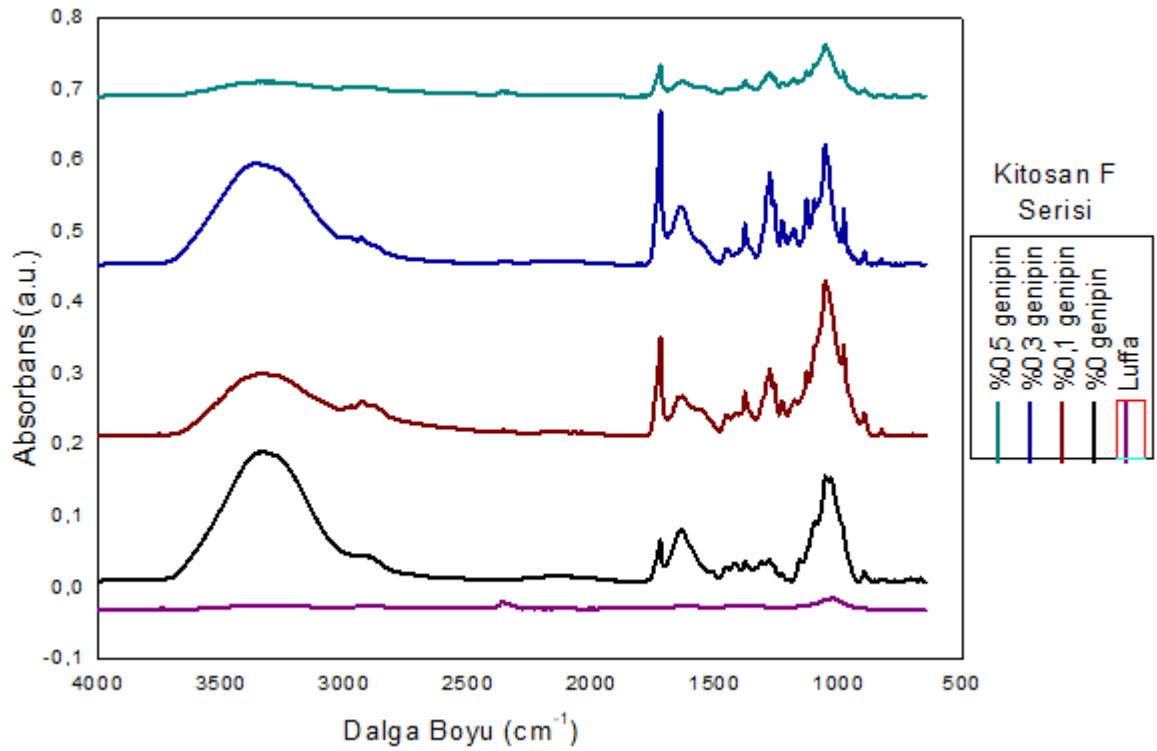
Farklı genipin konsantrasyonlarında üretilmiş olan(%0, %0,1, %0,3 ve %0,5) üç farklı doku iskelesi serilerinin FTIR analizleri sonuçları belirtilmektedir. Bu grafiklerde; Şekil 19’da kontrol grubu olan sadece kitosandan üretilmiş, Şekil 20’de lif kabağının NaOH ile yıkanması sonrasındaki hali ve Deney grubu 1 olan kitosan ve lif kabağından oluşan doku iskelelerinin ve Şekil 21’de ise lif kabağının NaOH ile yıkanması sonrasındaki hali ve Deney grubu 2 olan kitosan, lif kabağı ve PHBV’den oluşan doku iskelelerinin FTIR analizlerinin sonuçları gösterilmektedir.



Şekil 19: Kitosan serisine ait farklı genipin konsantrasyonlarında FTIR spektrumları



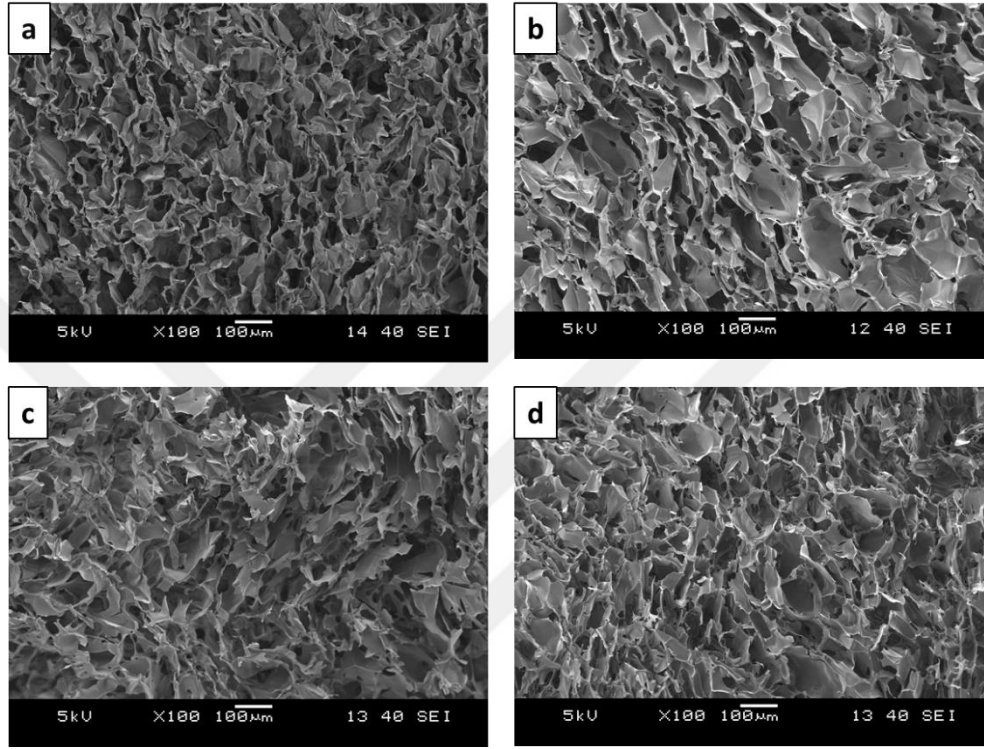
Şekil 20: Kitosan L serisine ait farklı genipin konsantrasyonlarında FTIR spektrumları



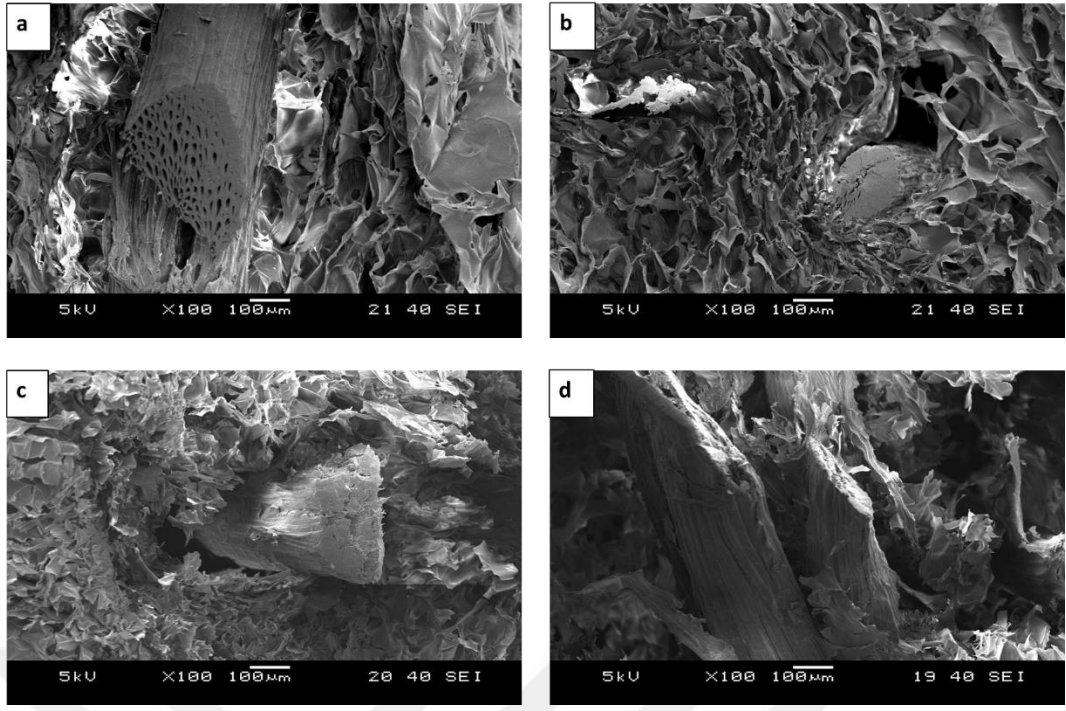
Şekil 21: Kitosan F serisine ait farklı genipin konsantrasyonlarında FTIR spektrumları

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

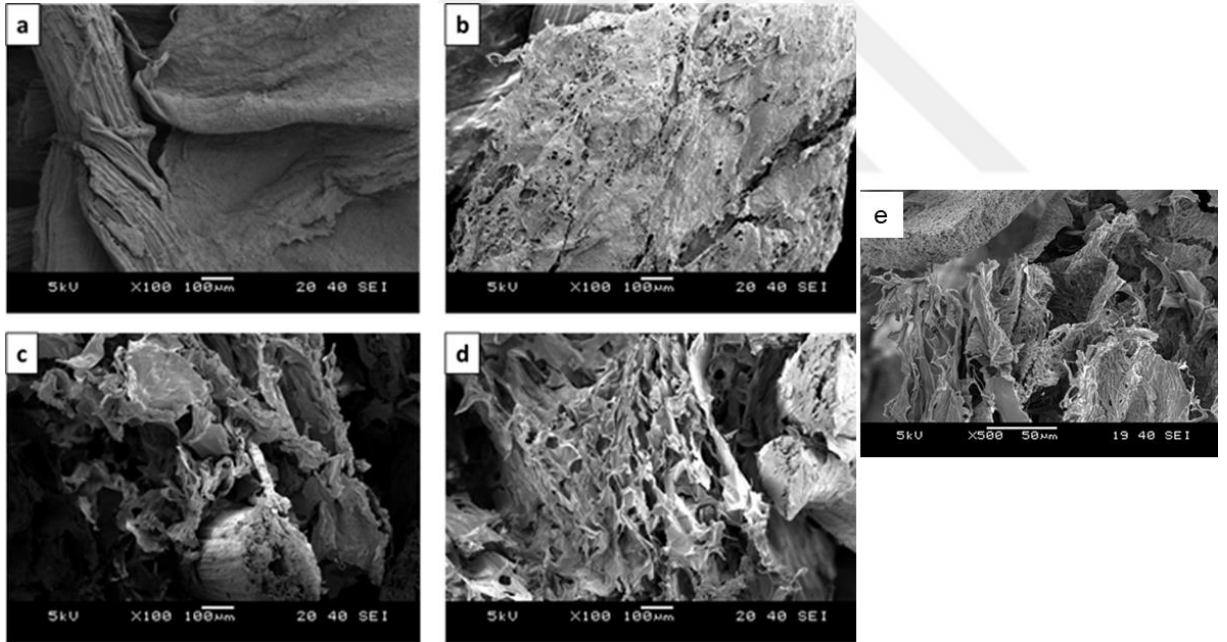
Kitosan, Kitosan L ve Kitosan F doku iskeleleri için 100x büyütme ile farklı genipin oranlarında üretilen örneklerden elektron mikroskobu görüntüleri alınmıştır. Bu analiz sonucunda üretilen doku iskelelerinin morfolojileri hakkında bilgi edinilmiştir. Şekil 22’de sadece Kitosan serisi, Şekil 23’te Kitosan L serisi ve Şekil 24’te Kitosan F serilerine ait SEM görüntüleri verilmektedir.



Şekil 22: Kitosan serisinin SEM ile 100x büyütme görüntüleri a) %0 b) %0,1 c) %0,3 d) %0,5 genipin ile çapraz bağlanmış menisküs doku iskeleleri



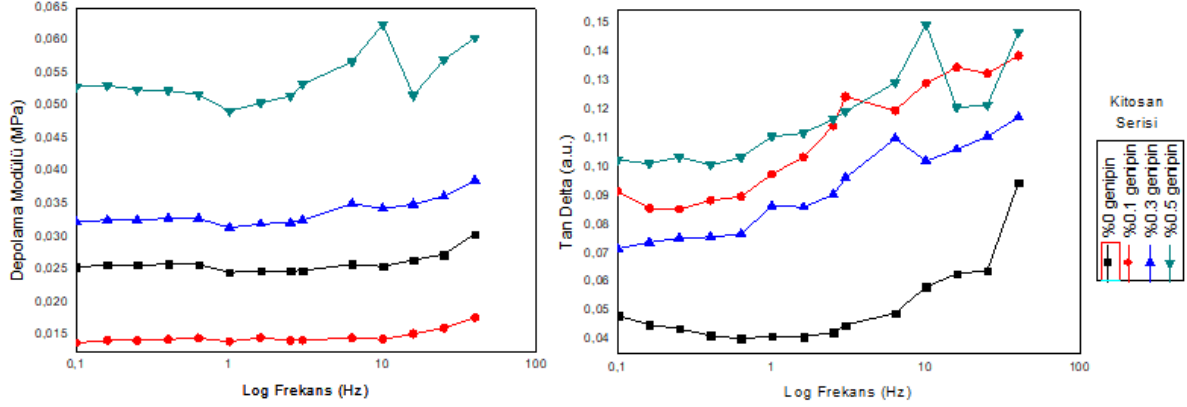
Şekil 23: Kitosan L serisinin SEM ile 100x büyütme görüntüleri a) %0 b) %0,1 c) %0,3 d) %0,5 genipin ile çapraz bağlanmış menisküs doku iskeleleri



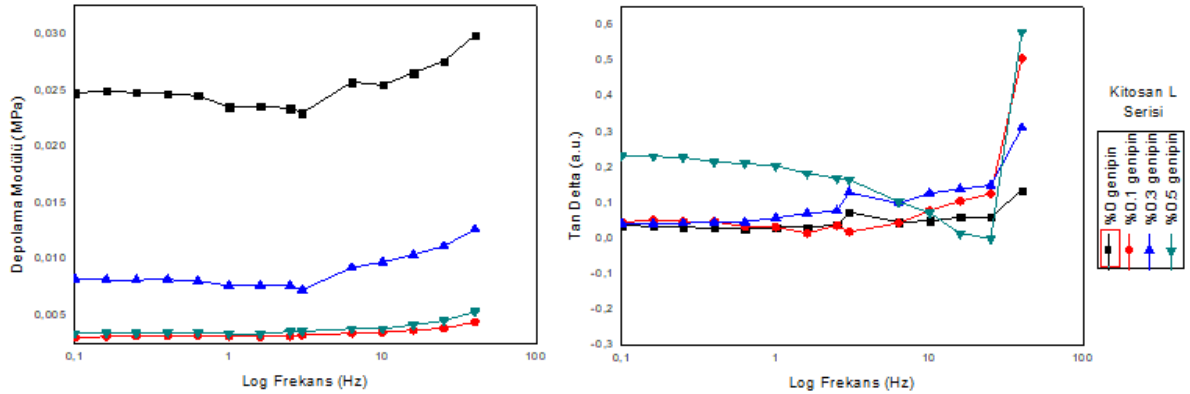
Şekil 24: Kitosan F serisinin SEM ile 100x büyütme görüntüleri a) %0 b) %0,1 c) %0,3 d) %0,5 genipin ile çapraz bağlanmış menisküs doku iskeleleri e) PHBV fiberlerin yapıya entegre olduğu 500x büyütme ile çekilmiş SEM görüntüsü

Dinamik Mekanik Analiz(DMA)

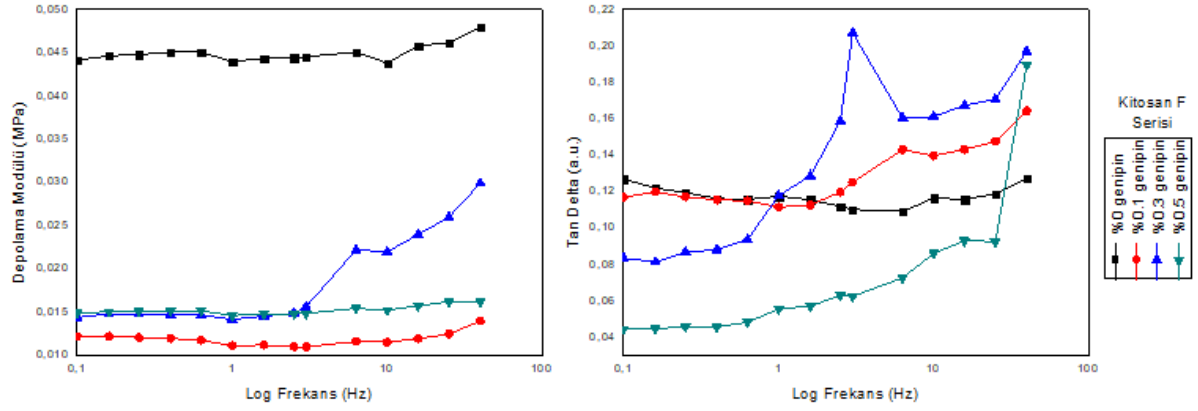
Gerçekleştirilmiş olan DMA analizlerinin verileri Kitosan, Kitosan L ve Kitosan f serileri için ayrı ayrı *Origin 8* programında çizdirilerek Şekil 25, 26 ve 27’deki grafikler elde edilmiştir. Ayrıca, Tablo 8’deki değerler DMA analizinin verilerinden toparlanmıştır.



Şekil 25: Farklı genipin oranlarında çapraz bağlanmış Kitosan serisine ait DMA analizi sonuçları; soldaki grafik depolama modülü- logaritmik frekans ve sağdaki grafik $\tan(\delta)$ - logaritmik frekans eğrileri



Şekil 26: Farklı genipin oranlarında çapraz bağlanmış Kitosan L serisine ait DMA analizi sonuçları; soldaki grafik depolama modülü- logaritmik frekans ve sağdaki grafik $\tan(\delta)$ - logaritmik frekans eğrileri



Şekil 27: Farklı genipin oranlarında çapraz bağlanmış Kitosan F serisine ait DMA analizi sonuçları; soldaki grafik depolama modülü- logaritmik frekans ve sağdaki grafik $\tan(\delta)$ - logaritmik frekans eğrileri

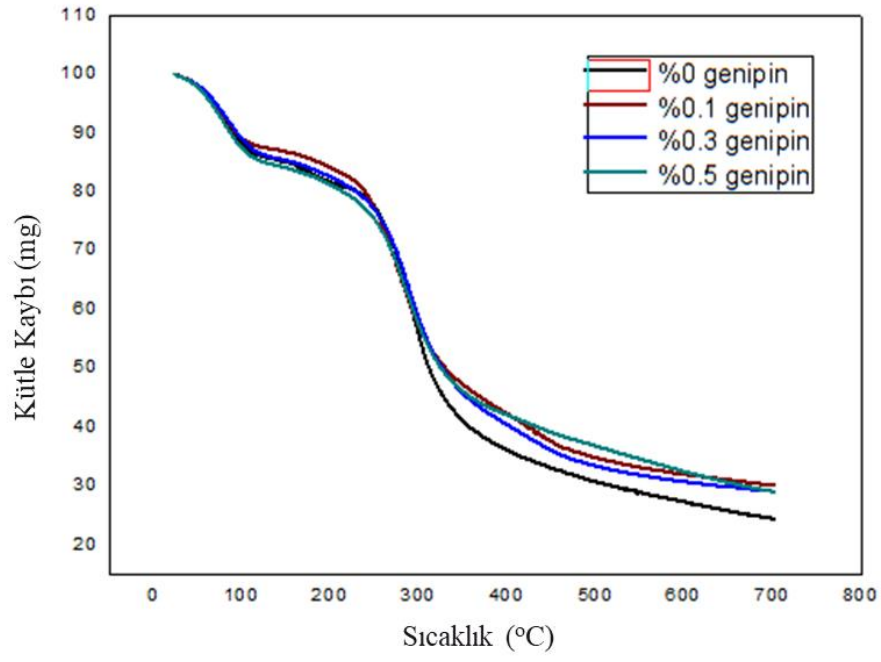
Tablo 8: DMA analizinde depolama modülü, kayıp modülü ve $\tan(\delta)$ değerleri

Örnek Adı	Frekans Değeri(Hz)	Depolama Modülü(MPa)	Kayıp Modülü(MPa)	Tan(Δ)
Kitosan %0 genipin	0.1	0,025	0,0012	0,048
	1	0,025	0,0010	0,041
	10	0,026	0,0015	0,059
Kitosan %0.1 genipin	0.1	0,014	0,0013	0,092
	1	0,014	0,0014	0,098
	10	0,014	0,0019	0,129
Kitosan %0.3 genipin	0.1	0,032	0,0023	0,072
	1	0,031	0,0027	0,087
	10	0,034	0,0035	0,102
Kitosan %0.5 genipin	0.1	0,053	0,0054	0,103
	1	0,049	0,0055	0,111
	10	0,063	0,0093	0,150
Kitosan L %0 genipin	0.1	0,025	0,0009	0,037
	1	0,024	0,0007	0,031
	10	0,026	0,0013	0,050
Kitosan L %0.1 genipin	0.1	0,003	-0,0001	-0,047
	1	0,003	-0,0001	-0,033
	10	0,004	0,0003	0,078

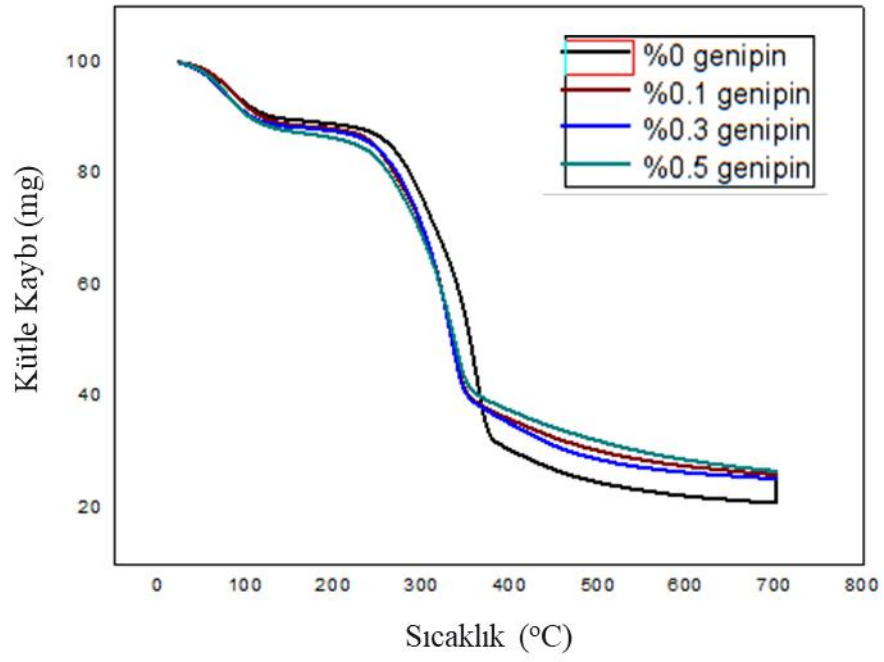
Kitosan L %0.3 genipin	0.1	0,008	0,0003	0,042
	1	0,008	0,0005	0,059
	10	0,010	0,0013	0,128
Kitosan L %0.5 genipin	0.1	0,003	-0,0008	-0,234
	1	0,003	-0,0007	-0,205
	10	0,004	-0,0003	-0,073
Kitosan F %0 genipin	0.1	0,044	0,0056	0,127
	1	0,044	0,0052	0,118
	10	0,044	0,0051	0,117
Kitosan F %0.1 genipin	0.1	0,012	0,0014	0,117
	1	0,011	0,0012	0,112
	10	0,012	0,0016	0,140
Kitosan F %0.3 genipin	0.1	0,014	0,0012	0,084
	1	0,014	0,0017	0,118
	10	0,022	0,0036	0,161
Kitosan F %0.5 genipin	0.1	0,015	0,0007	0,045
	1	0,015	0,0008	0,056
	10	0,015	0,0013	0,086

Termal Gravimetrik Analiz(TGA)- Diferansiyel Termal Analiz(DTA)

Kitosan ve Kitosan L serileri için gerçekleştirilmiş olan TGA-DTA analizlerinin verileri *Origin 8* programında çizdirilerek Şekil 28 ve 29'daki grafikler elde edilmiştir. Ayrıca, Tablo 9'daki değerler DMA analizinin verilerinden *Origin 8* ile çizdirildikten sonra oluşturulmuştur.



Şekil 28: Kitosan serisine ait TGA eğrileri



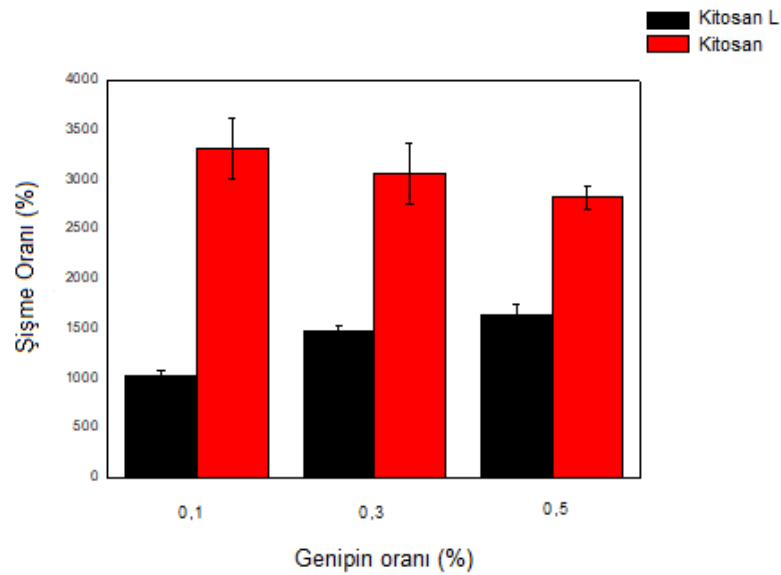
Şekil 29: Kitosan L serisine ait TGA eğrileri

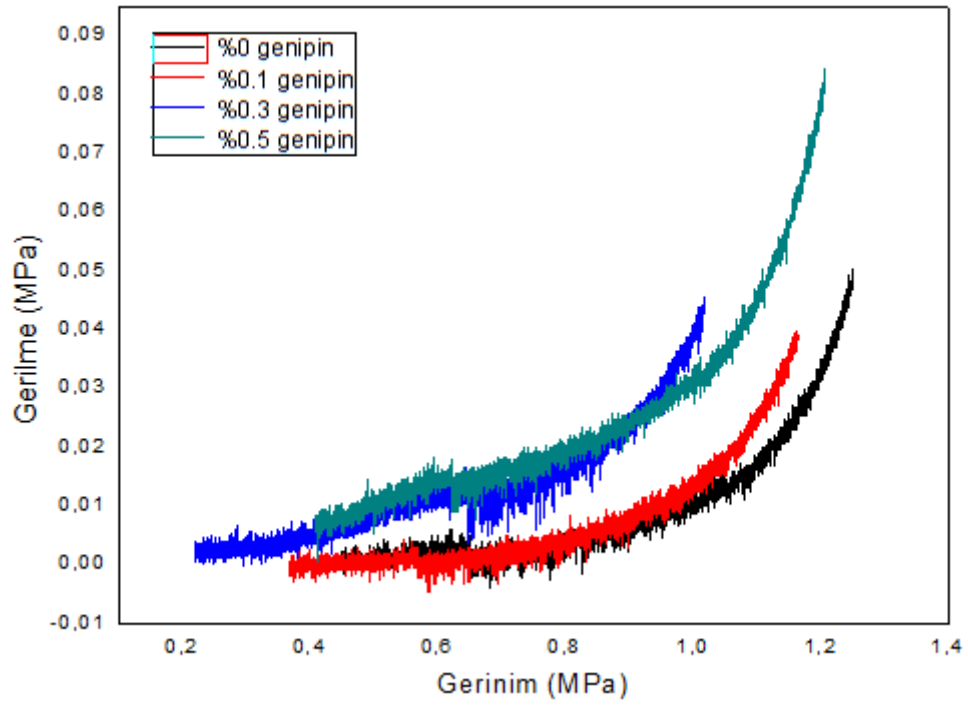
Tablo 9: Diferansiyel Termal Analiz(DTA) sonuçları

Örnek adı	Maksimum Bozunma Sıcaklığı, T _d (°C)	Bozunma Başlangıç Sıcaklığı, T _{onset} (°C)	Kömürleşme verimi (%)
Kitosan %0 genipin	299	260	24.6
Kitosan %0.1 genipin	286	250	29.2
Kitosan %0.3 genipin	295	250	29.4
Kitosan %0.5 genipin	284	250	29.2
Kitosan L %0 genipin	270	360	21.2
Kitosan L %0.1 genipin	260	334	26.2
Kitosan L %0.3 genipin	270	332	25.6
Kitosan L %0.5 genipin	275	335	26.9

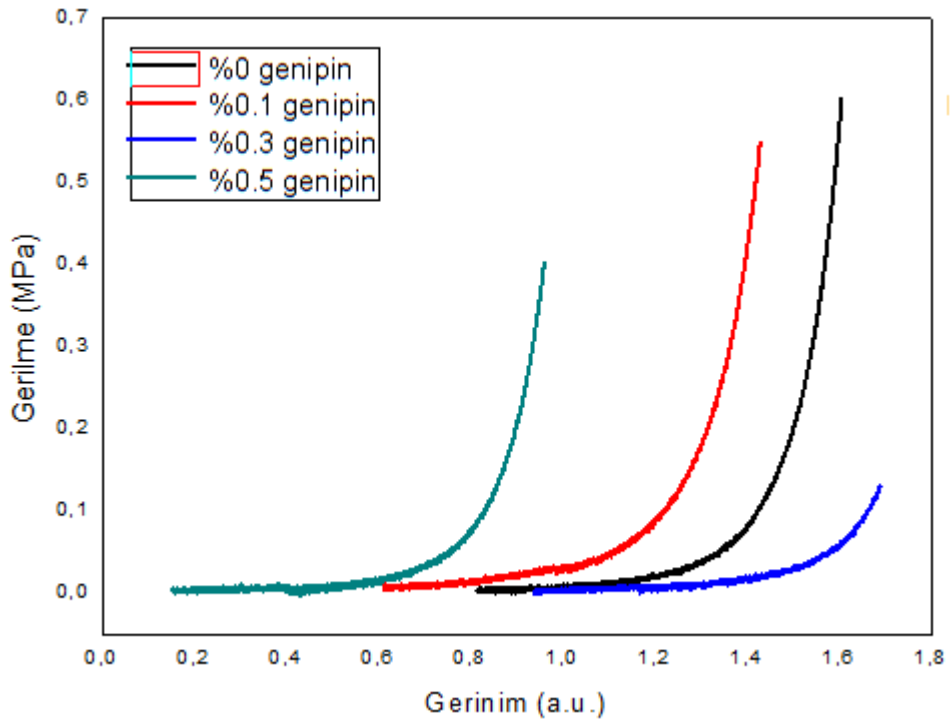
Şişme Testleri

Şekil 30’da farklı genipin konsantrasyonlarında çapraz bağlanan Kitosan ve Kitosan L doku iskelelerine ait şişme testi sonuçları verilmektedir. Bu analizin sonuçları *Origin 8* ile çizdirilmiştir.

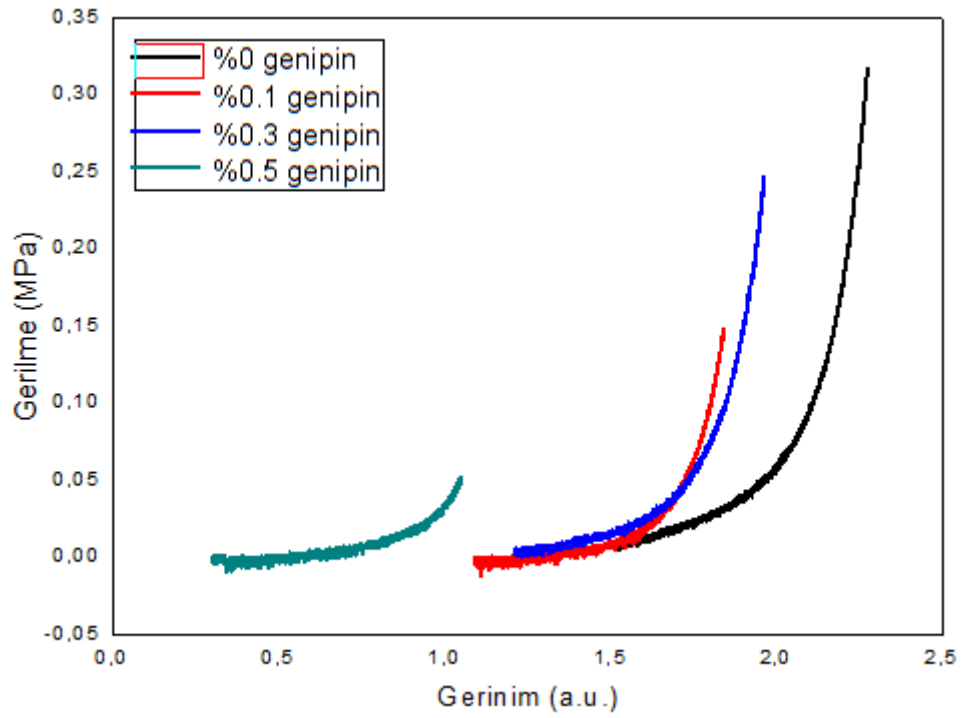
**Şekil 30:** Kitosan ve Kitosan L serisinin şişme testi sonuçları



Şekil 31: Kitosan serisine ait basma deneyi gerilim-gerinim eğrileri



Şekil 32: Kitosan L serisine ait basma deneyi gerilim-gerinim eğrileri



Şekil 33: Kitosan F serisine ait basma deneyi gerilim-gerinim eğrileri

Tablo 10: Kitosan, Kitosan L ve Kitosan F serilerine ait elastisite modülü değerleri

Kitosan Serisi	Elastisite Modülü (MPa)	Kitosan L Serisi	Elastisite Modülü (MPa)	Kitosan F Serisi	Elastisite Modülü (MPa)
Genipin Oranı (%)		Genipin Oranı (%)		Genipin Oranı (%)	
0% genipin	0.12	0% genipin	1.5	0% genipin	0.83
0.1% genipin	0.07	0.1% genipin	1.67	0.1% genipin	0.35
0.3% genipin	0.08	0.3% genipin	1	0.3% genipin	0.5
0.5% genipin	0.1	0.5% genipin	0.84	0.5% genipin	0.1

5. TARTIŞMA

Doku mühendisliği çalışmaları, doku onarımı ve yenilenmesine ışık tutmakta ve gelişmesi halen devam etmektedir. Hücre kültürü işlemleri ile birlikte kullanılan bu yöntemler, doku iskelesi geliştirilmesi ve kullanımı açısından tıpta önemli bir yere sahiptir. Menisküs doku iskeleleri geliştirmek amacıyla doğal malzemelerden yararlanılarak dayanıklı implantlar geliştirebilmek için çalışmalar devam etmektedir. Üretmiş olduğumuz menisküs doku iskeleleri yalnızca tıp alanında kullanılmakta olan menisküs implantlarının gelişimine katkıda bulunulmasıyla kalmayacak, aynı zamanda da araştırmacıların doğal kaynaklı malzemelerin kullanımına yönelik yeni bir bakış açısı kazanması sağlanacaktır.

Gerçekleştirilen çalışmada yararlanılmış olduğumuz malzemelerden kitosan, PHBV ve lif kabağı üzerine ayrı ayrı birçok çalışma literatürde yer almaktadır. Ancak, üretmiş olduğumuz doku iskelelerindeki gibi bir kompozit yapı bulunmamaktadır. Ayrıca, bu malzemeler ve kompozisyonları literatürde farklı dokular için kullanılmış olup menisküs doku implantı amacıyla denenmemiştir. Ek olarak, üretilen doku iskelelerinde daha mukavim ve kararlı bir yapı elde edebilmek için hem lif kabağının doğal diziliminden hem de çapraz bağlayıcı olan genipinden yararlanılmıştır.

Çalışmamızda üretilmiş olan doku iskelelerinde kitosan, kovalent çapraz bağlanarak hidrojel özelliği kazanmış ve bu sayede gerçek menisküs doku özelliklerine uygun doku iskeleleri elde edilmiştir. Yapılan karakterizasyonlar da bu özellikleri ispatlar niteliktedir.

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz liyofilizasyon yöntemiyle, açık gözenekli sünger yapıda üç farklı doku iskelesi elde edilmiştir. Üç doku iskelesi için de ortak olan %1'lik kitosan çözeltisi genipin oranlarının optimizasyonunun sağlanabilmesi için literatürlerde bulunan oranlardan seçilmiştir. Bunlara ek olarak, üçüncü doku iskelesi modelimizde elektro eğirme yönteminden yararlanılmıştır. Bu yöntem sayesinde Suslu ve ark. Makalesindeki nano boyutta fiberler elde edilmiştir (103). Nano boyutta fiberler hücrelerin tutunması ve yayılması açısından avantaj sağlamaktadır.

Çalışmamızın sonuçlarına baktığımız zaman sadece lif kabağı ve kitosan içeren doku iskelesinin lif kabağı, PHBV ve kitosan içerenden daha iyi sonuçlar verdiği görülmektedir. Yine de şu an için, iki doku iskelesi de saf kitosan ile hazırlanan doku iskelelerinden daha iyi sonuçlar vermiştir. Ancak çalışmadaki karakterizasyonların tüm gruplar için tamamlanamadığı ve bazı sonuçların tekrardan gözden geçirilmesi için istatistiksel analizler gerçekleştirilememiştir.

Biyouyumluluk testleri ve degradasyon analizleri gibi bazı ek karakterizasyonların da gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu deneylerin hepsi tamamlandıktan sonra istatistikler alınacak ve hangi grubun daha iyi olduğuna dair kesin yargılara varılacaktır.

Ayrıca, doku iskelelerinin oluşturulmasıyla ilgili olarak yapılan literatür taramalarından, genipinin amin gruplarına bağlanması sonucunda mavi renge büründüğü bilinmektedir (104) (105). Çalışmamızda üretilmiş olan doku iskeleleri de ikinci günün sonunda bu rengi almıştır. Bu da çapraz bağlanmanın başarı ile gerçekleştirildiğinin belirtecidir.

FTIR analizi yardımı ile ürettiğimiz olduğumuz menisküs doku iskelelerinin kimyasal yapıları hakkında bilgi edinmemiz sağlanmıştır. İlk ürettiğimiz olduğumuz doku iskelesi sadece kitosandan oluşan seridir. Bu seride hacimde ağırlıkça %0 genipin, %0,1 genipin, %0,3 genipin ve %0,5 genipinden oluşan alt gruplar bulunmaktadır. FTIR analizlerinin sonuçlarına bakıldığında zaman, Butler ve ark. çalışması ile örtüşmektedir (106). Çapraz bağlanmamış olan kontrol grubunda analizler yapıldığında, 3281 cm^{-1} 'de O-H ve N-H gerilme bantları bulunmaktadır. 2883 cm^{-1} 'de C-H gerilme bandı gözlenmektedir. 1645 cm^{-1} 'de amit I bandı yani C=O gerilme bandı gözlenmektedir. 1558 cm^{-1} 'de N-H eğme bandı ve 1066 cm^{-1} 'de C-O gerilme bandı görülmektedir. Bunlara ek olarak, 1151 cm^{-1} 'de kitosanın sakkarit içeriğinden ötürü karakteristik bir bant olan C-O-C gerilme bandı gözlenmektedir (106).

Genipin ile çapraz bağlanmanın gerçekleşmiş olduğu gruplarda ise, Pozzo ve ark. makalesindeki (107) bilgilerden yola çıkılarak sonuçlar incelenmiş ve 1645 cm^{-1} bandı 1634 cm^{-1} 'e kaymıştır. Bu bant ile 1558 cm^{-1} bantları arasındaki oranın çapraz bağlayıcı oranındaki artışla değiştiği gözlemlenmiştir. A_{1645}/A_{1558} oranı, çapraz bağlanmamış olan %0 genipin grubunda oranı 0,6, %0,1 genipin ile bağlanmış olan grupta 0,75, %0,3 genipin ile bağlanmış olan grupta 1,15 ve %0,5 genipin ile bağlanmış olan grupta ise 1,35 olarak hesaplanmıştır. Bu oranlara ek olarak, A_{1645}/A_{1558} bandının aralığı genişlemektedir. Ayrıca, 1558 cm^{-1} deki N-H eğme bandının sönümlenerek kaybolmaya başladığı da görülmüştür. Bu durum çapraz bağlanmanın başarılı şekilde gerçekleşmiş olmasına bağlanabilir.

Lif kabağı ve kitosandan üretilmiş olan 'Kitosan L' serisinde ise, yine 'Kitosan' serisinde olduğu gibi hacimde ağırlıkça %0 genipin, %0,1 genipin, %0,3 genipin ve %0,5 genipinden oluşan alt gruplar bulunmaktadır. Bu gruplarda kitosandan gelen bağların frekanslarının haricinde lif kabağına özgü olduğu düşünülen absorban değerleri de alınmıştır. Bu değerler Tanobe ve ark. makalesindeki (65) sonuçlar ile karşılaştırılarak çalışmanın uyumluluğu incelenmiştir. Kullanmış olduğumuz lif kabağı NaOH ile yıkama işleminden sonra yapıda bulunan hemiselüloz uzaklaştırılmış ve bundan dolayı spektrumda 1735 cm^{-1} 'deki hemiselüloza ait C=O gerilme bandı görülmemiştir. Bu da yıkamanın başarı ile gerçekleştirildiğinin kanıtıdır. Tüm gruplarda 3335 cm^{-1} dalga sayısında O-H gerilme bandı, $2885\text{--}2890\text{ cm}^{-1}$ 'de C-H ve 1060 cm^{-1} 'de C-O gerilme bantları vardır. Çapraz bağlanmamış olan kontrol grubunda 1648 cm^{-1} ve 1560 cm^{-1} 'de sırasıyla C=O gerilme ve N-H eğme bantları bulunmaktadır. Bunlar hem selüloz hem de kitosanın içeriğinden kaynaklı çakışmalar

yaratabilir. Çapraz bağlanma gerçekleştiği zaman 1648 cm^{-1} 'deki gerilme bandı 1636 cm^{-1} 'lere kaymaktadır. Çapraz bağlanma gerçekleştiğinde bu bant aralığı genişlemektedir ve 1560 cm^{-1} 'deki bandı sönümleyerek tek bir bant gibi davranmaktadır (65).

Lif kabağı, kitosan ve PHBV kullanılarak üretilmiş olan Kitosan F serisi için de yine dört farklı çapraz bağlanma oranı denenmiştir. Suslu ve ark. makalesindeki değerler ile uyumlulukları incelenmiştir (103). Bu malzemede kitosan ve lif kabağı absorbans piklerine ek olarak PHBV'ye ait $2920\text{-}2935\text{ cm}^{-1}$ değerlerinde C-H gerilme bandı, 1722 cm^{-1} 'de C=O gerilme bandı bulunmaktadır. Ayrıca, 1455 ve 1380 cm^{-1} 'de C-H eğme bantları ve 1280 ve 1055 cm^{-1} 'de C-O gerilme bandı görülmektedir (108).

Bölüm 4'te sunmuş olduğumuz bulgulara SEM görüntülerinin üç farklı seri için de (Kitosan, Kitosan L ve Kitosan F) genel morfoloji hakkında bilgi vermesi amacıyla $100\times$ büyütme ile çekilmiş olduğu görülmektedir.

Hücre tutunması ve büyümesi açısından üretilmiş olan gözenekli doku iskelelerinde gözenek boyutu ve yapısı önem taşımaktadır. Gözenek boyutu hücre tipine göre değişirken, gözenek yapısının açık gözenekli olması gerekmektedir. Çalışmamızda üretilen menisküs doku iskelelerinin hepsi açık gözenekli bir yapıdadır. Gözenek boyutu ve dağılımı bu çalışma sürecinde belirlenememiş; fakat ilerleyen süreçte cıva porozimetresi ile ölçülecektir.

Le-Ping Yan ve ark. makalesinde (109) çalışmamız ile benzer yöntem kullanılarak kitosan doku iskeleleri üretilmiştir. SEM görüntüleri karşılaştırıldığında iskelelerin benzer morfolojide oldukları görülmektedir.

Kitosan L serisinde en önemli unsur lif kabağının kitosan ile entegre olabilmelerini sağlamaktır. SEM görüntülerinden tüm genipin konsantrasyonları için bu amacın gerçekleştirildiği, lif kabağı fiberlerinin kitosan içerisine gömüldüğü net bir şekilde görülmektedir. Kullanılan bu fiberlerin çapının $200\text{-}300\text{ }\mu\text{m}$ arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca, Tanobe ve ark. makalesinde (65) NaOH ile muamele edilen lif kabaklarının SEM görüntüleri ile üretilmiş olduğumuz doku iskelelerindeki lif kabaklarının yapısının benzediği görülmektedir.

Kitosan F serisinde nano boyutta PHBV fiberlerin yapıya entegre olduğu görülmektedir. PHBV nanofiber çapları Suslu ve ark. makalesindeki (103) ile tutarlılık göstererek 1000 nm 'den küçük değerdedir.

DMA analizi yardımıyla, menisküsün viskoelastik yapısına uygun özellikte doku iskelesi üretilip üretilmediği anlaşılmaya çalışılmıştır. Nasıl menisküs dokusu belirli bası yüklenmeleri altında yükü sönümleyerek yüklenme kalktığında eski haline dönüyorsa bu analizde bu durum simüle edilebilmektedir. Üretilen menisküs doku iskelelerinin de bu yapıya uygun olması

beklenmektedir. DMA analizi ‘Kitosan’, ‘Kitosan L’, ‘Kitosan F’ serileri için tüm genipin konsantrasyonlarındaki örneklere yapılmıştır.

Coluccino ve ark. makalesinde menisküs dokusunun üç farklı kesitinden alınan parçalara DMA analizi yapılmış ve 0,1-40 Hz arasındaki veriler toplanmıştır (110). Ortalama bir kişinin yürüyüş frekansı 1-2 Hz arasında değişmektedir. 10 Hz üzerindeki değerler koşma, zıplama gibi ani yüklenmelerin olduğu frekanslardandır. Menisküs bu değerleri sönümlemeye çalışır. Ancak, bu frekans değerleri arttıkça deformasyonlar oluşabilir. Bu sebeple 0,1-40 Hz çalışma aralığı yeterli görülmüştür. Bizim sonuçlarımız ile bu makaledeki sonuçlar arasında tutarlılık söz konusudur.

Tüm gruptaki örnekler için depolama modülünde 1 Hz’den sonra eğrisel bir artış görülmektedir. Bu artış örneklerin viskoelastik karakterde olduğunun ispatıdır. $\tan(\delta)$ değeri malzemelerin enerji sönümleme kabiliyetinin bir ölçüsüdür. 10 Hz sonrasında oluşan ani artış ise $\tan(\delta)$ değerinin fırlamasına sebebiyet vermektedir ki bu da sönümleme gereksiniminin artacağı ani yüklenme durumlarında beklenen bir sonuçtur (110). 0.1 Hz sonrasında deformasyon yükleri oluşacağı için menisküsün normal patolojisinin korunmasına olan gereksinim artmaktadır. Bu da maksimum $\tan(\delta)$ değerlerini verecektir. Tablo 8’de bahsedilen frekans değerleri için sonuçlar verilmektedir. Bu sonuçlarda depolama modülü malzemenin sertliği ile ilişkili iken $\tan(\delta)$ değeri malzemenin sönümleme yeteneğini belirtmektedir.

‘Kitosan’ serisi için değerleri incelediğimiz zaman, depolama modülü 0,055-0,015 MPa arasında değişmektedir. Tüm genipin konsantrasyonları için depolama modülünün en yüksek %0,5 genipin ile çapraz bağlanmış olan doku iskelesinde olduğu, en düşük ise %0,1 genipin ile çapraz bağlanmış olan kitosan doku iskelesinde olduğu görülmektedir. Ayrıca, $\tan(\delta)$ değerlerine bakıldığı zaman en yüksek değer %0,5 genipin ile çapraz bağlanmış olan doku iskelesi iken en düşük değer çapraz bağlanmayan doku iskelesinde bulunmaktadır.

‘Kitosan L’ serisi için değerleri incelediğimiz zaman ise, depolama modülü 0,025-0,005 MPa arasında değişmektedir. Tüm genipin konsantrasyonları için depolama modülünün en yüksek genipin ile çapraz bağlanmamış olan doku iskelesinde olduğu, en düşük ise %0,1 genipin ile çapraz bağlanmış olan doku iskelesinde olduğu görülmektedir. Ayrıca, $\tan(\delta)$ değerlerine bakıldığı zaman en yüksek değer %0,5 genipin ile çapraz bağlanmış olan doku iskelesi iken en düşük değer bu grupta da çapraz bağlanmayan doku iskelesinde bulunmaktadır.

Son olarak, ‘Kitosan F’ serisi için değerleri incelediğimiz zaman ise, depolama modülü 0,045-0,010 MPa arasında değişmektedir. Tüm genipin konsantrasyonları için depolama modülünü yine en yüksek genipin ile çapraz bağlanmamış olan doku iskelesi vermekte iken, en düşük değer ise %0,1 genipin ile çapraz bağlanmış olan doku iskelesinde olduğu görülmektedir. Ayrıca, $\tan(\delta)$ değerlerine bakıldığı zaman en yüksek değer %0,3 genipin ile

çapraz bağlanmış olan doku iskelesi iken en düşük değer bu grupta da çapraz bağlanmayan doku iskelesinde bulunmaktadır.

Tüm serilerden alınan $\tan(\delta)$ değerlerinin menisküsten alınan $\tan(\delta)$ değerleri ile karşılaştırmasını yaptığımız zaman, bu değer aralığı 0,15-0,20 olarak değişmektedir (110). ‘Kitosan L’ ve ‘Kitosan F’ serileri için alınan $\tan(\delta)$ değerleri bu sonuçlara yakındır. Ayrıca, frekansın artması ile $\tan(\delta)$ artış göstermektedir, bu da sönümlemenin arttığını gösterir. Bunlara ek olarak, çıkan depolama modül değerleri de basma deneyi sonuçlarındaki gerilme değerleri ile tutarlılık göstermektedir. Ancak, değerler birbirine yakın aralıklarda olduğu için deneylerin tekrarlanması yararlı olacaktır.

TGA-DTA analizi yardımı ile ‘Kitosan’ ve ‘Kitosan L’ serilerinin termal stabilite değerleri araştırılmıştır. Hepsi için Maksimum Bozunma Sıcaklığı (T_d) ve Bozunma Başlangıç Sıcaklığı (T_{onset}) değerleri ile kömürleşme verimleri hesaplanmıştır. Bu değerler Tablo 9’da verilmektedir. Ayrıca sonuçlar kitosan için Kumari R. ve ark. (111) makalesindeki sıcaklık değerleri ve lif kabaklı gruplar için de Tanobe ve ark. (65) makalesindeki değerler ile karşılaştırılmış ve anlamlı aralıkta değerler gözlemlenmiştir.

‘Kitosan’ serisi için iki fazda bozunma gözlemlenmiştir. Bunlardan ilki adsorbe edilmiş suyun malzemeden uzaklaştırıldığı düşünülen ve bu seri için 91-97°C civarında görülen değerdir. Bu noktada kayıp kütle miktarı %15-18 aralığında ölçülmüştür. Tüm genipin konsantrasyonları için T_d değerleri 285-300°C aralığında bulunmaktadır. T_{onset} sıcaklıkları ise, çapraz bağlanmayan için 260°C iken diğer üç konsantrasyon için 250°C olarak bulunmuştur. Malzemenin kömürleşme verimliliği çapraz bağlanmayan doku iskelesi için %24.6 iken diğerlerinde %29.2-29.4 aralığında hesaplanmaktadır.

‘Kitosan L’ serisi için aslında üç fazda bozunma gözlemlenmiştir. Ancak, bu üç faz çapraz bağlanmayan grupta diğerlerine göre daha belirgin iken çapraz bağlananlarda iki faz gibi görünmektedir. Adsorblanan su miktarı %11-13 aralığında ve 85-104°C civarındadır. Çapraz bağlanmamış olan doku iskelesi için, ikinci basamak kitosanın bozunmaya başladığı düşünülen 304°C, üçüncü basamak ise lif kabağının bozunduğu düşünülen 362°C olarak görülmektedir. Diğer üç genipin konsantrasyonu için T_d değerleri 332-335°C aralığında bulunmaktadır. T_{onset} sıcaklıkları ise, çapraz bağlanmayan için 270°C iken diğer üç konsantrasyon için 260-275°C aralığında bulunmuştur. Malzemenin kömürleşme verimliliği çapraz bağlanmayan doku iskelesi için %21.2 iken diğerlerinde %25.6-26.9 aralığında hesaplanmaktadır. T_d ve T_{onset} değerleri ‘Kitosan’ serisine göre kayma göstermiştir. Bu kaymanın sebebinin lif kabağının içeriğindeki selüloz tipinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çapraz bağlanma reaksiyonundan sonra iki fazlı bozunma gibi davranarak 334°C sıcaklıkta bozunma başlamaktadır.

Gerçekleştirilmiş olan şişme analizleri sayesinde üretmiş olduğumuz menisküs doku iskelelerinin su tutma yeteneği araştırılmıştır. Bu analiz gerçekleştirilirken çapraz bağlanmamış olan doku iskelesi kullanılmamış, hidrojel özelliğine sahip %0,1, %0,3 ve %0,5 genipin konsantrasyonu ile çapraz bağlanmış Kitosan ve Kitosan L serileri 24 saat boyunca PBS içinde tutulduktan sonra ölçümler alınmıştır. Kitosan serisinde şişme testi sonuçlarına bakıldığında ortalama şişme oranları %0,1 genipin için %3250 (± 311), %0,3 genipin için 3000% (± 304) ve %0,5 genipin oranı için %2800 (± 117) değerlerinde görülmektedir. Genipin ilavesi arttıkça şişme oranı azalmıştır ki bu durum çapraz bağlanma sonrası beklenilmektedir. Üretilen malzemede çapraz bağlayıcı oranının artmasıyla kitosan polimer zincirleri birbirlerine daha sıkı bağlanmakta, bu da malzemenin daha az şişmesini ve su tutmasını sağlamaktadır. Shu-Wei Wu ve ark. makalesinde kitosan ile yapılmış olan hidrojel çalışmasında şişme oranını %1600 olarak belirtmişlerdir (112). Bu çalışmada kitosan çözeltisi %1 oranında kullanılmıştır, ancak kullanılan kitosanın molekül ağırlığı verilmemiştir. Ayrıca, çapraz bağlanma reaksiyonu için bizim seçmiş olduğumuz genipinden farklı bir malzeme seçilmiştir. Bu sebeple şişme oranının farklılık yarattığı düşünülmektedir.

‘Kitosan L’ serisinde ise şişme testi sonuçları incelendiğinde sonuçlar beklenilenin tersini göstermektedir. Şişme oranı %1000 üzerinden %0,1 genipin için %1000 (± 39), %0,3 genipin için %1400 (± 62) ve %0,5 genipin oranı için %1600 (± 102) değerlerinde çıkmaktadır. Bu oranlar ‘Kitosan L’ serisinin ‘Kitosan’ serisinden daha az şişme gösterdiğini ifade etmektedir. Bu düşüşün sebebi lif kabağı eklenmesinin kitosan polimer zincirlerinin birbirlerine çapraz bağlanmasını zorlaştırdığı ve çapraz bağlanma verimini düşürdüğü olarak yorumlanabilir. Fakat, genipin oranının artmasıyla şişme oranının artışı şaşırtıcı bulunmuştur. Lif kabağının da hidrofilik bir yapıda ve şişmeye oldukça eğilimli olmasının ve üretilen iskelelerde aynı boyutta kesilmiş lif kabakları kullanılsa da doğal bir ürün olmasından dolayı yapısal farklılıkların olmasının bu sonucu doğurduğu düşünülmektedir. Kompozit yapısından dolayı, daha sağlıklı sonuçlar verebilmek için, daha çok sayıda şişme testi ile ‘Kitosan L’ serisi sonuçlarının değerlendirilmesi gerekmektedir. Ancak, elimizdeki verilerden yapılabilecek en doğru yorum, lif kabağının yapıya eklenmesinin kitosan hidrojellerin kontrolsüz şişmesi engellemiş olduğudur. Şişme oranında belirgin bir düşüş yaşanmıştır.

Çalışmada, DMA analizlerine ek olarak yapılmış olan basma yüklenmelerine karşı üretilen doku iskelelerinin dayanımları ölçülmüştür. Colucci ve ark. makalesinde belirtilen menisküse ait modül değerleri, menisküsün anizotropik yapısından ötürü değişiklik göstermektedir. Çevresel, radyal veya vertikal düzlemden alınan kesitlerde basma modülü 0.5-1.25 MPa arasında değişmektedir (110). Ayrıca çeşitli literatürlerden alınan değerler Subrata Pal’ın yayınında karşılaştırılmış ve kıkırdak dokusunun gerilme testleri sonrası elastik modül

değeri 1-10 MPa arasındaki değerlerde bulunurken, bası yüklenmeleri sonrasında bu değer 1 MPa olarak bulunmuştur (113). Menisküsün fibröz kıkırdak özellikte olması sayesinde çalışmamızda bu değerlerden yararlanılabilir. Deneylerden elde ettiğimiz veriler Tablo 10'da sunulmaktadır.

Bası yüklenmeleri altında menisküs doku iskelelerinin elastisite modülleri 'Kitosan' serisi için sırasıyla %0, %0,1, %0,3 ve %0,5 genipin oranları için 0,12 MPa, 0,07 MPa, 0,08 MPa ve 0,10 MPa olarak ölçülmüştür. Bu değerler kıkırdak dokusu için gerekli olan bası dayanımını karşılayamamaktadır.

Bası yüklenmeleri altında menisküs doku iskelelerinin elastisite modülleri 'Kitosan L' serisi için sırasıyla %0, %0,1, %0,3 ve %0,5 genipin oranları için 1,50 MPa, 1,67 MPa, 1,00 MPa ve 0,84 MPa olarak ölçülmüştür. 'Kitosan L' serisinde üretilmiş olan menisküs doku iskelelerinin mekanik dayanım değerleri kıkırdak dokusu için uygundur. Sadece %0,5 genipin olan kıkırdak için beklenilenden az değer vermiştir. Bunun sebebinin de genipin ile çapraz bağlanma oranının artışının malzemenin sertleşmesi ve kırılgan bir yapıya gelmiş olması olduğu düşünülmektedir.

Bası yüklenmeleri altında menisküs doku iskelelerinin elastisite modülleri 'Kitosan F' serisi için sırasıyla %0, %0,1, %0,3 ve %0,5 genipin oranları için 0,83 MPa, 0,35 MPa, 0,50 MPa ve 0,10 MPa olarak ölçülmüştür. Bu değerler kıkırdak dokusu için gerekli olan bası dayanımını karşılayamamaktadır.

Elde edilen bu sonuçlardan yola çıkılarak üç doku iskelesi serisi içinde en dayanıklı olanlar, Kitosan serisi için %0,5 genipin oranındaki doku iskelesi, 'Kitosan L' serisi için %0,1 genipin oranındaki doku iskelesi ve 'Kitosan F' serisi için çapraz bağlanmamış olan doku iskelesi olarak görünmektedir.

Çalışmada 'Kitosan F' serisinin yerine 'Kitosan L' serisi içlerinde en çok basma yüküne dayanan grup olarak görülmektedir. Ancak, yine de sadece kitosan olana göre daha çok dayanım göstermektedir. Bu sonuçlar DMA ve şişme testlerinin sonuçları ile örtüşmektedir. Lif kabağının yapıya katkısı tek başına kitosandan daha etkilidir.

Bu testler için üç tekrar yapılmıştır. Daha ileriki analizler için basma deneylerinin tekrarlarının gerçekleştirilmesi ve hatta vücut sıvısını taklit eden bir medyum veya PBS içerisinde bekletildikten sonra mekanik deneylerin tekrarlanması daha doğru sonuçlar verebilecektir.

Kullanılan malzemeler doğal olduğu için ayrı ayrı bu malzemeler için ön çalışmalar değerlendirildiğinde herhangi bir toksik etkiye rastlanmamıştır. Ancak, devam eden bu çalışmaların ışığında Kitosan, Kitosan L ve Kitosan F serisini oluşturan bu malzemelerin beraber kullanımlarında herhangi bir toksik etki oluşup oluşmadığı da incelenmelidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tablo 11: Çalışmadaki Analizlerin Sonuçları

	Kitosan Serisi	Kitosan L Serisi	Kitosan F Serisi
FTIR (kimyasal yapı karakterizasyonu)	Kitosana ait pikler var.	Kitosana ve lif kabağına ait pikler var. Ayrıca, lif kabağının yıkama işleminin başarılı olduğu görülmekte.	Kitosan, PHBV ve lif kabağına ait pikler var.
SEM(morfolojik yapı karakterizasyonu)	Açık gözeneklilik var.	Açık gözeneklilik var ve lif kabağı ile kitosan entegrasyonu sağlanmış.	Açık gözeneklilik var ve lif kabağı ile PHBV'nin yapıya entegrasyonu sağlanmış.
DMA	Değerler menisküs için gerekenin altında.	Değerler menisküs için gereken düzeyde altında.	Değerler menisküs için gerekene yakın.
TGA-DTA	Lif kabağı eklentisi olana göre daha az termal stabil yapıda.	Bozunma başlangıç sıcaklığında 30-40°C olumlu yönde bir kayma var. (330-340°C)	-
Şişme Testi	KontROLSÜZ şişme var.	Lif kabağı katkısı hidrojenlerin şişmesine uygun hale getirmiş.	-
Basma Testi	Değerler menisküs için gerekenin altında.	Değerler menisküs için gereken düzeyde altında.	Değerler menisküs için gerekene yakın.

- Bu çalışmada üretmiş olduğumuz kompozit doku iskelesinde basma kuvvetlerine karşı daha iyi dayanmasını sağlamak amacıyla doğal bir selüloz kaynağı olan lif kabağı kullanılmıştır.
- Ayrıca, lif kabakları kitosan gibi birçok faydalı özelliğe sahip olan doğal bir malzeme içerisine gömülerek kıkırdak dokusuna uyumu artırılmıştır.
- Üretmiş olduğumuz kompozit, doğal malzemedan oluşan menisküs doku iskeleleri, farklı amaçlarla kullanımda olan üç farklı malzemeyi bir arada kullanarak yeni kombinasyonun özellikleri test edilmiştir.
- Kullanılmış olan karakterizasyon yöntemleri sayesinde, üç farklı doku iskelesi ve her grupta dört farklı genipin konsantrasyonu ile alt grupların kıyaslanması sağlanmıştır.
- Yine doğal bir polimer olan PHBV'nin nano fiber yapısından yararlanılarak hem mekanik özelliklerinin artırılması hem de hücre tutunma ve çoğalmasının artırılması hedeflenmiştir. Ancak, KF serisinin mekanik dayanımı beklentiyi karşılamamıştır. Hücre tutunması için çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.
- Ayrıca, kullanılan malzemelerin farklı amaçlara hizmet etse de en çok rastlanılan doğal malzemelerden olması sebebiyle sonuçların literatürdeki bilgilerle karşılaştırılmasına imkan tanımıştır.
- Sonuç olarak, beklediğimiz gibi kitosan/lif kabağı ve PHBV fiber ile üretilmiş olan değil sadece kitosan ve lif kabağından üretilmiş olan menisküs doku iskelesi yapılan karakterizasyonlarda daha olumlu sonuçlar vermiştir.
- Ancak, *in vitro* çalışmaların tamamlanması ve histolojik kıyaslamaların yapılmasından sonra bu yönelim değişebilir. Bu sebeple, çalışmalar devam etmektedir ve en yakın zamanda tamamlanarak yayımlanacak ve kesin bilgiye ulaşılacaktır.
- Son olarak, *in vitro* çalışmalardan sonra deney hayvanlarında *in vivo* olarak denenmesi de vücut içindeki biyouyumluluğun anlaşılabilmesi için iyi olacaktır. Bu çalışmadaki gelecek hedeflerinden biri de budur.

7. KAYNAKLAR

1. *The function of the semilunar cartilages*. D., King. 1936, J Bone Joint Surg , s. 1069–1076.
2. B. Lebel, C. Tardieu, B. Locker, C. Hulet, Philippe Beaufils, René Verdonk. *The Meniscus*. 2010.
3. *Meniscus insertion anatomy as a basis for meniscus replacement: a morphological cadaveric study*. Kohn D, Moreno B. 1995, Arthroscopy, s. 96–103.
4. *The strength of the menisci of the knee as it relates to their fine structure*. Bullough PG, Munuera L, Murphy J et al. 1970, J Bone Joint Surg , s. 564–567.
5. *Surgery of the Meniscus*. . Zdanowicz U., Śmigielski R., Espejo-Reina A., Espejo-Baena A., Madry H. 2016, Anatomy and Vascularisation. .
6. *Microvasculature of the human meniscus*. . Arnoczky SP, Warren RF. 1982, Am J Sports Med , s. 90–95.
7. *Physiologie Générale des Articulations à l'état Normale et Pathologique*. A, Policard. 1936.
8. *The vascular and nerve supply of the human meniscus*. . Day B, Mackenzie WG, Shim SS et al. 1985, Arthroscopy, s. 58–62.
9. *The vascularization of the menisci. Morphological basis for the repair*. Benedetto KP, Glötzer W, Künzel KH, Gaber O. 1985, Acta Anat (Basel), s. 88–92.
10. *Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration*. Herwig J, Egner E, Buddecke E. 1984, Ann Rheum Dis, s. 635–640.
11. *Variation of collagenous and non-collagenous proteins of human knee joint menisci with age and degeneration*. Ingman AM, Ghosh P, Taylor TK. 1974, Gerontologia, s. 212–223.
12. *Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus*. Eyre DR, Wu JJ. 1983, FEBS Lett, s. 265–270.
13. *Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci*. HS, Cheung. 1987, Connect Tissue R, s. 343–356.
14. *Acute injury affects lubricin expression in knee menisci: an immunohistochemical study*. Musumeci G, Loreto C, Carnazza ML, Cardile V, Leonardi R. 2013, Ann Anat, s. 151–158.

15. *Effect of partial medial meniscectomy on the proprioceptive function of the knee.* Karahan M, Kocaoglu B, Cabukoglu C, Akgun U, Nuran R. 2010, Arch Orthop Trauma Surg, s. 427–431.
16. Halewood C., Amis A.A. Physiology: Biomechanics. *Surgery of the Meniscus.* Berlin : yazarı bilinmiyor, 2016.
17. *Effects of degeneration on the compressive and tensile properties of human meniscus.* . Fischenich KM, Lewis J, Kindsfater KA, Bailey TS, Haut Donahue TL. 2015, J Biomech, s. 1407–1411.
18. *Material properties and structure-function relationships in the menisci.* . Fithian DC, Kelly MA, Mow VC. 1990, Clin Orthop Relat , s. 19–31.
19. *Is the circumferential tensile modulus within a human medial meniscus affected by the test sample location and cross-sectional area?* Lechner K, Hull ML, Howell SM. 2000, J Orthop, s. 945–951.
20. *Compressive moduli of the human medial meniscus in the axial and radial directions at equilibrium and at a physiological strain rate.* Chia HN, Hull M. 2008, J Orthop Res, s. 951–956.
21. *Interspecies variation of compressive biomechanical properties of the meniscus.* Joshi MD, Suh J-K, Marui T, Woo SLY. 1995, J Biomed Mater Res, s. 823–828.
22. *Nanoindentation of human meniscal surfaces.* Moyer JT, Abraham AC, Donahue TLH. 2012, J Biomech, s. 2230–2235.
23. *Knee pain and mobility impairments: meniscal and articular cartilage lesions.* Logerstedt DS, Snyder-Mackler L, Ritter RC, Axe MJ. 2010, J Orthop Sports Phys Ther, s. A1–A35.
24. *Review of meniscal injury and associated sports.* Baker BE, Peckham AC, Pupparo F, Sanborn JC. 1985, Am J Sports Med, s. 1-4.
25. *American board of orthopaedic surgery practice of the orthopaedic surgeon: part-II, certification examination case mix.* . Garrett WE Jr, Swiontkowski MF, Weinstein JN, Callaghan J, Rosier RN, Berry DJ, Harrast J, Derosa GP. 2006, J Bone Joint Surg, s. 660-667.
26. *A systematic review of clinical outcomes in patients undergoing meniscectomy.* Salata MJ, Gibbs AE, Sekiya JK. 2010, Am J Sports Med, s. 1907–1916.

27. *The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration*. Makris EA, Hadidi P, Athanasiou KA. 2011, *Biomaterials*, s. 7411–7431.
28. *Epidemiology of athletic knee injuries: a 10-year study*. Majewski M, Susanne H, Klaus S. 2006, *Knee*, s. 184–188.
29. Fayard JM, Pereira H, Servien E, Lustig S, Neyret P. Meniscectomy global results-complications. *The Meniscus*. Berlin : yazarı bilinmiyor, 2010.
30. *The meniscus: past, present and future*. R, Verdonk. 2011, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, s. 145-146.
31. Beaufils P, Englund M, Järvinen TLN, Pereira H, Pujol N. How to share guidelines in daily practice on meniscus repair, degenerate meniscal lesion, and meniscectomy. 2014, s. 97–112.
32. BW, Jakobson. Meniscal injuries. *ISAKOS/ESSKA standard terminology, definitions, classification and scoring systems for arthroscopy: knee, shoulder and ankle joint*. 2007.
33. M, Watanabe. Disorders of the knee. *Arthroscopy of the knee joint*. 1974.
34. *Knee joint changes after meniscectomy*. TJ, Fairbank. 1948, *J Bone Joint Surg*.
35. *Osteoarthritis after arthroscopic partial meniscectomy*. . Rangger C, Klestil T, Gloetzer W et al. 1995, *Am J Sports Med*, s. 240–244.
36. Jacobi M., Jakob R.P. Meniscal Repair: Enhancement of Healing Process. *The Meniscus*. Berlin : yazarı bilinmiyor, 2010.
37. *Meniscus preservation; rationale, repair techniques and results*. . Boyd KT, Myers PT. 2003, *Knee*, s. 1–11.
38. *Experimental models to promote healing of tears in the avascular segment of canine knee menisci*. Gershuni DH, Skyhar MJ, Danzig LA et al. 1989, *J Bone Joint Surg Am*.
39. *Hi-frequency electrical cautery stimulation in the treatment of displaced meniscal tears*. . RI, Pavlovich. 1998, *Arthroscopy*, s. 566–571.
40. *Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs*. Arnoczky SP, Warren RF, Spivak JM. 1988, *J Bone Joint Surg*, s. 1209–1217.

41. *Arthroscopic meniscal repair using fibrin glue. Part I: experimental study.* Ishimura M, Ohgushi H, Habata T et al. 1997, *Arthroscopy* , s. 551–557.
42. *Augmentation of meniscal repairs with cyanoacrylate glue.* . Koukoubis TD, Glisson RR, Feagin JA Jr et al. 1995, *J Biomed Mater Res*, s. 715–720.
43. *Use of the fascia sheath coverage and exogenous fibrin clot in the treatment of complex meniscal tears.* Henning CE, Yearout KM, Vequist SW et al. 1991, *Am J Sports Med*, s. 626–631.
44. *Transmission of the load in the knee joint with special reference to the role of menisci: part II. Experimental results, discussion and conclusions.* Seedhom BB, Hargreaves DJ. 1979, *Eng Med*, s. 220–228.
45. *The effect of lateral meniscectomy on motion of the knee.* Levy IM, Torzilli PA, Gould JUD, Warren RF. 1989, *J Bone Joint Surg*, s. 401–406.
46. *The consequences of meniscectomy.* McDermot ID, Amis A. 2006, *J Bone Joint Surg*, s. 1549–1556.
47. *A brief definition of regenerative medicine.* . Mason C, Dunnill P. 2008, *Regen Med*.
48. Vacanti JP, Vacanti CA. The history and scope of tissue engineering. *Principles of Tissue Engineering*. San Diego : yazarı bilinmiyor, 2007, s. 3-6.
49. *Tissue engineering.* . Langer R, Vacanti JP. 1993, *Science* , s. 260:920.
50. C. Gualandi. Porous Polymeric Bioresorbable Scaffolds for Tissue Engineering. Berlin : yazarı bilinmiyor, 2011.
51. *Standard guide for characterization and testing of biomaterial scaffolds used in tissue-engineered medical products.* F2150-07, ASTM. 2007.
52. *Three-Dimensional Porous Scaffold of Hyaluronic Acid for Cartilage Tissue Engineering.* Kim, Dae-Duk & Kim, Dong-Hwan & Son, Yun-Jeong. 2011, *Stud. Mechanobiol. Tissue Eng. Biomater*, s. 329-349.
53. *Principles of tissue engineering.* Lanza RP, Langer RS, Vacanti J. 2007. Amsterdam.
54. Hardingham, T. Cartilage tissue regeneration,. *Electrospinning for Tissue Regeneration*. 2011.

55. *Regeneration of meniscal cartilage with use of a collagen scaffold. Analysis of preliminary data.* Stone KR, Steadman JR, Rodkey WG et al. 1997, J Bone Joint Surg, s. 1770–1777.
56. *Comparison of the collagen meniscus implant to partial meniscectomy: a prospective randomized trial.* Rodkey WG, DeHaven KE, Montgomery WH et al. 2008, J Bone Joint Surg, s. 1413–1426.
57. W.G., Rodkey. Menaflex (TM) Collagen Meniscus Implant: Basic Science. *The Meniscus.* Berlin : yazarı bilinmiyor, 2010.
58. *Solubility and property of chitin in NaOH/urea aqueous solution.* X. Hu, Y. Du, Y. Tang, Q. Wang, T. Feng, J. Yang, J. F. Kennedy,. 2007, Carbohydr. Polym., s. 451–458.
59. *Chitin and chitosan for versatile applications.* P. K. Dutta, M. Ravikumar, J. Dutta,. 2002, J. Macromol. Sci., Polym. Rev., s. 307–354. .
60. *A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications.* Zargar, Vida & Asghari, Morteza & Dashti, Amir. 2015, ChemBioEng Reviews.
61. Muzzarelli, R.A.A. *Natural Chelating Polymers*,. NewYork : yazarı bilinmiyor, 1973.
62. Zikakis, J.P. *Chitin, Chitosan and Related Enzymes.* Orlando : yazarı bilinmiyor, 1984.
63. *Recent Advances in Graft Copolymerization and Applications of Chitosan: A Review.* V. K. Thakur, M. K. Thakur,. 2014., ACS Sustainable Chem. Eng.
64. Roberts, G. *Chitin Chemistry*,. Londra : MacMillan, 2005.
65. *A comprehensive characterization of chemically treated Brazilian sponge-gourds (Luffa cylindrica).* Tanobe, Valcineide & H.D. Sydenstricker, Thais & Munaro, Marilda & Amico, Sandro. 2005, Polymer Testing., s. 474-482.
66. *Plantas Fibrosas da Flora Mundial*,. J.C. Medina. Instituto Agronomico de Campinas : yazarı bilinmiyor, 1959.
67. *Development of a method for immobilization of non-flocculating cells in loofa (Luffa cylindrica) sponge.* J.C. Ogbonna, S. Tomiyama, H. Tanaka,. 1996, Process. Biochem, s. 737–744.

68. *Morphological characterization and mechanical behavior of sponge gourd (Luffa cylindrica)—polyester composite materials*. C.A. Boynard, J.R.M. D'almeida,. 2000, Polym.-Plast. Technol. Eng, s. 489–499.
69. *Evaluation of loofah as a sorbent in the decolorization of basic dye contaminated aqueous system*. Oladoja NA, Aboluwoye CO, Akinkugbe AO. 2009, Ind Eng Chem Res., s. 2786-2794.
70. *Morphosynthesis: high fidelity inorganic replica of the fibrous network of loofa sponge (Luffa cylindrica)*. Mazali IO, Alves OL. 2005, Anais da Academia Brasileira de Ciencias, s. 25-31.
71. ER, Echeverry. *Luffa cylindrica*. Bogota, Colombia : yazarı bilinmiyor, 1984.
72. *Development of the fibrous net in the fruit of various races of Luffa cylindrica*. Sinnot EW, Bloch R. 1943, Bot Gaz., s. 90-100.
73. *Biodegradable Polymers*. Isabelle, Vroman & Lan, Tighzert. 2009, Materials.
74. *Thermophilic bacterium caldimonas taiwanensis produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources*. Sheu, D.S., ve diğ erleri. 2009, Enz. Microbial. Technol.
75. *Reactive blending methodologies for Biopol*. Avella, M., ve diğ erleri. 1996, Polym. Int., s. 191-204.
76. *Analysis of the mechanical and degradation performances of optimised agricultural biodegradable films*. Briassoulis, D. 2007, , Polym. Degr. , s. 1115-1132.
77. *Characterization and properties of biodegradable poly(hydroxyalkanoates) and 4,4-dihydroxydiphenylpropane blends: intermolecular hydrogen bonds, miscibility and crystallization*. Chen, C., Dong, L. ve Yu, P.H.F. 2006,, Eur. Polym. J., s. 2838-2848.
78. D. R. PAUL and S . NEWMAN. “*Polymer Blends*. 1978.
79. *Review Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxy)butyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) copolymers*. Avella, Manuel & Martuscelli, E & Raimo, M. 2000, Journal of Materials Science., s. 523-545.
80. *Crystallization kinetics of bacterial poly(3-hydroxylbutyrate) copolyesters with cyanuric acid as a nucleating agent*. Pan, Pengju & Shan, Guorong & Bao, Yongzhong & Weng, Zhixue. 2013, Journal of Applied Polymer Science.

81. *Identification and determination of geniposide, genipin, gardenoside, and geniposidic acid from herbs by HPLC/photodiode-array detection.* Tsm TH, Westly J, Lee TF, Chen CF. 1994, J Liq Chromatogr, s. 2199–2205.
82. *Environmental friendly cold-mechanical/Sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (Genipa americana).* Ramos-de-la-Peña AM, Renard CMGC, Wicker L, Montañez JC, García-Cerda LA, Contreras-Esquivel JC. 2014, Ultrason Sonochem, s. 43-49.
83. *The structure of genipin.* Djerassi C, Nakano T, James AN, Zalkow LH, Eisenbraun EJ, Shoolery JN. 1961, J Org Chem, s. 1192–1206.
84. *Enzymatic studies on the animal and intestinal bacterial metabolism of geniposide.* Almog J, Cohen Y, Azoury M, Hahn TR. 2004, J Forensic Sci, s. 1–3.
85. *Production of anti-tumorpromoting iridoid glucosides in Genipa americana and its cell cultures.* Ueda S, Iwahashi Y, Iokuda H. 1991, J Nat Prod, s. 1677–1680.
86. *A review through recovery, purification and identification of genipin.* Mayela Ramos-de-la-Peña, Ana & Renard, Catherine & Montanez, Julio & de la Luz Reyes-Vega, María & Contreras-Esquivel, Juan. 2014, A review through recovery, purification and identification of genipin. Phytochemistry Reviews, s. 1-13.
87. *Obtention of blue colorant from jenipapo fruit.* Renhe I, Stringheta PC, Fonseca e Silva F, Veloso de Oliveira T. 2009, Pesquisa Agropecuária Brasileira, s. 649–652.
88. M, Bose G. *Recherches sur la cause et sur la véritable théorie de l'électricité.* Wittenberg : yazarı bilinmiyor, 1745.
89. F, Cooley J. *Apparatus for Electrically Dispersing Fluids Patent 692631.* US : yazarı bilinmiyor, 1902.
90. *On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity.* Rayleigh, Lord. 1882, Philos Mag, s. 184–6.
91. J, Morton W. *Method of Dispersing Fluids US Patent 705691.* US : yazarı bilinmiyor, 1902.
92. A, Formhals. *Process and apparatus for preparing artificial threads, US Patent 1975504.* US : yazarı bilinmiyor, 1934.

93. *Electrospinning process and applications of electrospun fibers.* H, Doshi J and Reneker D. 1995, J Electrostat, s. 151–60.
94. *Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning.* I, Reneker D H and Chun. 1996, Nanotechnology, s. 216–23.
95. L. Wang, A.J. Ryan,. 1 - Introduction to electrospinning. *Electrospinning for Tissue Regeneration*,.
96. *A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites.* Huang Z M, Zhang Y Z, Kotaki M and Ramakrishna S. 2003, Compos Sci Technol,, s. 2223–53.
97. *Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?* N, Li D and Xia Y. 2004, Adv Mater, , s. 1151–70.
98. *Biodegradable Polymer-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering.* N. Sultana. 2013, Springer Briefs in Applied Sciences and Technology.
99. Whang K, Healy KE. Processing of polymer scaffolds: freeze-drying. *Methods of tissue engineering*. San Diego : yazarı bilinmiyor, 2002.
100. *Macroporous poly(L-lactide) scaffold 1. Preparation of a macroporous scaffold by liquid–liquid phase separation of a PLLA-dioxane water system.* Hua FJ, Kim GE, Lee JD, Son YK, Lee DS. 2002, J Biomed Mater Res, s. 161–167.
101. *Fabrication of poly(alpha-hydroxy acid) foam scaffolds using multiple solvent systems.* Hu Y, Grainger DW, Winn SR, Hollinger JO. 2002, J Biomed Mater Res , s. 563–572.
102. *Function of the medial meniscus in force transmission and stability.* Walker, Peter & Arno, Sally & Bell, Christopher & Salvadore, Gaia & Borukhov, Ilya & Oh, Cheongeun. 2015, Journal of biomechanics.
103. *Effect of surfactant types on the biocompatibility of electrospun HAp/PHBV composite nanofibers*,. A. Suslu, A. Z. Albayrak, A. S. Urkmez, E. Bayir, U. Cocen. 2014, J Mater Sci: Mater Med, s. 2677–2689.
104. *Enzymic Studies on the Animal and Intestinal Bacterial Metabolism of Geniposide.* Akao, T., Kobashi, K. ve Aburada, M. 1994, Biol Pharm Bull.

105. *Studies on the Blue Pigments Produced from Genipin and Methylamine. II .On the Formation Mechanisms of Brownish-Red Intermediates Leading to the Blue Pigment Formation.* Touyama, R., ve diğerleri. 1994, Chem Pharm Bull, s. 1571-1578.
106. *Mechanism and kinetics of crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin.* Butler, Michael & Ng, Yiu-Fai & Pudney, Paul. 2003, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, s. 3941 - 3953.
107. *Chitosan coatings crosslinked with genipin for corrosion protection of AZ31 magnesium alloy sheets.* Y de Pozzo L, da Conceição TF, Spinelli A, Scharnagl N, Pires ATN. basım yeri bilinmiyor : Carbohydrated Polymers, 2018.
108. *Electrospun PHBV Nanofibers Containing HA and Bredigite Nanoparticles: Fabrication, Characterization and Evaluation of Mechanical Properties and Bioactivity.* Kouhi, Monireh & P. Prabhakaran, Molamma & Shamanian, Morteza & Fathi, Mohammadhossein & Morshed, Mohammad & Ramakrishna, Seeram. 2015, Composites Science and Technology.
109. *“Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications.”.* Yan, Le-Ping et al. 2010, Journal of biomedical materials research., s. 465-75.
110. *Anisotropy in the Viscoelastic Response of Knee Meniscus Cartilage.* Luca Coluccino, Chiara Peres, Riccardo Gottardi, Paolo Bianchini, Alberto Diaspro, Luca Ceseracciu. Vol 15, 2017, J Appl Biomater Funct Mater, Cilt Issue 1, s. e77-e83.
111. *Physicochemical and biological activity study of genipin-crosslinked chitosan scaffolds prepared by using supercritical carbon dioxide for tissue engineering applications.* Kumari Rinki, P.K. Dutta. 46, basım yeri bilinmiyor : International Journal of Biological Macromolecules, 2010.
112. *Strengthening injectable thermo-sensitive NIPAAm-g-chitosan hydrogels using chemical cross-linking of disulfide bonds as scaffolds for tissue engineering.* Shu-Wei Wu, Xifeng Liu, A. Lee Miller II, Yu-Shiuan Cheng, Ming-Long Yeh, Lichun Lu. 2018, Carbohydrate Polymers.
113. Pal, Subrata. Mechanical Properties of Biological Materials. *Design of Artificial Human Joints & Organs.* pp.23-40 : Springer, 2014.

114. *Freeze-drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological products*. Allémann, Eric. NewYork : yazarı bilinmiyor, 2001. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.

115. *Biomechanics of the menisci of the knee*. Ian D. McDermott, Spyridon D. Masouros , Andrew A. Amis. 22, 2008, Current Orthopaedics , s. 193e201.



8. EKLER

8.1. Arbis Özgeçmiş

GİZEM BAYSAN

Doğum Yılı:	1990
Yazışma Adresi:	Dokuz Eylül Üniversitesi Biyomekanik Bölümü, 35340 İnciraltı/İZMİR
Telefon:	+90 554 747 66 79
Faks:	-
e-posta:	gizemciner@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	Fen Fakültesi/ Fizik Bölümü	Fizik	Lisans	2013
TR	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Biyomekanik Anabilim Dalı	Biyomekanik	Yüksek Lisans	2018

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Fizik(teori), biyomekanik(deney ve teori), Hücre kültürü

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

--

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayımlar

“Characterization of Meniscus Scaffolds Containing PHBV Nanofibers and Loofah Embedded in Chitosan”, MOLBIOTECH, 2018, 7. Uluslararası Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, sf 18

“Comparison of Bone Marrow and Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells Properties in Musculoskeletal Tissue Engineering” MOLBIOTECH, 2018, 7. Uluslararası Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, sf 43

Son iki yılda verilen lisans dersleri

Akademik Yıl	Dönem	Dersin Adı	Haftalık Saati		Öğrenci Sayısı
			Teorik	Uygulama	
2016-2017	Güz				
	İlkbahar				
2017-2018	Güz				
	İlkbahar				

8.2. Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.
Sayı: 1619

23.06.2017

Sayın Prof.Dr.Hasan HAVİTÇİOĞLU,

Kurulumuz tarafından 22.06.2017 tarih ve 3322-GOA protokol numaralı 2017/17-40 karar numarası ile görüşülen **“Poly-3 Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHBV) ve Lif Kabağı Temelli Hidrojel Menisküs Doku İskelelerinin Histoloji, Biyokimyasal ve Biyomekanik Analizleri”** konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	3322-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Poly-3 Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHBV) ve Lif Kabağı Temelli Hidrojel Menisküs Doku İskelelerinin Histoloji, Biyokimyasal ve Biyomekanik Analizleri
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Hasan HAVİTÇİOĞLU Ortopedi A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017/17-40	Tarih:22.06.2017
	Prof.Dr.Hasan HAVİTÇIOĞLU'nun sorumlusu olduğu "Poly-3 Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHBV) ve Lif Kabağı Temelli Hidrojel Menisküs Doku İskelelerinin Histoloji, Biyokimyasal ve Biyomekanik Analizleri" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐ H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐ H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐ H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	