

**Kitosan - Jelatin Yapıların Doku Mühendisliği Amaçlı  
2-D ve 3-D Hazırlanması, Karakterizasyonu ve  
Biyouyumluluk Özelliklerinin İncelenmesi**

**Proje No: 109M325**

Prof. Dr. Nesrin HASIRCI  
Cansel IŞIKLI  
Aysu KÜÇÜKTURHAN

AĞUSTOS 2010  
ANKARA

## ÖNSÖZ

Bu projede, doku mühendisliği uygulamaları için, kitosan-jelatin/hidroksiapatit içeren kompozit destek yapıları oluşturulmuş, karakterizasyonları yapılmış ve hücreler ile etkileşimi incelenmiştir. Desteklerin hazırlanmasında, laboratuvarlarımızda sentezlenen sinterli ve sintersiz hidroksiapatit tozları farklı oranlardaki kitosan-jelatin karışımlarına eklenmiş, çözeltiden kurutma tekniği ile hazırlanan 2-Boyutlu ve dondurarak-kurutma tekniği ile hazırlanan 3-boyutlu desteklerin farklı özellikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar çerçevesinde desteklerin hazırlanış şartları optimize edilmiştir.

Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü laboratuvarlarında yürütülen bu proje, TÜBİTAK tarafından 1002 Hızlı Destek Programı kapsamında 109M325 proje koduyla 01 Ağustos 2009 - 01 Ağustos 2010 tarihleri arasında desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
TABLolar LİSTESİ .....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vi
ÖZET .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1 GİRİŞ.....	2
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Sert Doku Mühendisliği.....	3
2.2 Doku Destek Malzemeleri.....	5
2.2.1 Kitosan.....	7
2.2.2 Jelatin .....	8
2.2.3 Hidroksiapatit.....	9
2.3 Sert Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler .....	10
2.4 Doku Desteklerinin Karakterizasyonu .....	11
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1 Malzemeler .....	13
3.2 Hidroksiapatit Sentezi .....	13
3.3 Doku Destek Yapılarının Hazırlanması .....	14
3.4 Doku Destek Yapılarının Karakterizasyonu.....	14
4 SONUÇLAR.....	15
4.1 Hidroksiapatit Sentezi .....	15
4.2 Hidroksiapatit Karakterizasyon Sonuçları.....	15
4.2.1 X-Işını Kırılım Sonuçları .....	15

4.2.2	Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi- Hafifletilmiş Toplam Yansıtma (FTIR-ATR) Analizi .....	16
4.2.3	Hidroksiapatit Partikül Yapısı .....	17
4.3	Film Hazırlanması .....	18
4.4	Film Karakterizasyonu .....	20
4.4.1	Fourier Transform Kızılötesi- Azaltılmış Toplam Reflektans (FTIR-ATR) Analizi .....	20
4.4.2	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Sonuçları .....	22
4.4.3	Filmlerin Mekanik Özellikleri.....	23
4.4.4	Yüzey Hidrofilikliği .....	24
4.4.5	Film Yapıların Şişme Değerleri .....	26
4.4.6	Yüzey Yapısı Analizi.....	28
4.4.7	Filmlerin Hücre Etkileşimleri.....	29
4.5	Gözenekli Kitosan-jelatin (spxC-G), Kitosan-jelatin/nsHA (spxC-G/nsHA) ve Kitosan-jelatin/sHA Yapıların Karakterizasyonu .....	35
4.5.1	Gözenekli Sünger Yapıların Morfolojileri.....	35
4.5.2	Mekanik Özellikler .....	37
4.5.3	<i>In vitro</i> Test Analizleri.....	39
5	TARTIŞMA.....	422
6	KAYNAKLAR .....	444

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1 Kimyasallar .....	13
Tablo 2 DSC analiz sonuçlarından elde edilen su buharlaşması ve bozunma sıcaklıkları değerleri .....	23
Tablo 3 Karışım ve kompozit filmlerin mekanik test sonuçları .....	24
Tablo 4 Filmlerin su ile oluşturduğu temas açısı değerleri .....	25
Tablo 5 Filmlerin yüzey enerji değerleri.....	25
Tablo 6 Sünger yapıların ve süngerimsi kemik dokusunun mekanik özellikleri .....	38

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan elemanlar .....	3
Şekil 2 Doku desteklerinin taramalı elektron mikroskobu mikrografları (a) Polikaprolakton (PCL) bazlı hızlı prototip geliştirme yöntemi ile hazırlanmış 3-D destek yapı, (b) jelatin bazlı dondurma-kurutma yöntemi ile hazırlanmış destek yapı, (c) mikro desenli polimerik filmler, (d) elektro-eğirme yöntemi ile elde edilmiş jelatin-PCL destek yapı .....	6
Şekil 3 Kitinden deasetilasyon ile kitosan sentezi .....	7
Şekil 4 Hidroksiapatitin kimyasal yapısı (Rakamlar atomların sayısını gösterir.).....	10
Şekil 5 Hidroksiapatit sentezi.....	15
Şekil 6 Hidroksiapatit için XRD grafikleri (a) Sinterlenmemiş hidroksiapatit (b) sinterlenmiş hidroksiapatit .....	16
Şekil 7 Hidroksiapatit FTIR-ATR spektrası.....	17
Şekil 8 Hidroksiapatit SEM mikrografları (a, b) nsHA, (c, d) sHA .....	18
Şekil 9 Kompozit filmlerin fotoğrafları, (a)xC, (b)xC-G:3-1, (c)xC-G:1-1, (d)xG, (e)xC/nsHA, (f) xC-G:3-1/nsHA, (g) xC-G:1-1/nsHA, ve (h) xG/nsHA. ....	19
Şekil 10 Jelatinin aktifleşme ve bağlanma reaksiyonları, (A) jelatin karboksil grup aktivasyonu (B) aktif jelatinin jelatin ile reaksiyonu, (C) aktif jelatinin kitosan ile reaksiyonu, (D) aktif jelatinin NHS-aktifleştirmiş jelatin ile reaksiyonu.....	19
Şekil 11 Filmlerin FTIR spektralleri, (a) çapraz bağlanmamış kitosan-jelatin, (b) çapraz bağlanmış kitosan-jelatin, (c) kitosan-jelatin/nsHA .....	21
Şekil 12 Filmlerin DSC grafikleri, (a) çapraz bağlanmış kitosan-jelatin filmleri, (b) kitosan-jelatin/nsHA kompozit filmleri .....	22
Şekil 13 Filmlerin şişme değerleri, (a) çapraz bağlanmış kitosan-jelatin filmleri, (b) kitosan-jelatin/hidroksiapatit kompozit filmleri .....	27
Şekil 14 Film yapılarının SEM mikrografları .....	28
Şekil 15 Filmler üzerindeki Saos-2 hücrelerinin 1. ve 7. gün sayıları.....	30
Şekil 16 Çapraz bağlı kitosan-jelatin filmlerin Saos-2 hücre ekimi sonrası 1. ve 7. gün floresan mikroskop fotoğrafları (20X) .....	31
Şekil 17 Çapraz bağlı kitosan-jelatin/hidroksiapatit filmlerin Saos-2 hücre ekimi sonrası 1. ve 7. gün floresan mikroskop fotoğrafları (20X) .....	32

Şekil 18 Çapraz bağlı kitosan-jelatin filmlerin Saos-2 hücre ekimi sonrası 1. ve 7. gün SEM mikrografları .....	33
Şekil 19 Çapraz bağlı kitosan-jelatin/hidroksiapatit filmlerin Saos-2 hücre ekimi sonrası 1. ve 7. gün SEM mikrografları .....	34
Şekil 20 Gözenekli sünger yapıların FTIR-ATR spektraları .....	35
Şekil 21 Gözenekli yapıların taramalı elektron mikroskop mikrografları .....	36
Şekil 22 Hidroksiapatit eklenmiş destek yapıların gözenek duvarlarının SEM mikrografları .....	37
Şekil 23 Sünger yapıların basma deney sonuçları, (a) elastik modülüs (E), (b) maksimum sıkışma direnci (UCS).....	38
Şekil 24 Gözenekli sünger yapıların MTS testi ile yapılan hücre çoğalması sonuçları.....	39
Şekil 25 Saos-2 hücreleri ekilmiş çapraz bağlı kitosan-jelatin, kitosan-jelatin/nsHA ve kitosan-jelatin/sha kompozit sünger destek yapıların 1. ve 7. gün konfokal fotoğrafları .....	40
Şekil 26 Saos-2 hücreleri ekilmiş çapraz bağlı kitosan-jelatin, kitosan-jelatin/nsHA ve kitosan-jelatin/sha kompozit sünger destek yapıların 1. ve 7. gün SEM mikrografları .....	41

## ÖZET

Doku mühendisliği, zarar görmüş ve işlevini yerine getiremeyen doku ve organlara destek vermek, gerekirse tamamen yerini almak ve onların fonksiyonlarını yeniden kazanmasını sağlamak üzere, hücre dışı yapay bir yapı üzerinde belli hücrelerin büyütülmesi ile doku-benzeri organı yapılar geliştirmek ve onları vücuda yerleştirmek temeline dayanır. Hasarlı doku bölgesine destek olmak amacıyla çeşitli polimerler ve özellikle doğal polimerler büyük önem taşımaktadır. Doğal bir polimer olan kitosan, lineer amino polisakkarit yapısındadır ve doku yenilenmesi sürecinde uygun fizyolojik ortamı sağladığı için biyomalzeme olarak çok çalışılan ve kullanılan bir kimyasal olmuştur. Kitosan, biyoyumluluğunu artırmak ve mekanik dayanımını geliştirmek amacı ile, başka polimerler ve katkı maddeleri ile birlikte kullanılabilir. Bu çalışmada, kitosan jelatin ile birlikte kullanılmış ve mekanik dayanımını arttırmak amacı ile yapıya inorganik kalsiyum fosfat seramiği olan hidroksiapatit (HA) eklenmiştir. Bu amaçla, çöktürülmüş sinterlenmemiş (nsHA) ve yüksek kristaliniteye sahip sinterlenmiş (sHA) olmak üzere iki çeşit HA sentezlenmiş ve elde edilen HA tozları iki-boyutlu (2-D) film ve üç-boyutlu (3-D) sünger yapılar üretmek için kitosan (C) ve jelatin (G) karışımlarına eklenmiştir. Sentezlenen HA yapılarının özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM), X-Işını Kırılımı (XRD) ve Fourier Dönüşümlü Kızılıötesi-Azaltılmış Toplam Reflektans spektroskopisi (FTIR-ATR) ile incelenmiş, tüm hazırlanan 2-D ve 3-D polimer-HA kompozit yapılarının fiziko kimyasal özellikleri, SEM, FTIR-ATR, DSC, temas açısı ve yüzey enerji ölçümleri, şişme deneyleri ile ve mekanik yönden, gerilme ve basma testleri ile incelenmiştir. Örneklerin hücrelere karşı ilgisi, *in vitro* çalışmalarında Saos-2 hücreleri kullanılarak belirlenmiştir. Destek yapılar üzerindeki hücre yapışmasını ve çoğalmasını gözlemlemek için MTS ölçümleri yapılmıştır. Hücrelerin destek yapılar üzerindeki yapışma ve yayılma morfolojileri konfokal, floresan ve taramalı elektron mikroskopları ile incelenmiştir. XRD ve FTIR sonuçları saf hidroksiapatit sentezlendiğini kanıtlamıştır. Mekanik test verileri ve hücre etkileşimleri 2-D ve 3-D kitosan-jelatin/hidroksiapatit yapıların sert doku mühendisliğinde kullanıma uygun özelliklere sahip olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kitosan, Jelatin, Hidroksiapatit, Biyoyumluluk, Doku mühendisliği



## ABSTRACT

Tissue engineering involves to develop “tissue-like” structures by growing specific cells on an artificial extracellular matrix (ECM) type scaffold and replace them in to the body in order to support, if necessary replace, and to restore the function of damaged and failed tissues and organs. Many polymeric structures were developed as supports to be used in damaged parts of the tissue, and natural polymers have great attention among all. In the natural polymers, chitosan, which is a linear amino polysaccharide, is intensely studied and used as biomedical engineering material since it provides convenient physiological environment in biological media during tissue regeneration. To improve chitosan’s mechanical and biological properties, it can be blended with other polymers or other ingredients. In this study, chitosan was used with gelatin; and an inorganic calcium phosphate ceramic, hydroxyapatite, was incorporated to improve the mechanical strength. For this reason, two types of hydroxyapatite (HA) were synthesized either as-precipitated non-sintered (nsHA) or highly crystalline sintered (sHA) and blended with mixtures of chitosan (C) and gelatin (G) to produce two dimensional (2-D) film and three dimensional (3-D) sponge structures. The synthesized HA structures were examined with scanning electron microscopy (SEM), X-Ray Diffraction (XRD), and Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance spectrometer (FTIR-ATR); and physico-chemical properties of the prepared 2-D and 3-D polymer-HA composite structures were evaluated by SEM, FTIR-ATR, differential scanning calorimetry (DSC), contact angle and surface free energy measurements, swelling tests and for mechanical properties by tensile and compression tests. Cell affinities of the prepared samples were determined by *in vitro* tests using Saos-2 cells. MTS assays were achieved to study cell attachment and proliferation on scaffolds. Attachment and spreading morphologies of the cells on the scaffolds were determined by several methods such as confocal, fluorescence and scanning electron microscopy. XRD and FTIR results confirmed the purity of the synthesized hydroxyapatite. Mechanical test and cell affinity results showed that 2-D and 3-D chitosan-gelatin/hydroxyapatite constructs have proper properties to be used in bone tissue engineering applications.

**Keywords:** Chitosan, Gelatin, Hydroxyapatite, Biocompatibility, Tissue Engineering

## 1 GİRİŞ

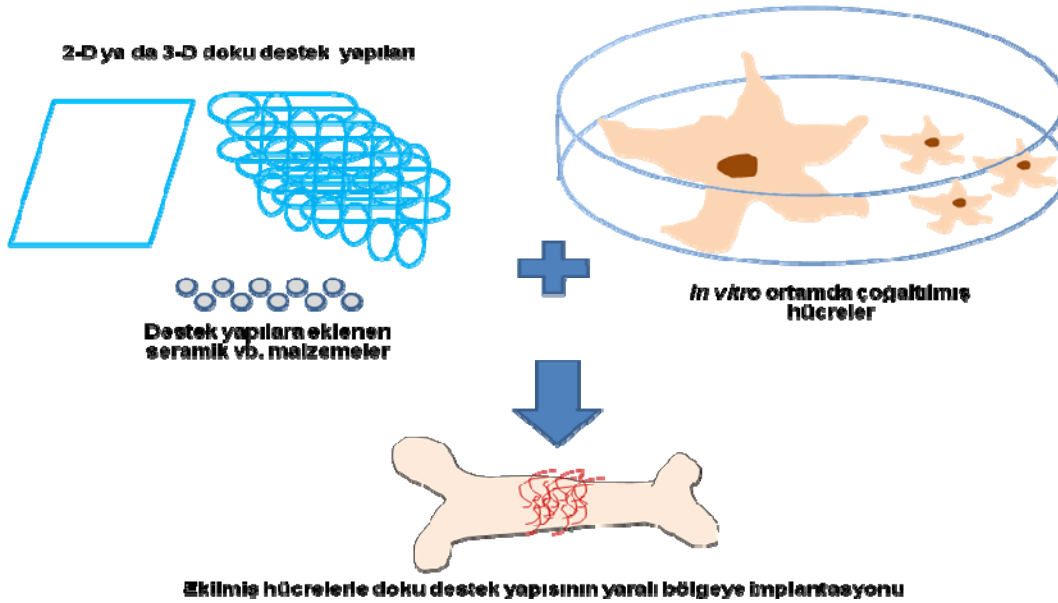
Doku mühendisliği, kimya, biyoloji, malzeme mühendisliği, tıp gibi dalları barındıran disiplinlerarası bir bilim koludur ve doğal canlı dokuyu taklit edebilen sistemler yardımıyla hasarlı doku bölgesinde doku iyileşmesinin sağlanmasını hedefler. Son yıllarda doku mühendisliği alanında yapılan araştırmaların artmasının ana nedenleri, vücut ile biyouyumluluğu yüksek, biyobozunur ve biyoemilimli olduğu için zamanla doğal doku tarafından yeri alınabilen, toksik etkisi olmayan biyomalzemelerin sentezlenmesi ve bu malzemelerin hücre ile etkileşiminin kontrol edilebiliyor olmasıdır. Bu nedenlerle, damar dokusu, kalp kapakçığı, sinir dokusu, kırık ve kemik dokusu gibi birçok farklı doku tipi değişik doku mühendisliği yaklaşımlarıyla laboratuvarlarda yapılabilir hale gelmiştir. Yapılan araştırmalara göre hastalık veya kaza sonucu zarar görmüş bir organın fonksiyonunu yerine getirememesi nedeniyle yeni organ nakli için bekleyen hastaların yılda yaklaşık 8000 tanesi organ beklerken hayatını kaybetmektedir. Bu nedenlerle, dokunun kendini yenileyebilmesi için gerekli malzeme ve sistemleri hazırlama stratejisine dayalı bir bilim dalı olan doku mühendisliği alanı gelişmeye devam etmektedir. Trafik kazalarının çok fazla olduğu ülkemizde, kaza sonucu kırılmış kemikleri veya hasarlı dokuları olan çok fazla hasta bulunmaktadır. İşte bu nedenlerle ülkemizde de özellikle gerek yumuşak doku gerekse sert dokuya yönelik doku mühendisliği araştırmaları hızla artmaktadır.

Bu çalışma kitosan-jelatin/hidroksiapatit doku destek yapılarının sert doku mühendisliği uygulamalarına yönelik iki-boyutlu ve üç-boyutlu formlarda hazırlanmasına ve karakterizasyonuna odaklanmıştır. Bu amaçla, biri polipeptit (jelatin) ve diğeri polisakkarit (kitosan) olan iki doğal polimer seçilmiş ve kemik oluşumunu aktive edecek yönde biyoaktif bir seramik olan hidroksiapatit ile kompozit hazırlanması amaçlanmıştır. Çalışmada sinterlenmiş ve sinterlenmemiş olmak üzere iki farklı hidroksiapatit (HA) sentezlenmiş ve kullanılmıştır. HA tipinin ve kitosan-jelatin oranlarının hazırlanan iki-boyutlu ve üç-boyutlu yapılar üzerindeki etkileri, fiziksel ve kimyasal yapılarının yanı sıra mekanik analizler ve hücre testleri ile incelenmiştir ve optimize edilmiştir.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Sert Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, canlı hücrelerle yüklenmiş ya da hücre eklenmemiş destek malzemeleri kullanarak doğal doku ortamını taklit etmeyi ve hasarlı dokuları onarmayı amaçlayan ve özellikle son yıllarda gelişmekte olan bir bilim dalıdır. Doku transplantasyonu veya organ nakli gibi tedavi yöntemlerinde karşılaşılan en büyük problemler, verici bulmadaki zorluk ve bulunsa bile vericiden alınan organın veya dokunun hastanın bağışıklık sistemi tarafından reddedilmesidir. Dolayısıyla, doku veya organları laboratuvarlarda oluşturabilmek veya en azından destek olabilecek malzemeleri hazırlayabilmek amacına dayanan doku mühendisliği alanı, temel bilimler, mühendislik ve tıp alanlarını içine alan disiplinlerarası bir çalışma alanı olarak büyük önem kazanmıştır ve bu alanda yapılan araştırmalar her geçen gün artmaktadır. Doku mühendisliğinin ana elemanlarını; polimerik doku destekleri, hücreler (LANGER, 2000) ve gerekliyse büyüme faktörleri gibi aktif ajan moleküller oluşturmaktadır. Şekil 1, hücre eklenmiş doku desteklerinin hazırlanmasını ve hastaya uygulanmasını şematik olarak göstermektedir.



Şekil 1. Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan elemanlar

Doku mühendisliği amaçlı kullanılan polimerik destek yapıların vücut içerisinde belli süre içinde bozunması ve bu bozunma sonrası ortaya çıkan ürünlerin vücuda herhangi bir zarar vermemesi, toksik etki göstermemesi gerekmektedir. Polimerik yapıya ekilecek hücre tipleri ve büyüme faktörleri, uygulanacak doku bölgelerine göre çeşitlilik göstermektedir. Doku mühendisliğine ait ana elemanların özellikleri ilerleyen bölümlerde açıklanmıştır.

İnsan bedenindeki her organ tipi farklı özellik gösterdiğinden doku mühendisliği çalışmaları da zamanla üzerinde çalışıldığı organ ya da doku tiplerine göre isimlendirilmeye başlanmıştır. Örneğin kardiyak doku mühendisliği, sinir doku mühendisliği ve kemik doku mühendisliği bunlardan bazılarıdır.

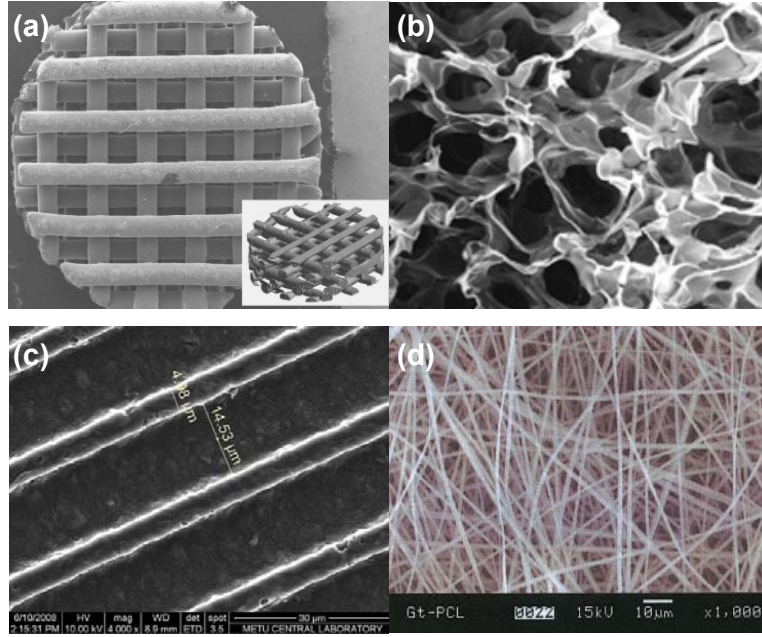
Kemik iyileşmesi diğer yumuşak dokulara göre daha zor olduğu, ancak hücre tipi olarak daha basit olduğu için, kemik ve kırıkta doku mühendisliği çalışmaları en yoğun araştırma yürütülen dokular olmuştur. Bu çalışma da, kemik tedavilerine yönelik malzemeler geliştirmek için sert doku mühendisliği üzerine odaklanmıştır. 2006 yılına ait araştırma sonuçlarına göre dünyada 1.5 milyon insan kemiğe bağlı hastalıklardan şikayetçi olmuştur (WHITE, 2006). Kemikteki sert doku iki farklı yapıya sahiptir; gözenekli süngerimsi kemik yapısı ve koruyucu katmanlardan oluşan sert kemik yapısı. Kemik dokusu aynı zamanda iki farklı faz içerir; kemiğe çekme gücü veren, kolajen ve glikozaminoglikanlardan meydana gelen organik kısım; ve yüksek sıkışma gücü sağlayan hidroksiapatit benzeri mineraller içeren inorganik kısım. Bu iki fazın kombinasyonu kemiğe oldukça gelişmiş mekanik özelliklerin yanı sıra taklit edilmesi zor bir yapı kazandırır. Yaşayan kemik dokusu dinamik bir doku ortamına sahiptir ve kemiğin iyileşmesi kemik depozisyonu, rezorpsiyonu ve kemik oluşumu ana aşamalarından oluşur. Farklı hormonal ve patolojik yapıların da etkisiyle yeni kemik oluşumu gerçekleşir. İyileşme sürecine bu kadar farklı faktörün etki etmesi doku mühendisliği malzemelerinin tasarımını iyice karmaşık bir hale getirmektedir. Bazı zorlukları olmasına karşın, kemik kırıklarının 6 ay içerisinde tedavisini sağlayan bazı doku mühendisliği malzemelerinin klinik uygulamaları raporlanmıştır (QUARTO, 2001). Sert doku mühendisliği uygulamalarının başarılı sonuç vermesi, ana elemanlarının doğru seçimine ve özelliklerine bağlıdır. Bu nedenle, ilerleyen bölümler sert doku mühendisliğine ait elemanların özellikleri üzerine odaklanmıştır.

## 2.2 Doku Destek Malzemeleri

Genellikle polimerlerden ve kompozitlerden oldukça fazla gözenekli yapıda hazırlanan iki-boyutlu ve üç-boyutlu doku desteklerinin fonksiyonu, öncelikle hücre yapışması ve sonrasında hücre çoğalması için ihtiyaç duyulan uygun ortam şartlarını sağlamaktadır. Doku mühendisliği yaklaşımlarında, zarar görmüş doku bölgesindeki iyileşmenin artması için kullanılan doku destek malzemeleri, hazırlandığı şekliyle yalnızca destek olarak kullanıldığı gibi, hücrelerle ve aktif moleküllerle aktiveleştirildikten sonra da kullanılabilir. Malzemelerin vücut içine yerleşimi sonrasında, vücut ortamının ve enzimlerin etkisiyle doku desteğinin bozunması, bazı bozunma ürünlerinin ortaya çıkması ve bu kimyasalların vücut içinde allerjik ve kanserojenik reaksiyonlara, enkapsülasyon ya da bağışıklık sistemi tepkilerine yol açması gibi riskler bulunmaktadır. Başarılı bir doku mühendisliği uygulaması için bu risklerin ortadan kalkması gerekmektedir. Bu amaçla, doku destek malzemeleri seçilirken doğal dokuya hem biyolojik açıdan hem de kimyasal açıdan benzerliği yüksek olan malzemeler seçilmeye çalışılır. Biyouyumluluk özellikleri gösteren ve vücut içinde hidroliz veya enzimatik etkilerle bozulan polimerik yapılar laboratuvarlarda sentezlenmektedir. Ayrıca, özellikle doğal olmaları, kimyasal yapılarının biyolojik ortama kolay uyum sağlaması, kolay bozunabilmeleri ve bozunma ürünlerinin de toksik etki göstermemesi açısından doğal polimerler, biyomedikal mühendisliği uygulamalarında büyük önem taşımaktadır.

Malzemelerin kimyasal yapılarının yanı sıra, fiziksel şekilleri, mekanik güçleri ve termal dayanımları da, biyouyumluluk açısından önemli parametrelerdir. Ayrıca hücrelerin yapışabilmesi ve rahatça çoğalabilmesi açısından malzemenin yüzey alanı ve gözenekliliği de önemli parametrelerdendir. Malzemelerin hazırlanma koşulları fiziksel özelliklerini, şekillerini ve gözeneklilik boyutlarını etkilemektedir. Literatürde gerek süngerimsi, gerek lifsi ve gerekse desenli 2-D ve 3-D çok değişik fiziksel formda doku desteği hazırlama yöntemi bulunmaktadır. Bunlardan bazıları şu şekilde sınıflandırılabilir: çözücü uçurma, dondurma-kurutma, elektro-eğirme, fiber bağlama, hızlı prototip geliştirme, mikro desenleme vb. Farklı yöntemlerle hazırlanmış doku desteklerinin nasıl farklı görünümlere sahip olduğu Şekil 2'de görülebilir.

Bu çalışmada, biyobozunur özelliklere sahip 2-D film doku desteklerinin hazırlanışı sırasında çözücü uçurma yöntemi kullanılırken, 3-D sünger yapıları hazırlamak için dondurma-kurutma yöntemi kullanılmıştır.

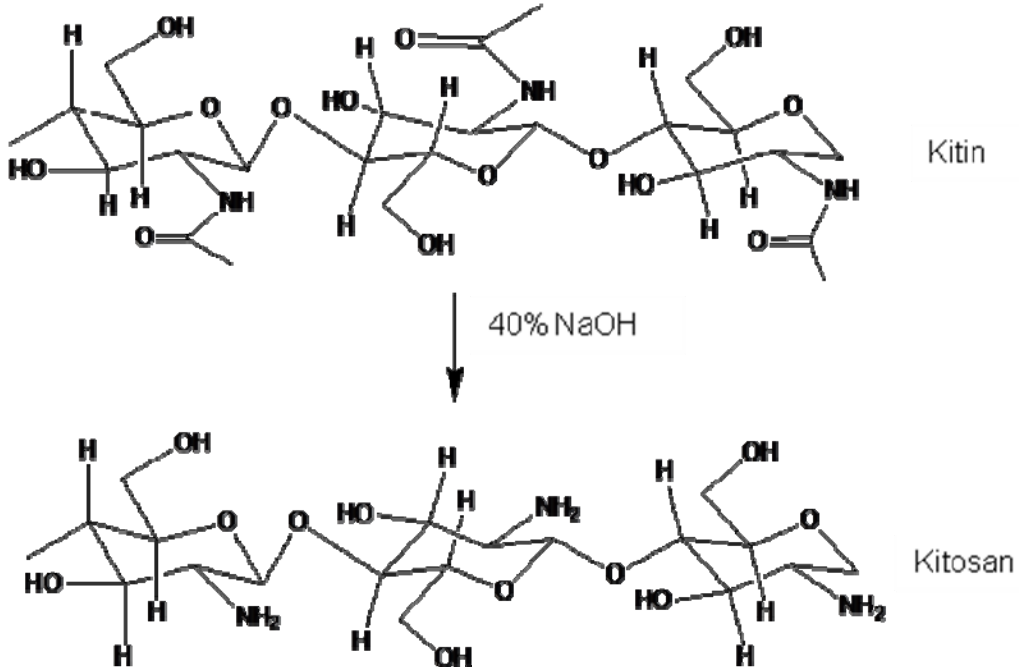


**Şekil 2. Doku desteklerinin taramalı elektron mikroskobu mikrografları. (a) Polikaprolakton (PCL) bazlı hızlı prototip geliştirme yöntemi ile hazırlanmış 3-D destek yapı, (b) jelatin bazlı dondurma-kurutma yöntemi ile hazırlanmış destek yapı, (c) mikro desenli polimerik filmler, (d) elektro-eğirme yöntemi ile elde edilmiş jelatin-PCL destek yapı**

Doku desteklerinin hazırlanması için çok farklı ham madde kaynağı bulunmaktadır. Bu kaynaklar; biyobozunur doğal polimerler olabildiği gibi laboratuvarında geliştirilen ve yine biyobozunur özelliklere sahip sentetik polimerler, seramikler ve bunların ikili veya üçlü kullanımları ile oluşturulan kompozitlerdir. Bu malzemeler, hücre-dışı matris olarak, mikroparçacık, hidrojel, fiber, 3-D gözenekli veya 2-D film formlarında hazırlanabilirler. Doku mühendisliği alanında yapılan yoğun çalışmalara rağmen, halen bu alanda çok gelişmiş biyoyumluluk, biyobozunurluk ve mekanik özelliklere sahip doku destek malzemelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllardaki çalışmalarda doğal doku ortamındaki elemanlara benzerlikleri nedeniyle kitosan ve jelatin gibi doğal polimerler hem yumuşak doku mühendisliği için, hem de sert doku mühendisliği uygulamalarında çok fazla kullanılmaya başlanmıştır. Hidroksiapatit gibi seramikler de kemiğin inorganik bölümünü taklit edebildiği için ve doku desteklerinin mekanik özelliklerini geliştirebildiği için sık kullanılan bir malzeme haline gelmiştir. Bu doğal polimerler ile hidroksiapatit seramiği ve bunlardan meydana gelen biyokompozitler ileriki bölümlerde daha detaylı olarak açıklanacaktır.

### 2.2.1 Kitosan

Yeryüzünde selülozdan sonra en yaygın bulunan polisakkaritlerden olan kitin, mantarların hücre duvarında ve yengeçlerin dış kabuğunda bulunmakta, ve yapısında bulunan  $\text{CaCO}_3$ 'ün çözülmesi ve proteinlerin ayrılmasıyla üretilmektedir. Kitinin deasetilasyonu ile kitosan üretilmektedir. Kitosan üretmek için, kitin  $120^\circ\text{C}$ 'de 1 ile 3 saat süresince NaOH ile yıkama işleminden geçirilir. Kitosan,  $\beta$ -(1-4) bağlı D-glukozamin çöktelleri ile N-asetil-glukozamin gruplarının oluşmasıyla elde edilmiş olur. Kitosanın (Şekil 3) deasetilasyon değeri %30 ile %90 arasında değişebilmekte, moleküler ağırlığı ise 300 den 1000 kD'a kadar değişiklik gösterebilmektedir (MADIHALLY, 1999).



Şekil 3. Kitinden deasetilasyon ile kitosan sentezi

Kitosanın deasetilasyonu, kitinin asetil gruplarının, birincil alifatik amino gruplarına değişmesi anlamına gelmektedir. Kitosan N-asetilasyon ve Schiff reaksiyonları ile diğer polimerler ile etkileşebilmektedir (KUMAR, 2000). Kitosanın *in vivo* bozunması lizozom enzimleri ile gerçekleşmektedir ve bozunma hızı ters orantılı olarak kitosanın deasetilasyon ve kristallik derecesine (DI MARTINO, 2005), ve hazırlama çözeltisinin pH değerine bağlıdır (DAVIES, 1969).

Kitosan suda ve pH değeri 7'den yüksek diğer çözeltilerde çözünmemektedir fakat, glukozamin üzerindeki protonlanmış serbest amino gruplarının yardımıyla asidik ortamda çözülebilir. Kitosan için en yaygın kullanılan çözücü, zayıf bir asit olan asetik asittir (DORNISH, 2001). Kitosan ile yapılan çalışmalar, kitosanın sert dokularda osteogenesisi (KLOKKEVOLD, 1996) ve osteoiletkenliği (TANG, 2008) geliştirdiğini, ve yumuşak dokularda yara iyileştirme yeteneği (ISHIHARA, 2002) olduğunu göstermektedir. Ayrıca literatürde, kitosanın hemostatik (ONG, 2008), yağ bağlayıcı (GADES, 2005), yara iyileştirici (HIROSHI, 2001), biyoyapıştırıcı (GEORGE, 2006), ve antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu (ZIVANOVIC, 2007; SARASAM, 2008), ve biyolojik olarak yenilenebilir (KHOR, 2003) olduğu belirtilmektedir. Kitosan, toksik olmayan metabolitleri ve reaktif fonksiyonel gruplarının ilaç yapılarına kolayca bağlanması nedeniyle (KAS, 1997), pek çok doku mühendisliği uygulamasında kullanılmaktadır. Uygulama alanlarına örnek olarak, gen taşıyıcı sistemler (DANG, 2006), biyoaktif ajanların kontrollü salımı için cihazlar (YILGOR, 2009), ilaç salımı yapan mikro ve nano tanecikler (AGNIHOTRI, 2004), virüs ve bakteri çeşitlerine karşı antimikrobiyal ajanlar (RABEA, 2003), kemik çimentolarının geliştirilmesi için katkı malzemeleri (ROCHET, 2009), hücre hareketini yönlendirici yüzeyler (KIZILTAY, 2008) ve yumuşak doku ya da kıkırdak doku mühendisliği için doku destek malzemeleri (WANG, 2005; TIğLI, 2009) verilebilir.

### **2.2.2 Jelatin**

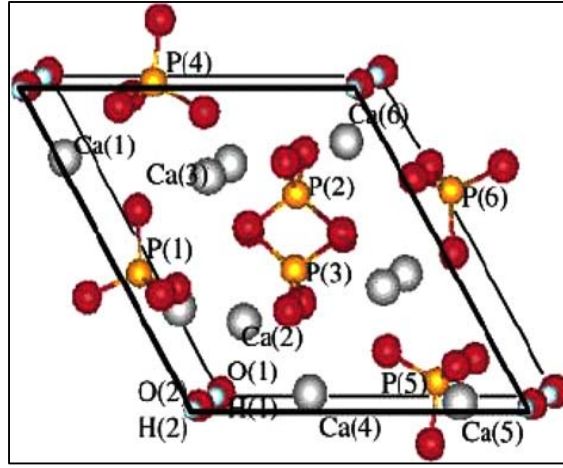
Jelatin, kolajen proteinlerinin hidrolitik ayrılması ile üretilen bir polipeptittir (KUIJPERS, 1999); insan kemik ve derisi ile hayvan hücredişi matrisin en temel bileşenidir (BUCKWALTER, 2005). Peptit bağları ile bir araya gelmiş 19 amino asitten oluşmaktadır. Alanin, arjinin, glutamik asit içermesine karşın, jelatinin bileşenindeki en temel amino asit glisin (%30) ve prolin/hidroksiprolin (%25) dir ve arginin-glisin-aspartik asit (RGD)-benzeri grupları içermesi, ve bu grupların da hücre çoğalmasında aktif rol oynaması, jelatinin doku mühendisliği alanında değerli bir malzeme haline getirmiştir. Kolajen birçok doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmakta olan bir doku destek malzemesidir ancak potansiyel patojen iletimi, bağışıklık sistemince reddedilmesi, kısıtlı elde edilebilirliği, yetersiz mekanik özellikleri ve zayıf biyoyumluluk kontrolü gibi dezavantajları bulunmaktadır (MA, 2004). Jelatin ise farklı kaynaklardan elde edilebilmektedir; örneğin balık, sığır



(CHOMARAT, 1994) veya domuz derisi (HUANG, 2005) bunlardan bazılarıdır. Jelatin suda çözünebilen bir yapıdır ve *in vivo* ortamda çok hızlı bozunmaktadır (ROHANIZADEH, 2008). Bu yüzden; glutaraldehid (MARTUCCIA, 2006), genipin (BIGI, 2002) veya karbodiimidler (EVERAERTS, 2008) gibi çapraz bağlayıcı ajanlar jelatin yapısının dayanımını arttırmak ve uygulama alanındaki varlığını sürdürülebilmesini sağlamak amacı ile kullanılmaktadır. Jelatin birçok farklı proteolitik enzim ile hidrolize edilebilmekte ve içeriğinde bulunan amino asit veya peptid bileşenleri ayrıştırılabilmektedir. Jelatin temelli biyomalzemelerin, ilaç taşıyıcı olarak biyoaktif ajanların kontrollü salımları için hazırlanan mikrokürelerin yapımında kullanıldığı bilinmektedir (MUVAFFAK, 2004, DEFAIL, 2006). Diğer taraftan ise nano-hidroksiapatit tanecikleri ile modifiye edilmiş jelatin temelli yapıların osteoblast uyarımları gösterdiği belirtilmiştir (KIM, 2005). Literatürde jelatin temelli doku mühendisliği yapılarına sıklıkla rastlanmaktadır. Örneğin; yapay deri malzemeleri (KAWAI, 2000), kardiyak doku mühendisliği için doku destek yapıları (ROSELLINI, 2009) ve yara örtüsü malzemeleri (ULUBAYRAM, 2001) jelatin kullanılarak yapılan çalışmalardan bazılarıdır.

### **2.2.3 Hidroksiapatit**

Hidroksiapatit (HA) yapısı temel olarak kalsiyum, fosfat ve hidroksi grupları içermekte ve kimyasal formülü,  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  olarak verilmektedir. Elementlerin düzenli yerleşimi, HA'nın sağlam kristal yapısını oluşturur (Şekil 4). HA, kemik dokusunun inorganik bileşenine oldukça benzer bir kimyasal ve kristalografik yapıya sahiptir (MANAFI, 2008); bu sebeple de kemik doku mühendisliği için dikkat çekici bir uygulama alanı yaratmaktadır. Kemik doku mühendisliği amaçlı olarak kalsiyum ve fosfat içeren farklı yapılar kullanılmakla birlikte, kemik yapısı içinde bulunduğu için HA en yaygın çalışılan kalsiyum tuzu olmuştur. HA'in sentezlenmesi için kuru ve ıslak yöntem (çöktürme), hidrotermal yöntem ve karışık malzeme çökeltmesi gibi farklı metotlar kullanılmaktadır (MAMORU, 2003).



**Şekil 4. Hidroksiapatitin kimyasal yapısı (Rakamlar atomların sayısını gösterir.)**

Isı ile muamele yani sinterleme işleminin HA'in kristalliğini arttırdığı ve bu sebeple biyobozunurluk hızını azalttığı bilinmektedir. Örneğin ticari bir ürün olan, sinterlenmemiş HA temelli kemik yedek malzemesi olan Nanobone® kullanıldığında, doku tarafından enkapsüle edilen sinterlenmiş HA taneciklerine göre daha iyi histolojik sonuçlar verdiği ve uygulama alanında doku damarlanması ve doku büyümesi gözlemlendiği rapor edilmiştir (ABSHAGEN, 2009). HA; kütsel bloklar, gözenekli bloklar ve granüler olarak üç farklı formda bulunmaktadır. Bunların yanı sıra, sentetik HA'in ayrışma hızı, temelde tipine ve tamponlanmış ve tamponlanmamış çözeltilerin konsantrasyonuna, çözeltinin pH'sına, çözeltinin doygunluk derecesine, katı/çözelti oranına, HA fazlarının kompozisyon ve kristalliğine bağlıdır (REZWANA, 2006). HA'nın osteoiletkenliği geliştirdiği rapor edildiği için HA üzerine yapılan çalışmalar ve HA'lı uygulamalar artmaktadır (WOODARD, 2007). Hidroksiapatit, kemik hasarlarında uygulanmak üzere otojen kemik parçaları için üretilen malzemeler olarak da kullanılmaktadır (BYRD, 1993).

Son dönemdeki birçok araştırmanın da gösterdiği üzere hidroksiapatit, polimerik doku destek yapılarının özelliklerinin geliştirilmesinde kullanılan bir biyoaktif seramik olmuştur. Kitosan çözeltisi içerisine katılan kalsiyum ve fosfat öncülerinin çözeltileri ile ve dondurma-kurutma yöntemi ile kitosan/nano-hidroksiapatit kompozit yapılar hazırlanmış, ve bu yapıların saf kitosan süngerlerine göre daha gelişmiş biyoaktiflik ve osteoblast hücre farklılaşması gösterdiği rapor edilmiştir (KONG, 2006).

### 2.3 Sert Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler

Hücre ekilmiş doku desteklerinin kullanıldığı yaklaşımlarda, yapıya hücre ekiminin nedeni, hücreleri doku desteği üzerinde *in vitro* ortamda çoğaltmak ve implantasyon sonrası *in vivo* ortamda hücre çoğalması ve hücre dönüşmesi aşamalarında hızlı doku oluşumunu sağlamak ve doku rejenerasyonunu arttırmaktır.

Hücreler; kök hücreler, osteoblast-benzeri hücreler, fibroblastlar gibi tipine göre çeşitlilik gösterirken, hastanın kendi bedeninden alınması (otograft), başka bir hastadan alınması (allograft) ve başka bir canlı tipinden alınması (zenograft) gibi kaynağına göre de farklılık göstermektedir.

Sert doku mühendisliği, ortopedik hastalıkların osteojenik hücre-bazlı terapi yöntemiyle iyileştirilmesi üzerine kuruludur (XIA, 2004). Başarılı bir sert doku mühendisliği için, öncü hücre farklılaşması ve hücre dışı matris oluşumu gereklidir (IGNATIUSA, 2005).

Osteoblast hücreleri kemik ortamında bulunan kemiğin modellemesinde görev alan ana hücre tipidir. Bu özelliklerinin yanı sıra hücre dışı matris sentezleyebilmeleri ve mineralizasyonu kontrol edebilme yetenekleri osteoblast hücrelerini sert doku mühendisliğinde en sık kullanılan hücre tipi haline getirmiştir.

En iyi bilinen hücre hatlarından biri olan osteosarkoma hücre hattı; Saos-2 hücre hattı, sert doku mühendisliği çalışmalarında hücre ekimi aşamasında sıklıkla kullanılmaktadır. Ölümsüzlük yetenekleri bu hücreler için doku mühendisliğinde bir avantaj sağlayabilmektedir.

### 2.4 Doku Desteklerinin Karakterizasyonu

Başarılı bir doku mühendisliği uygulamasında, doku desteklerinin kimyasal, fiziksel, termal, yüzey, mekanik vb gibi özellikleri, hücre-malzeme etkileşimi ve daha sonraki doku iyileşme aşamaları büyük önem taşımaktadır. İstenmeyen sonuçların ortaya çıkmasını engellemek için, doku mühendisliğinde kullanılmak üzere sentezlenen ve hazırlanan malzemenin tüm bahsedilen özellikleri ve hücre-malzeme etkileşimleri dikkatle incelenmelidir. Bu tür karakterizasyonlar için çok değişik ve çok etkin teknikler bulunmaktadır.

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi-Azaltılmış Toplam Reflektans (FTIR-ATR) spektroskopisi kimyasal yapının incelenmesinde başarılı ve iyi bilinen bir yöntemdir. Ayrıca, FTIR-ATR yöntemi sayesinde malzemenin kristalinite derecesi de faz

kompozisyonları da belirlenebilmektedir. X-ışını kırılımı tekniği, kristalin malzemelerin saflığını ve kompozisyonunu belirlemede kullanılacak etkin bir tekniktir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM), hazırlanan malzemelerin yüzeylerinin topografyası hakkında bilgi veren bir yöntemdir. Ayrıca hücre ile etkileşen yüzeylerde yapışan ve çoğalan hücre şekillerini ve hücre yoğunluğunu incelemek için de kullanılan bir tekniktir. Malzeme yüzeyinin hidrofilikliği, su temas açısı ve yüzey serbest enerjisi gibi yüzey özellikleri goniometre kullanılarak incelenebilir ve hesaplanabilir. Yeni dokunun oluşumu sürecinde yerleştirilen destek malzemesinin fizyolojik ortamdaki kararlılığının incelenmesinde şişme ve bozunma testleri gravimetrik ölçümler ile hesaplanabilir.

Sert doku mühendisliğine yönelik çalışmalarda en önemli malzeme testlerinden biri mekanik açıdan yeterliliğin gerilim-gerinim eğrileri bakılarak incelenmesidir. Bu amaçla genelde çekme ya da basma testleri uygulanmaktadır. Bu testler sayesinde yapının elastik modülüsü, maksimum çekme ya da basma gücü gibi değerleri elde edilmektedir.

Polimerik malzemeler hazırlanma ya da uygulama aşamalarında çevrenin sıcaklığından kolaylıkla etkilenebilmekte ve bazı kimyasal değişimlere uğrayabilmektedir. Bu nedenle malzemelerin adsorplanmış suyu buharlaştırma veya bozunma sıcaklıkları gibi termal özellikleri termogravimetrik analiz, diferansiyel taramalı kalorimetre gibi yöntemlerle incelenmelidir.

Biyouyumluluk; vücut tarafından canlı ve cansız yapılar arasındaki farklılık tanıdıktan sonra cansız malzemenin implante olduğu canlı sistem üzerindeki etkisi olarak tanımlanmaktadır (BLACK, 2006). Biyouyumluluğun temellerini oluşturan iki ana konu; malzemeye ait sitotoksitenin yokluğu ve malzemenin biyofonksiyonelliğinin varlığıdır. Doku mühendisliği amacıyla hazırlanan bir malzemenin biyouyumluluğunu incelemeye başlarken hücresel etkileşiminin incelenmesi ilk basamağı oluşturabilir. Bu amaçla, mikroskobik yöntemlerle hücrelerin malzeme üzerindeki morfolojileri ve MTS hücre çoğalması testleri ile malzeme üzerindeki hücre miktarının tayini incelenebilmektedir. Kontrol grupları ile yapılacak karşılaştırmalar sonucu elde edilecek sonuca bağlı olarak, malzemenin biyouyumlu olduğu veya toksik etki gösterdiği ve kullanılmaması gerektiği sonucuna varılır.

### 3 GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve kimyasalların alındığı firma isimleri Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1. Kimyasallar**

Kimyasallar	Firma Adı
Kitosan	Sigma-Aldrich (Germany).
Jelatin	J.T. Baker (Holland)
EDC	Sigma-Aldrich (Germany)
NHS	Sigma-Aldrich (Germany)
Asetik asit	Sigma-Aldrich (Germany)
Kalsiyum nitrat	Merck (Germany)
Diamonyum fosfat	Merck (Germany)
Siğir serum albumin	Fluka (ABD)
Dulbecco's Modifiye Eagle Vasat	Hyclone (ABD)
RPMI-1640	Hyclone (ABD)
Cenin siğir serumu	Hyclone (ABD)
Tripsin-EDTA	Sigma (ABD)
DAPI	Chemicon (ABD)

#### 3.2 Hidroksiapatit Sentezi

Hidroksiapatit sentezinde, kalsiyum nitrat ve diamonyum fosfat sulu çözeltileri kullanılmıştır. Bu çözeltiler belli oranlarda karıştırılmış ve oluşan çökelti filtre edilmiştir. Çökelek 80°C'de kurutulmuş ve elde edilen toz öğütülerek 'sinterlenmemiş hidroksiapatit' (nsHA) olarak isimlendirilmiştir. nsHA tozları 1000°C'de termal ısıya maruz bırakılarak 'sinterlenmiş hidroksiapatit' (sHA) elde edilmiştir.

Her iki HA tozu, kitosan-jelatin yapılarına eklenerek 2-D ve 3-D kompozit yapıları hazırlanmıştır.

### 3.3 Doku Destek Yapılarının Hazırlanması

Bu çalışmada 2-D film ve 3-D sünger kompozit yapılar hazırlanmıştır. Filmler, asetik asit içinde oluşturulan %2'lik kitosan çözeltisi ve su içinde hazırlanan % 2'lik jelatin çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Değişik hacim oranlarında (1-0, 3-1, 1-1, 1-3 ve 0-1) hazırlanan kitosan-jelatin karışımları, plastik petri kalıplara dökülerek kurutulmuştur. Kalıpların yanı sıra yüzey testlerinin yapılabilmesi için aynı örnekler cam mikroskop lamalarına da dökülmüş ve kurutulmuştur. Çapraz bağlama işlemi için belli oranda EDC/NHS çözeltisi PBS tampon çözeltisi (pH=5.5) içerisinde çözünmüş ve filmler belli süreyle oda sıcaklığında ve karanlıkta çapraz bağlayıcı çözeltisinde bekletilmiştir. Daha sonra, filmler 1M NaOH çözeltisi ile nötralize edilmiş ve ardından distile su ile yıkanmıştır.

Üç boyutlu doku destek yapıları, dondurma-kurutma tekniği ile sünger şeklinde hazırlanmıştır. Film yapımında kullanılan benzer kitosan-jelatin konsantrasyonlarındaki karışımlar kalıplara döküldükten sonra soğutulmuş ve dondurma-kurutma yöntemi ile kurutulmuş ve sünger yapılar elde edilmiştir. Örneklerin her yüzeyi tamamen kurutuluncaya kadar bu aşamalar devam etmiştir. Hazırlanan sünger yapılar çapraz bağlayıcı çözelti içinde kararlı hale getirilmiştir.

2-D film ve 3-D sünger formlarında hazırlanan yapılara, sinterlenmemiş ve sinterlenmiş hidroksiapatit tozları, karışımların ilk hazırlandığı anda eklenerek kompozit yapılar hazırlanmıştır.

### 3.4 Doku Destek Yapıların Karakterizasyonu

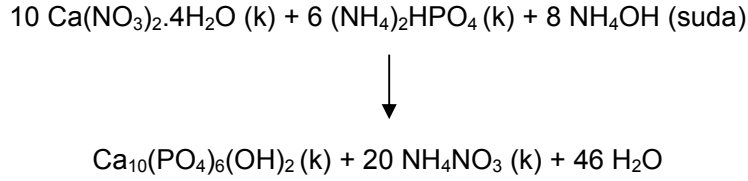
Hazırlanan iki ve üç boyutlu yapıların genel yapıları ve gözenek dağılımı SEM incelemeleri ile elde edilmiştir. Kimyasal kompozisyonları FTIR-ATR cihazıyla gözlenmiş, termal özellikleri DSC ile incelenmiştir. Hazırlanan 2-D yapıların mekanik özellikleri çekme testleri ile 3-D süngerlerinkiler ise basma testleri ile incelenmiştir. Yapıların yüzey enerjileri gonyometre cihazı ile hesaplanmıştır.

Yapıların hücre etkileşimleri insan osteosarkoma hücre hattı olan, 12 ve 15 pasaj numaralı, Saos-2 osteoblast hücreleri kullanılarak *in vitro* testlerde incelenmiştir. Hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> kuluçka aletinde RPMI besleme ortamı içerisinde, % 70'lik etanol ile 4°C'de 3 saat sterilize edilmiş örnekler üzerinde büyütülmüştür. Hücre çoğalmaları MTS test ile ölçülürken, hücrelerin yüzeylerdeki davranışları floresan, taramalı elektron ve konfokal mikroskopları ile incelenmiştir.

## 4 SONUÇLAR

### 4.1 Hidroksiapatit Sentezi

Hidroksiapatit tanecikleri ıslak metot yolu ile  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ve  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  sulu süspansiyonları kullanılarak sentezlenmiş ve çeşitli metotlar ile karakterizasyonları yapılmıştır. Sentezin kimyasal reaksiyonu Şekil 5'te gösterilmiştir.

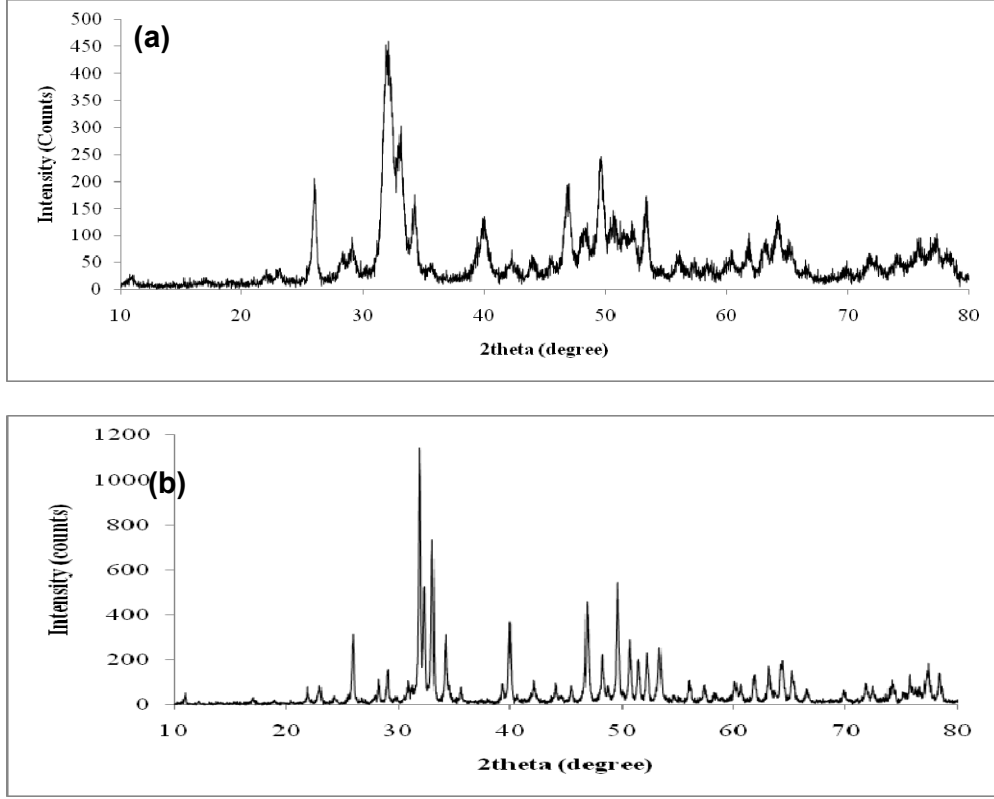


### Şekil 5 Hidroksiapatit sentezi

### 4.2 Hidroksiapatit Karakterizasyon Sonuçları

#### 4.2.1 X-Işını Kırılım Sonuçları

Hazırlanan hidroksiapatit kimyasal yapısı, X-Işını Kırılımı (XRD) ile incelenmiştir. Sinterlenmemiş HA (nsHA) ve sinterlenmiş HA (sHA) için XRD grafikleri Şekil 6'da verilmiştir. XRD grafiklerinde karbonata ait  $37^\circ$  ve  $54^\circ$  piklerinin olmayışı, yapının saf hidroksiapatit olduğunu ve literatürde de verildiği şekilde sentezlenme işleminin doğruluğunu göstermiştir (VIJAYALAKSHMI, 2006). Hidroksiapatitin apatit yapısından gelen karakteristik pikleri  $26.0^\circ$  ve  $31.9^\circ$  dolaylarında gözlenmiştir (ZHANG, 2005). Sinterlenmemiş hidroksiapatit grafiğinde, yapının amorf olması nedeniyle pikler geniş gözlemlenmiştir. Diğer taraftan, sinterlenmiş hidroksiapatit kristal yapısındadır, ve bu yapıdan dolayı pikler keskin olarak gözlemlenmiştir. Sinterlenmemiş ve sinterlenmiş olarak sentezlenen hidroksiapatit tozlarının her ikisinde de hidroksiapatite ait piklerin varlığı nedeniyle yapıların saf olduğu gözlemlenmiş ve kompozit hazırlanması sırasında belli oranlarda kitosan-jelatin polimer çözeltilerine eklenmişlerdir.

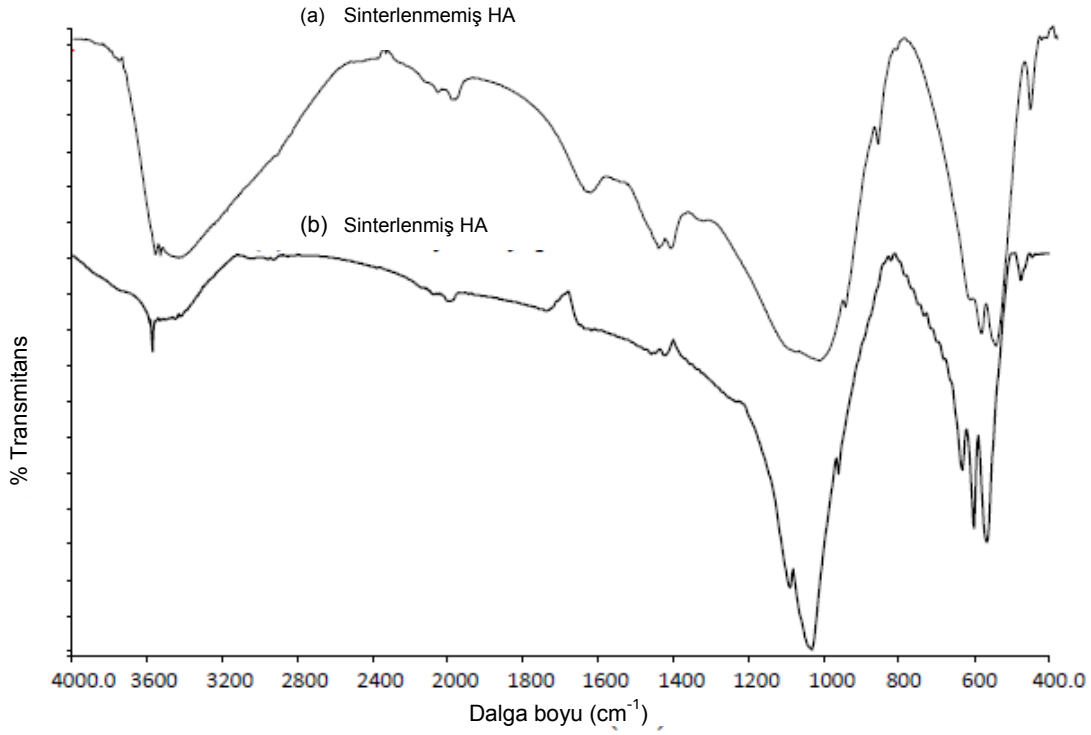


**Şekil 6. Hidroksiapatit için XRD grafikleri (a) Sinterlenmemiş hidroksiapatit, (b) sinterlenmiş hidroksiapatit**

#### **4.2.2 Fourier Dönüümlü Kızıl Ötesi- Hafifletilmiş Toplam Yansıtma (FTIR-ATR) Analizi**

Sinterlenmemiş hidroksiapatitin (nsHA) ve sinterlenmiş hidroksiapatitin (sHA), FTIR-ATR sonuçları Şekil 7 de verilmiştir. O-H gerilmesine ait geniş band  $3250\text{ cm}^{-1}$  ve  $3650\text{ cm}^{-1}$  arasında görülmektedir.  $\text{PO}_4^{3-}$  gerilme piki ise  $1030\text{ cm}^{-1}$  de gözlenmektedir.  $\text{PO}_4^{3-}$  eğilme titreşimlerini gösteren pikler  $602\text{ cm}^{-1}$  ve  $563\text{ cm}^{-1}$  de bulunmaktadır. nsHA örneğinde  $860\text{ cm}^{-1}$  de gözlenen küçük absorpsiyon piki simetrik P-O gerilme titreşimlerine aittir. Bu pik sinterleme sonucu kristal yapıların oluşması sonucu yok olmuştur.

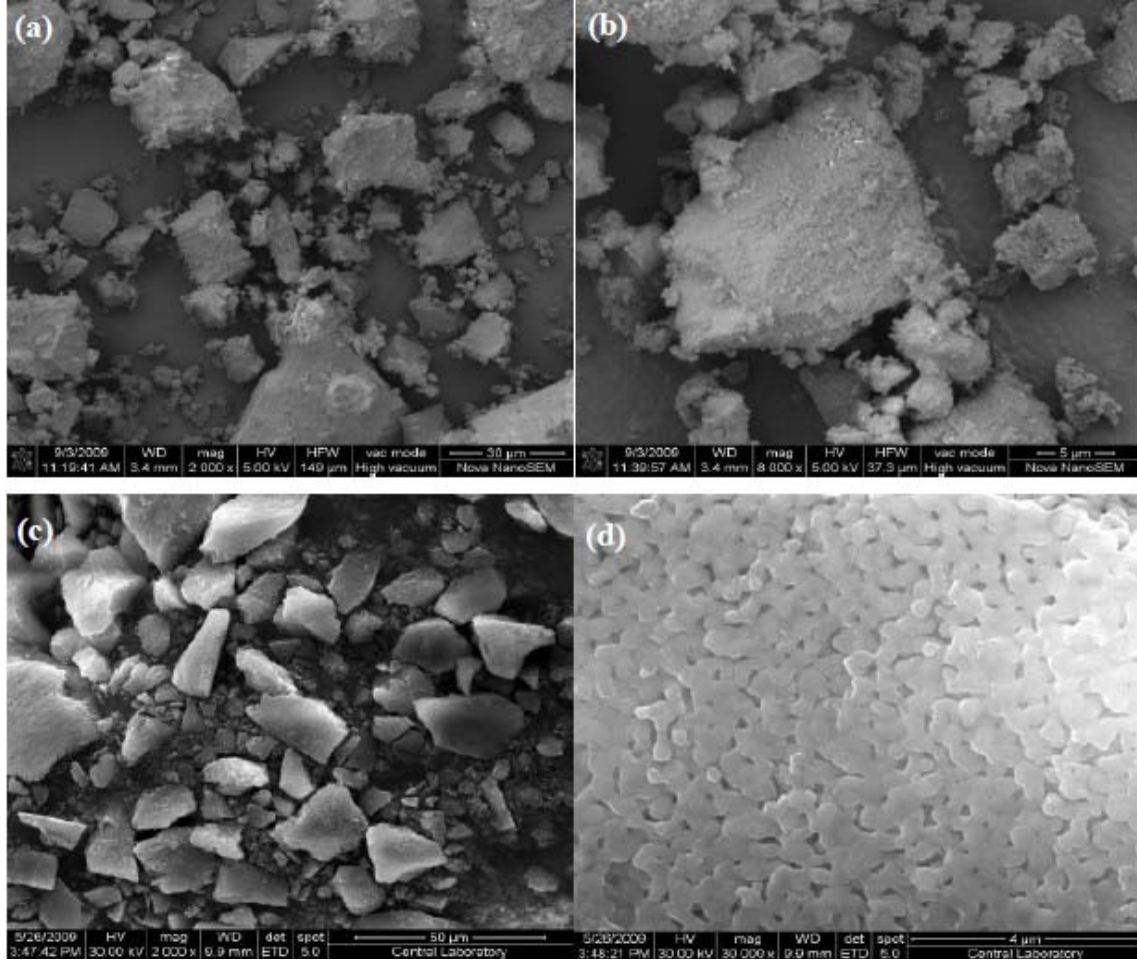




**Şekil 7. Hidroksiapatit FTIR-ATR spektrası**

#### **4.2.3 Hidroksiapatit Partikül Yapısı**

Hidroksiapatit tozlarının fiziksel yapıları, altın kaplama yapıldıktan sonra, Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile incelenmiştir. Elde edilen mikrograflar Şekil 8'de verilmiştir. Mikrograflardan da görüldüğü gibi; sinterlenmemiş parçacıklar büyük tanecikler (5-25  $\mu\text{m}$ ) üzerinde oluşan toz tanecikleri ( $\geq 1 \mu\text{m}$ ) halinde ve amorf kümeler halinde gözlenirken (Şekil 8 a-b), 1000°C ısı uygulamasına maruz kalarak sinterlenen hidroksiapatit tanecikleri keskin hatlı kristallerin (5-25  $\mu\text{m}$ ) oluşmasına neden olmuştur (Şekil 8 c) Bu taneciklerin herbiri 200-300 nm boyutlarında kristal yapıların birbiri içine kaynaşması ile oluşmuştur (Şekil 8 d).

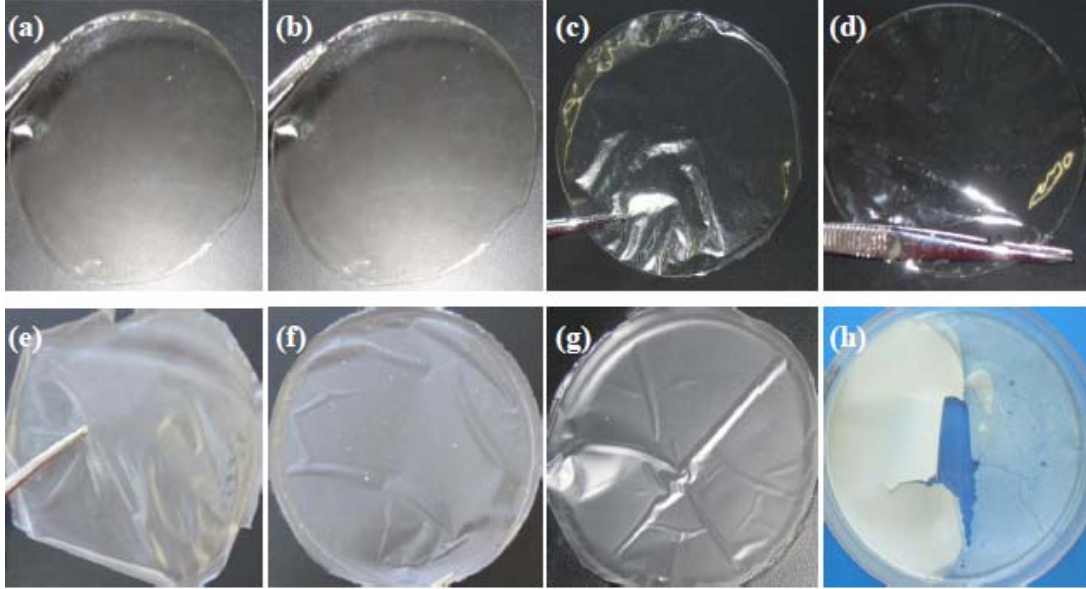


**Şekil 8. Hidroksiapatit SEM mikrografları (a, b) nsHA, (c, d) sHA**

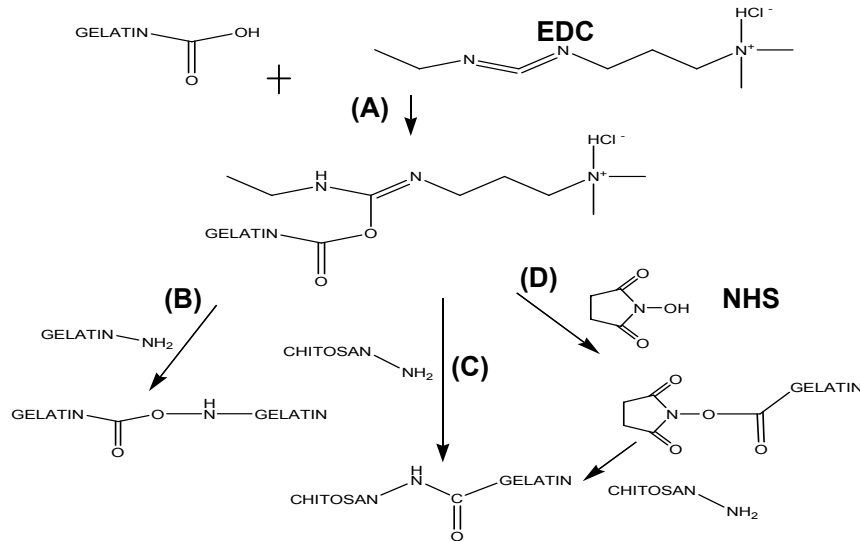
### 4.3 Film Hazırlanması

Kitosan-jelatin (C-G) filmler çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanmıştır. Beş farklı konsanstrasyonda (C, C-G:3-1, C-G:1-1, C-G:1-3 ve G; sayılar C ve G'nin hacim olarak oranlarını göstermektedir) hazırlanan filmlerden C-G:1-3 ele alınması zor ve çok kırılğan bir yapı oluşturduğu için daha ileriki deneylerde kullanılamamıştır. Diğer filmler, ince ve şeffaf bir görünüme sahip olmuştur (Şekil 9). Filmler çapraz bağlayıcı ile muamele edilip sabitleştirildikten sonra, xC, xC-G:3-1, xC-G:1-1 ve xG şeklinde isimlendirilmiştir (x çapraz bağlama işleminin uygulandığını göstermektedir). Sinterlenmemiş hidroksiapatit eklenmiş ve çapraz bağlanmış olan film yapılar ise xC/nsHA, xC-G:3-1/nsHA, xC-G:1-1/nsHA ve xG/nsHA şeklinde adlandırılmıştır (nsHA; sinterlenmemiş HA'nın yapıya eklendiğini tanımlamaktadır). Jelatin ve nsHA içeren çapraz bağlı örnekler (xG/nsHA filmi) çok kırılğan olduğu ve homojen olmayan

HA dağılımı gösterdiği için daha ileri deneylerde kullanılamamıştır (Şekil 9-h). Filmlerin çapraz bağlanma işlemleri EDC/NHS kullanılarak yapılmıştır ve bu işlemin kimyasal reaksiyonu Şekil 10 da verilmiştir. Bu reaksiyonlar sonucu amid bağları oluştuğu görülmüştür.



Şekil 9 Kompozit filmlerin fotoğrafları, (a)xC, (b)xC-G:3-1, (c)xC-G:1-1, (d)xG, (e)xC/nsHA, (f) xC-G:3-1/nsHA, (g) xC-G:1-1/nsHA, ve (h) xG/nsHA.



Şekil 10 Jelatinin aktifleşme ve bağlanma reaksiyonları, (A) jelatin karboksil grup aktivasyonu (B) aktif jelatinin jelatin ile reaksiyonu, (C) aktif jelatinin kitosan ile reaksiyonu, (D) aktif jelatinin NHS-aktifleştirmiş jelatin ile reaksiyonu.

## 4.4 Film Karakterizasyonu

### 4.4.1 Fourier Transform Kızılötesi- Azaltılmış Toplam Reflektans (FTIR-ATR) Analizi

Kitosan-jelatin (C-G), çapraz bağlanmış kitosan-jelatin (xC-G) ve kitosan-jelatin/sinterlenmemiş hidroksiapatit (xC-G/nsHA) filmlerinin spektralleri sırasıyla Şekil 11a, 11b ve 11c de verilmiştir.

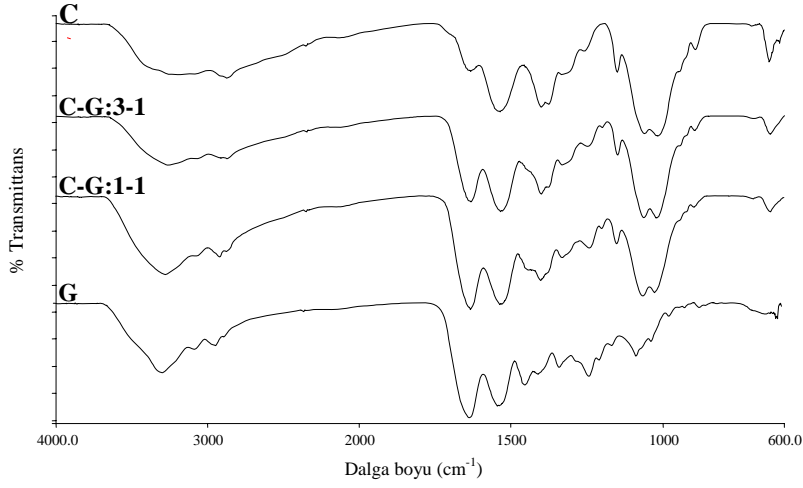
Kitosanın sakkarit yapısından ve antisimetrik C-O-C gerilmesinden kaynaklı karakteristik pikleri  $892\text{ cm}^{-1}$  ve  $1152\text{ cm}^{-1}$  de gözlenmiştir. Ayrıca  $1402\text{ cm}^{-1}$   $\text{CH}_2$  eğilme,  $2875\text{ cm}^{-1}$   $\text{CH}_2$  gerilme,  $1633\text{ cm}^{-1}$  de C=O gerilmesi (amid I) ve  $1537\text{ cm}^{-1}$  de amid II N-H eğilmesi (amid II) görülmektedir.

Jelatin spektrumunda yer alan  $3280\text{ cm}^{-1}$  deki geniş absorpsiyon bandı O-H ve N-H gerilmesinden gelmektedir.  $1537\text{ cm}^{-1}$  ve  $1629\text{ cm}^{-1}$  pikleri sırasıyla C-N ve N-H gerilme (amid II) bantlarına aittir.  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  de gözlenen güçlü absorpsiyonlar karbonil grupları gerilmesine aittir.

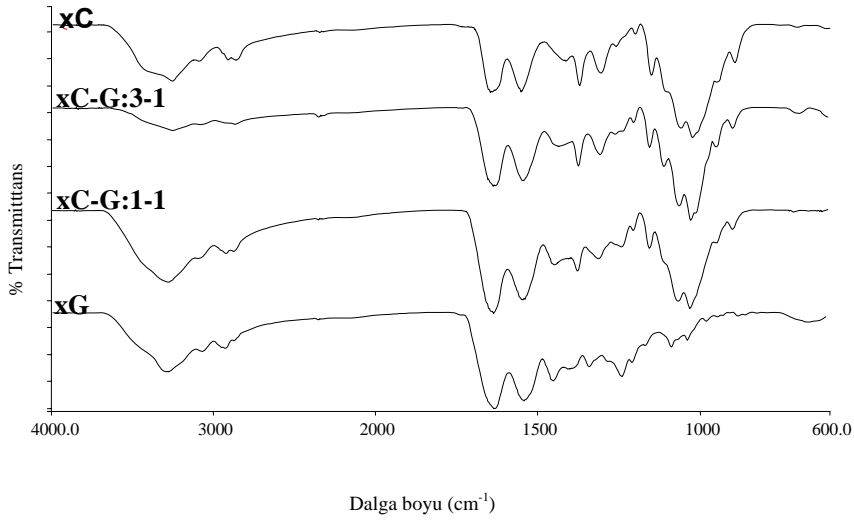
Karbonil miktarı jelatinde daha fazla olduğu için örneklerin içinde bulunan jelatin arttıkça,  $1629\text{ cm}^{-1}$  daki pik absorpsiyonunda artış göstermiştir. Diğer taraftan, sakkarit yapısına ait olan ve  $900\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$  bulunana absorpsiyon pikleri de, yapılarda kitosan miktarına paralel olarak artış göstermiştir.

Çapraz bağlı film yapılarında,  $650\text{ cm}^{-1}$  de görülen C-H ve  $1530\text{ cm}^{-1}$  gözlenen N-H bağlarının absorpsiyonlarında azalma gözlemlenmiştir.

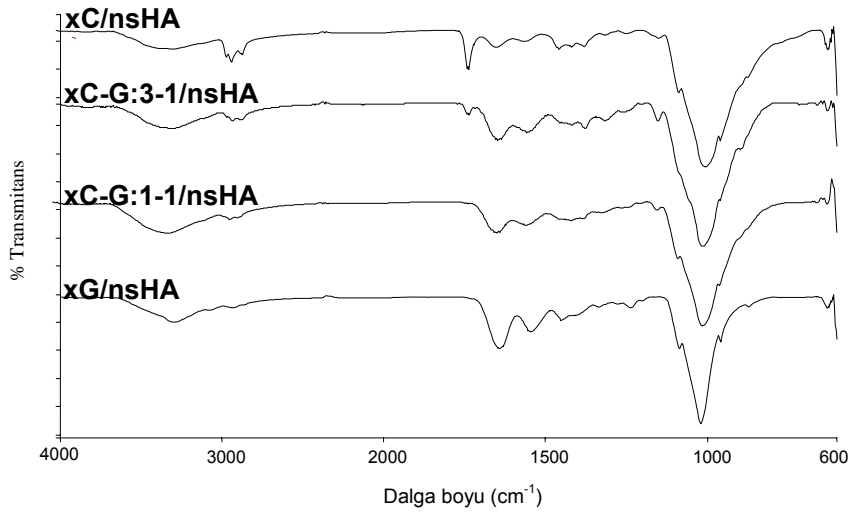
HA eklenmiş kompozit yapılar incelendiğinde, fosfat gruplarının asimetrik ve eğilme titreşimleri için sırasıyla  $1023\text{ cm}^{-1}$  ve  $603\text{ cm}^{-1}$  oluşan bağlar örneklerin hepsinde görülmüştür. Filmlerde,  $1630\text{ cm}^{-1}$  (C=O),  $1530\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_2$ ) ve  $1370\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  (N-H) de gözlenen pikler kompozit oluşumuyla azalmıştır. Bunun nedeni karboksil ve amin gruplarının hidroksiapatit yapısında bulunan  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{PO}_4^{-3}$  iyonlarıyla etkileşmesi sonucu olabilir. xC/nsHA yapılarında  $1732\text{ cm}^{-1}$  'de gözlenen bağına ait piklerin, jelatin miktarı arttıkça azaldığı ve yok olduğu gözlemlenmiştir. Kompozit filmlerinde görülen diğer bir fark, kitosanın C-O ve hidroksiapatitin  $\text{PO}_4^{-3}$   $1020\text{-}1080\text{ cm}^{-1}$  piklerindeki kaymadır.



(a)



(b)

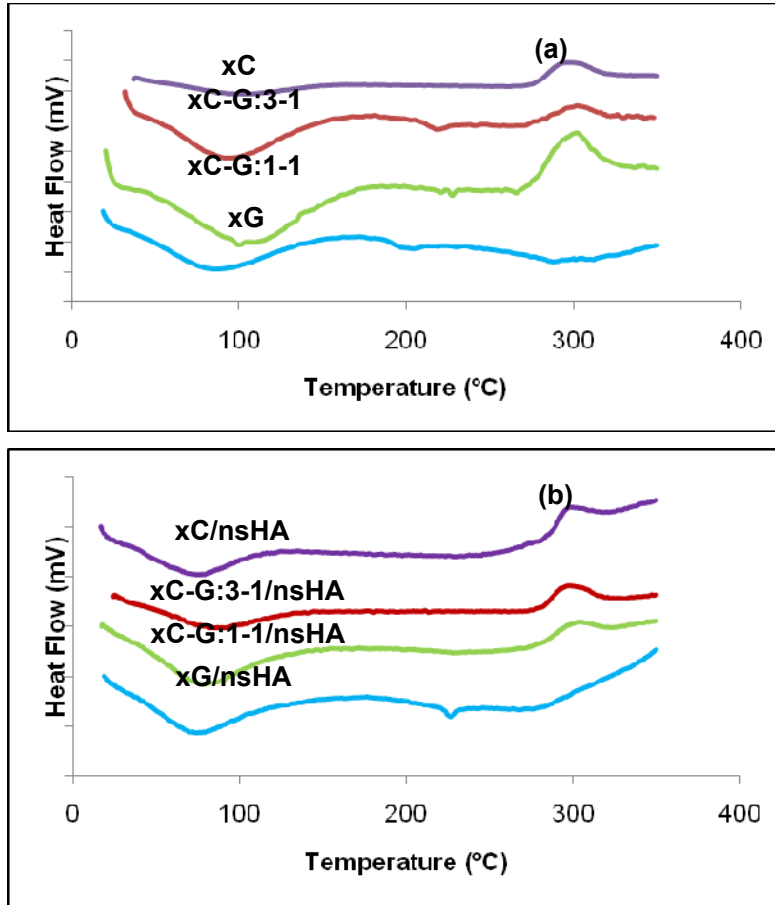


(c)

**Şekil 11** Filmlerin FTIR spektralleri, (a) çapraz bağlanmamış kitosan-jelatin, (b) çapraz bağlanmış kitosan-jelatin, (c) kitosan-jelatin/nsHA

#### 4.4.2 Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Sonuçları

Film yapıların termal özellikleri diferansiyel taramalı kalorimetri ölçümleri ile incelenmiştir. Çapraz bağlanmış kitosan-jelatin karışım (xC-G) ve bu aynı karışımlara sintirilenmemiş hidroksiapatit eklenmesi ile elde edilen kompozit (xC-G/nsHA) yapıların DSC grafikleri Şekil 12a ve 12b'de verilmiştir. DSC termografiklerine göre 50°C-150°C arasındaki endotermik pikler yapılardaki suyun buharlaşmasını ve 300°C dolaylarındaki ekzotermik pikler ise yapıların bozunduğunu, kırılan bazı bağlar yerine yeni oluşan bağların varlığını ve malzemede buharlaşan moleküllerin oluşumunu göstermektedir (WANG, 2008). Kitosan filmin bozunma sıcaklığının 250° dolaylarında başladığı görülmektedir. Kitosan, yarı-kristalin bir malzeme olduğu için camsı geçiş sıcaklığını gözlemek zordur. Çapraz bağlanmış saf jelatin filmlerde ise su buharlaşma piki heliks yapının geçişinden gelen denatüre olma piki ile çakışmaktadır (BIGI, 2002).



Şekil 12 Filmlerin DSC grafikleri, (a) çapraz bağlanmış kitosan-jelatin filmleri, (b) kitosan-jelatin/nsHA kompozit filmleri

Su buharlaşma sıcaklıkları ve bozunma sıcaklıkları Tablo 2'de verilmiştir. Tüm örneklerde su buharlaşma sıcaklıkları 74-100°C aralığında olmuştur. Çapraz bağlanmamış C, C-G:3-1 ve C-G:1-1 örneklerin bozunma sıcaklıkları, çapraz bağlanarak dayanımı artırılmış olan örneklere göre 10-15°C artış göstermiştir. Jelatine ise 241.40°C'den 288.34°C'ye 47°C'lik bir artış gözlenmiştir. nsHA eklenmesinin xC-G:3-1/nsHA hariç kompozit örneklerde bozunma sıcaklığını arttırdığı görülmektedir. Bu durumun nedeni hidroksiapatitin  $Ca^{2+}$  ve  $PO_4^{3-}$  grupları ile kitosan-jelatinin  $COO^-$  ve  $NH_3^+$  grupları arasındaki elektriksel yük etkileşimi olabilir.

**Tablo 2 DSC analiz sonuçlarından elde edilen su buharlaşması ve bozunma sıcaklıkları değerleri**

Örnek	Adsorplanmış Su Buharlaşma Sıcaklığı (°C)	Bozunma Sıcaklığı (°C)
C	97.22	281.49
C-G:3-1	98.27	290.51
C-G:1-1	97.54	288.34
G	88.33	241.40
xC	100.42	296.42
xC-G:3-1	94.08	301.43
xC-G:1-1	99.76	301.56
xG	86.20	288.06
xC/nsHA	74.69	297.71
xC-G:3-1/nsHA	85.77	296.5
xC-G:1-1/nsHA	78.77	303.94
xG/nsHA	74.65	226.35

#### 4.4.3 Filmlerin Mekanik Özellikleri

Filmlerin mekanik özelliklerinin incelenmesi için gerilme uzama testleri uygulanmıştır. Bunun için örnekler dikdörtgen şeklinde (10 mm x 40 mm) kesilmiştir. Elde edilen elastik modülüs (E), maksimum gerilme direnci (UTS) ve maksimum uzama (SAB) sonuçları Tablo 3 te verilmiştir. Filmlerin içindeki jelatin miktarının artışı ve HA eklenmesi, filmlerin E ve UTS değerlerini düşürmüştür. Ancak, HA eklenmiş kompozit film yapılar kortikal kemik mekanik dayanımı ile (UTS= 50-150 MPa) benzer değerler

göstermiştir. Dolayısıyla, HA eklenmiş filmler kortikal kemik uygulamalarında kullanılabilecek aday malzemelerdir.

**Tablo 3 Karışım ve kompozit filmlerin mekanik test sonuçları**

Örnek	UTS (MPa)	E (GPa)	SAB (%)
C	139.25 ± 22.33	2.04 ± 0.70	11.64 ± 1.33
C-G:3-1	126.49 ± 11.07	1.89 ± 0.30	10.67 ± 3.57
C-G:1-1	103.46 ± 7.82	1.80 ± 0.24	7.80 ± 1.40
G	50.16 ± 6.94	0.97 ± 0.09	6.40 ± 1.42
xC	190.50 ± 13.33	2.52 ± 0.28	13.72 ± 1.17
xC-G:3-1	171.87 ± 16.20	2.61 ± 0.27	10.87 ± 4.07
xC-G:1-1	153.69 ± 18.00	2.77 ± 0.99	8.70 ± 2.90
xG	108.73 ± 18.44	1.04 ± 0.22	16.15 ± 3.50
xC/nsHA	140.04 ± 4.47	2.32 ± 0.24	11.59 ± 1.35
xC-G:3-1/nsHA	99.75 ± 15.87	2.13 ± 0.28	7.59 ± 1.01
xC-G:1-1/nsHA	88.07 ± 13.28	2.23 ± 0.12	6.9 ± 1.13

Çapraz bağlanmış örnekler, diğerlerine göre daha yüksek E ve UTS değerlerine sahiptir, dolayısıyla film yapılarında çapraz bağlamanın mekanik gücü arttırdığı söylenebilir. Diğer taraftan, nsHA varlığı ile UTS değerleri 50-70 MPa kadar düşme göstermiştir. Bunun nedeni, yapıda HA'nın ayrı faz oluşumuna girerek mekanik gücü azalttığını şeklinde açıklanabilir.

#### 4.4.4 Yüzey Hidrofilikliği

Hidrofilik davranış hücrenin yapılara tutunmasında önemli bir faktör olduğu için bu projede de incelenmiştir. Bu amaçla deiyonize su (DW), diiyodo metan (DIM), formamid (FA) ve dimetil sülfoksit (DMSO) sıvıları temas açısı ölçümlerinde kullanılmıştır. Ölçülen temas açıları Tablo 4 te verilmiştir.

Kitosan ve jelatin -OH ve -NH<sub>2</sub> gruplarından ötürü hidrofilik polimerler olmasına rağmen, su temas açısı değerleri çapraz bağlama yapılmamış örneklerde 114° ve 98° gibi yüksek değerler vermiştir. Bu durum muhtemelen polimer zincirinin hidrofobik omurgasından kaynaklanmaktadır. Kitosan-jelatin polimerik karışımlar için ise çapraz



bağlama ve jelatin miktarı artışı ile hidrofilik davranışın arttığı, temas açılarının küçüldüğü görülmüştür. En belirgin su temas açısı değişimi en hidrofilik karakter olarak xC-G:1-1 örneğinde görülmüştür ( $\theta=53$ ). Bu sonucun nedeni polar fonksiyonel grupların C-G:1-1 oranında ve çapraz bağlamanın da etkisinde yüzeye doğru yönelmesi olarak açıklanabilir.

**Tablo 4 Filmlerin su ile oluşturduğu temas açısı değerleri**

Örnek	Temas açısı (Derece)											
	C			C-G:3-1			C-G:1-1			G		
	-	x	x/ns HA	-	x	x/ns HA	-	x	x/ns HA	-	x	x/ns HA
DW	113.9	84.4	70.81	105.0	82.4	62.42	105.1	53.0	69.94	98.3	77.3	-
DIM	46.6	37.7	40.20	40.0	34.1	40.23	40.7	28.2	35.34	40.0	36.3	-
FA	54.5	43.3	40.71	46.3	48.4	38.88	46.1	37.2	42.51	32.4	28.9	-
DMSO	58.0	16.7	17.08	25.6	14.4	19.58	20.4	14.6	16.38	15.3	18.5	-

Örneklerin, Zisman, Harmonik, Geometrik ve Asit-Baz yaklaşımlarına göre hesaplanan yüzey enerji değerleri Tablo 5 te verilmiştir (OZCAN, 2008).

**Tablo 5 Filmlerin yüzey enerji değerleri**

Örnek	Zisman $\gamma$ (mJ/m <sup>2</sup> )	Harmonik $\gamma$ (mJ/m <sup>2</sup> )	Geometrik $\gamma$ (mJ/m <sup>2</sup> )	Asit Baz $\gamma$ (mJ/m <sup>2</sup> )
C	37.96	39.61	42.81	32.34
C-G:3-1	44.74	45.15	49.49	33.71
C-G:1-1	45.17	45.28	50.02	32.48
G	46.03	47.43	50.14	33.84
xC	44.38	46.57	45.32	42.77
xC-G:3-1	44.43	46.70	45.18	44.46
xC-G:1-1	41.56	55.71	51.87	46.32
xG	44.74	49.66	47.25	45.46
xC/nsHA	42.10	48.41	45.33	44.59
xC-G:3-1/nsHA	39.51	50.79	47.17	45.07
xC-G:1-1/nsHA	42.87	49.09	46.07	45.62

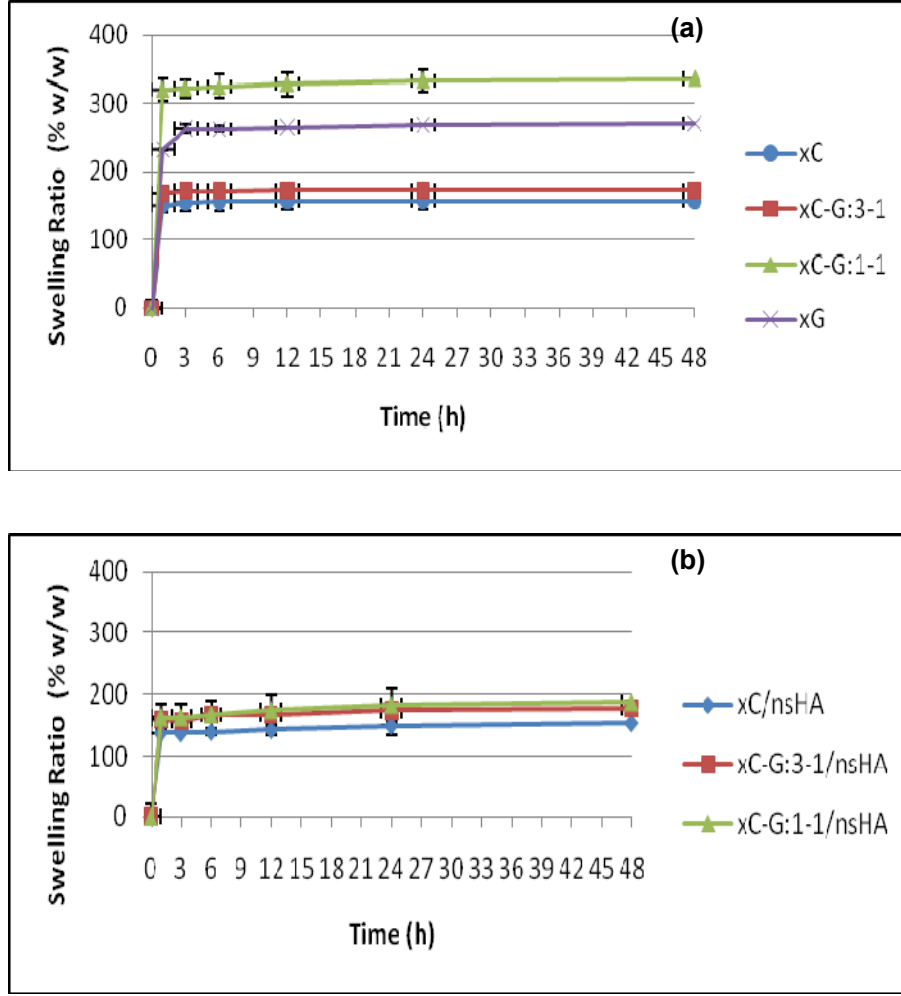
Farklı yöntemlerle elde edilmiş serbest yüzey enerjisi değerlerine bakıldığında çıkan sonuçların hesaplama yapılan yöntemle göre 32 mJ/m<sup>2</sup> ile 56 mJ/m<sup>2</sup> arasında farklılık gösterdiği görülebilmektedir. Çapraz bağlı örneklerde değerler 4-5 mJ/m<sup>2</sup> farklılıkla birbirine yakın değerler verirken, xC-G:1-1 örnekleri daha büyük değişimler

göstermiştir. nsHA eklenmesi ise çok büyük bir değişim yaratmamıştır. Kitosana ait değerleri literatürdeki değerle ( $38 \text{ mJ/m}^2$ ) karşılaştırıldığında, Harmonik ölçümüne göre değerinin ( $39.61 \text{ mJ/m}^2$ ) çok benzer olduğu görülmektedir (WANG, 2009). Zisman, Harmonik ve Geometrik hesaplarına göre serbest yüzey enerjisi değerleri çapraz bağlanmasız örneklerde jelatin miktarı arttıkça artmaktadır. Asit-Baz yaklaşımına göre çapraz bağlanmamış filmlerde toplam yüzey enerjisinin değişmediği ve yaklaşık  $33 \text{ mJ/m}^2$  olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni jelatinde bulunan  $-\text{COOH}$  ve  $-\text{NH}_2$  gruplarının serbest yüzey enerjisi değerlerini arttırması ve su temas açısı değerlerini düşürmesi olarak görülebilir. Bu çalışmada tüm yaklaşımlar kullanılarak malzemelerin yüzey enerjileri hesaplanmış olsa da, literatür ile karşılaştırıldığında en güvenilir sonuçların Harmonik yaklaşım sonucu elde edildiğini söylemek mümkündür.

#### 4.4.5 Film Yapıların Şişme Değerleri

Çapraz bağlanmamış filmler sulu ortamda çözündükleri için şişme deneylerinde kullanılamamıştır.

Şişme deneyleri sonuçlarına göre karışım filmler içinde en fazla şişmeyi xC-G:1-1 oranındaki örnek göstermiştir (Şekil 13a ve 13b). Bunun da nedeni kitosanın sert yapısı ile hidrofilik  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$  gruplarının çokluğunun yarattığı kombinasyon olabilir. xC ve xC-G:3-1 örnekleri sırasıyla 3 ve 6 saatte denge değerlerine ulaşmıştır. Çapraz bağlı kitosan örneği (xC) en düşük şişme değerini gösterirken ( $155.3 \pm 11.5\%$ ), eşit oranlarda jelatin ile kitosanın karıştırılması ile hazırlanan filmler (xC-G:1-1) en yüksek şişme değerlerine sahip olmuştur ( $333.0 \pm 16.9\%$ ). Kim ve ekibi, şişme değerlerinin serbest  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ , ve  $-\text{NHOCCH}_3$  gruplarından kaynaklandığını belirtmiştir (KIM, 2005). Ancak, Haider ve ekibi, kitosan miktarındaki artışın aynı zamanda kitosandaki  $\text{NH}_3^+$  ve jelatindeki  $\text{COO}^-$  grupları arasındaki elektrostatik etkileşimi de arttırdığını ileri sürmüştür. Bu iki görüş dikkate alındığında xC-G:1-1 oranında neden en fazla şişme değerinin elde edildiği açıklanabilir. Diğer taraftan, jelatin varlığında kitosanın kristallenme olasılığının azalacağı ve dolayısıyla şişme değerlerinin artacağı da beklenen bir sonuçtur. Aynı zamanda su temas açısı, xC-G:1-1 filmlerde en yüksek değeri verdiği için en hidrofilik karakterli bu yapının en fazla şişme oranına sahip olması birbiriyle uyumlu sonuçlardır.

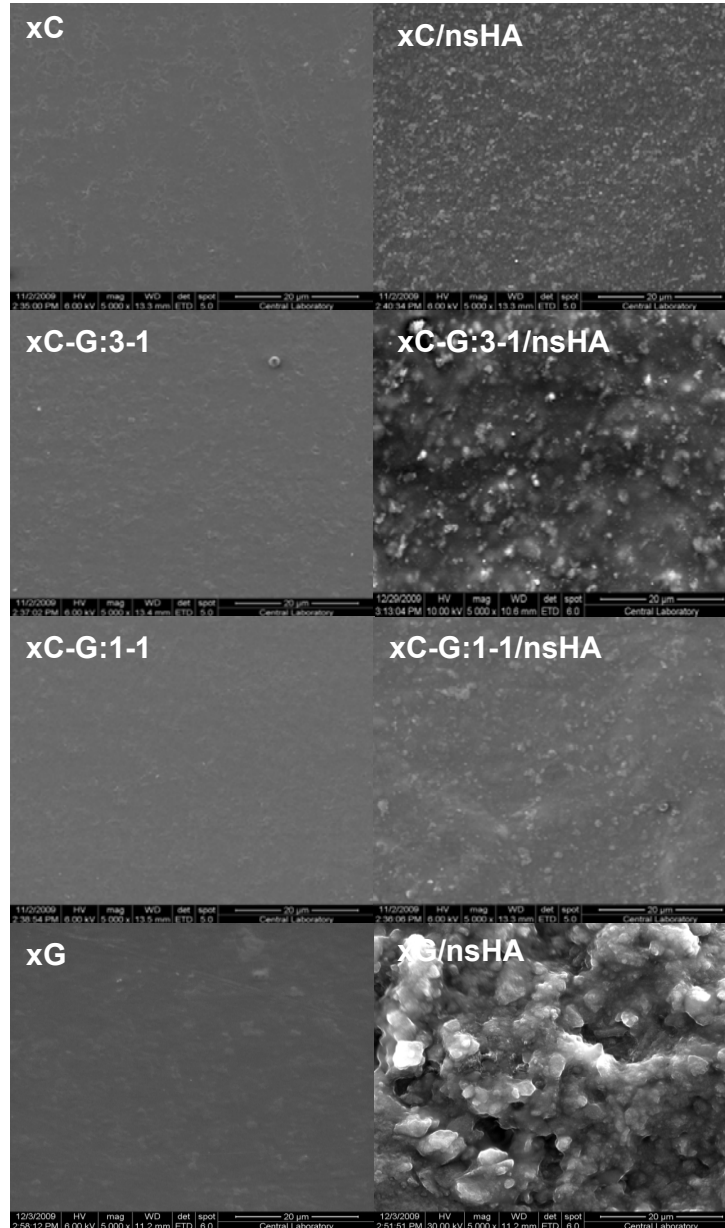


**Şekil 13 Filmlerin şişme değerleri, (a) çapraz bağlanmış kitosan-jelatin filmleri, (b) kitosan-jelatin/hidroksiapatit kompozit filmleri**

Kompozit yapıların şişme sonuçları genellikle birbirlerine yakın değerler göstermişlerdir ve hepsi 3. saatte denge şişme değerlerine ulaşmıştır. Bu yapılarda da xC-G:1-1/nsHA filmlerin en yüksek şişme değeri sonuçlarını ( $162.7 \pm 2.2\%$ ) verdiği gözlenmiştir. xC-G:3-1/nsHA örneği  $157.0 \pm 9.9\%$  değerini verirken xC/nsHA örneği  $137.5 \pm 2.1\%$  şişme oranını göstermiştir. Kompozit yapıların polimerik karışımlara göre biraz daha düşük şişme değerleri vermesinin nedeni HA parçacıklarıyla polimerik yapıdaki  $-\text{COO}$  ve  $-\text{NH}_3$  gruplarının etkileşime girmesi sonucu su ile oluşabilecek etkileşimin azalmasına bağlanabilir.

#### 4.4.6 Yüzey Yapısı Analizi

Filmlerin yüzey yapılarının analizi için SEM mikrokrografları incelenmiştir (Şekil 14). SEM sonuçları, filmlerin homojen yüzeylere sahip olduklarını, HA varlığının yüzey pürüzlülüğünü artırdığını, ve HA dağılımının xG/nsHA haricinde oldukça homojen olduğunu, göstermektedir.



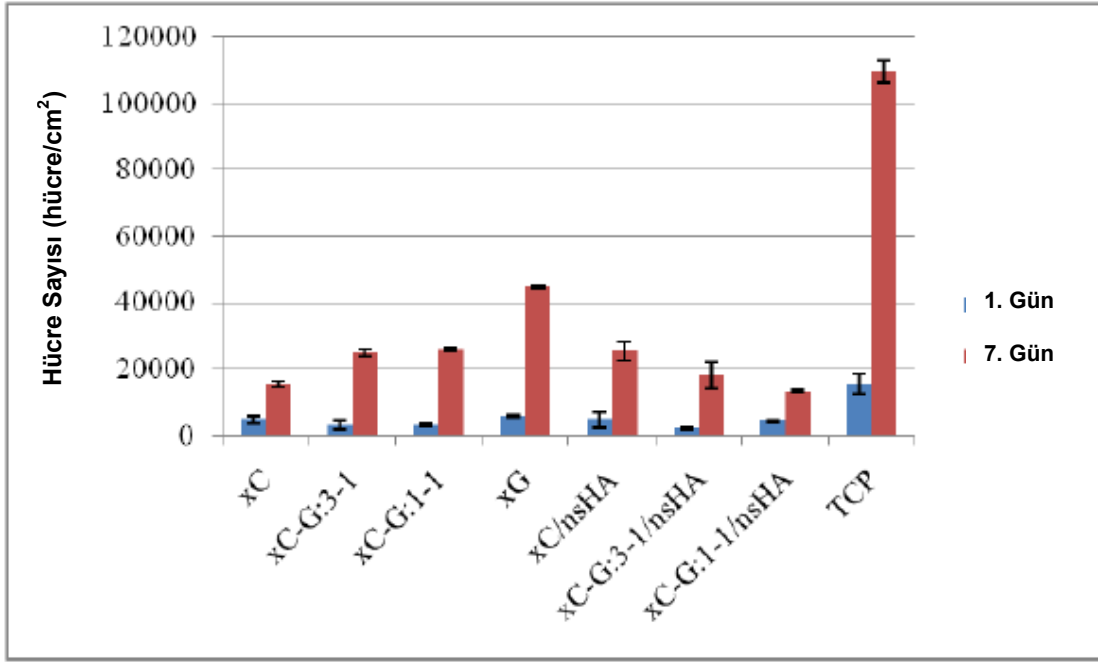
Şekil 14 Film yapıların SEM mikrokrografları

#### 4.4.7 Filmlerin Hücre Etkileşimleri

Çapraz bağlanmamış kitosan-jelatin yapılar sulu ortamda çok kısa sürede çözündüğü için hücre deneyleri sadece çapraz bağlanmış örneklere uygulanmıştır. MTS test sonuçları Şekil 15 de görülmektedir.

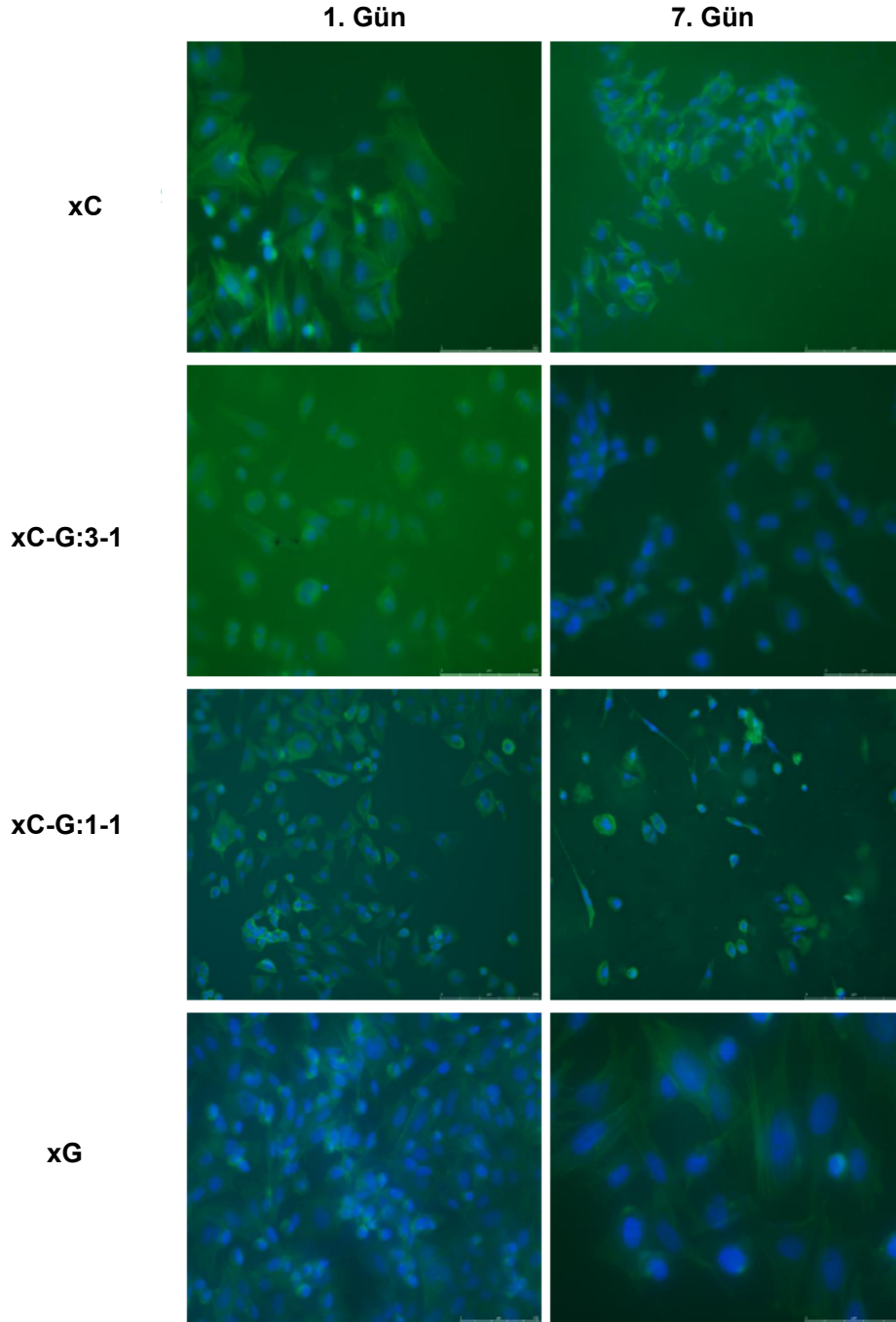
MTS test sonuçlarına göre; ilk günde kitosan-jelatin karışım filmler arasında saf jelatin film en yüksek hücre yapışmasını göstermiştir ( $5754 \pm 383$  hücre/cm<sup>2</sup>). 7. günde de jelatin artışının filmlerdeki hücre çoğalmasını arttıran bir etkisi olduğu görülebilmektedir. Bunun muhtemel nedeni jelatinin yapısında yer alan ve hücre yapışmasını arttırdığı bilinen RGD-benzeri amino asit gruplarıdır. Jelatin filmlerin 7. gündeki hücre miktarı ( $44597 \pm 188$  hücre/cm<sup>2</sup>) kitosan filmlerdeki hücre sayısından ( $15363 \pm 931$  hücre/cm<sup>2</sup>) yaklaşık 3 kat fazladır. Bu durum da jelatin içeren destek yapıların hücre uyumluluklarının çok yüksek olduğunu kanıtlamaktadır.

Sinterlenmemiş hidroksiapatit (nsHA) içeren kompozit filmlerde ise tam ters bir davranış oluşmuştur. Özellikle 7. gün sonuçlarından da gözleneceği gibi jelatin miktarındaki artış hücre sayısında azalmaya neden olmuştur. xC/nsHA filmler ilk günde de ( $4736 \pm 2536$  hücre/cm<sup>2</sup>) yedinci günde de ( $25283 \pm 2962$  hücre/cm<sup>2</sup>) en yüksek hücre sayısına sahip olmuştur. Bu durumun nedeni ise hidroksiapatitin Ca<sup>2+</sup> ve PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> gruplarının jelatinden gelen hücre yapışmasını arttırıcı RGD-benzeri sekansların COOH ve NH<sub>3</sub> grupları ile etkileşimi sonucu bu sekansların inhibe olması şeklinde açıklanabilir (CHANG, 2003).



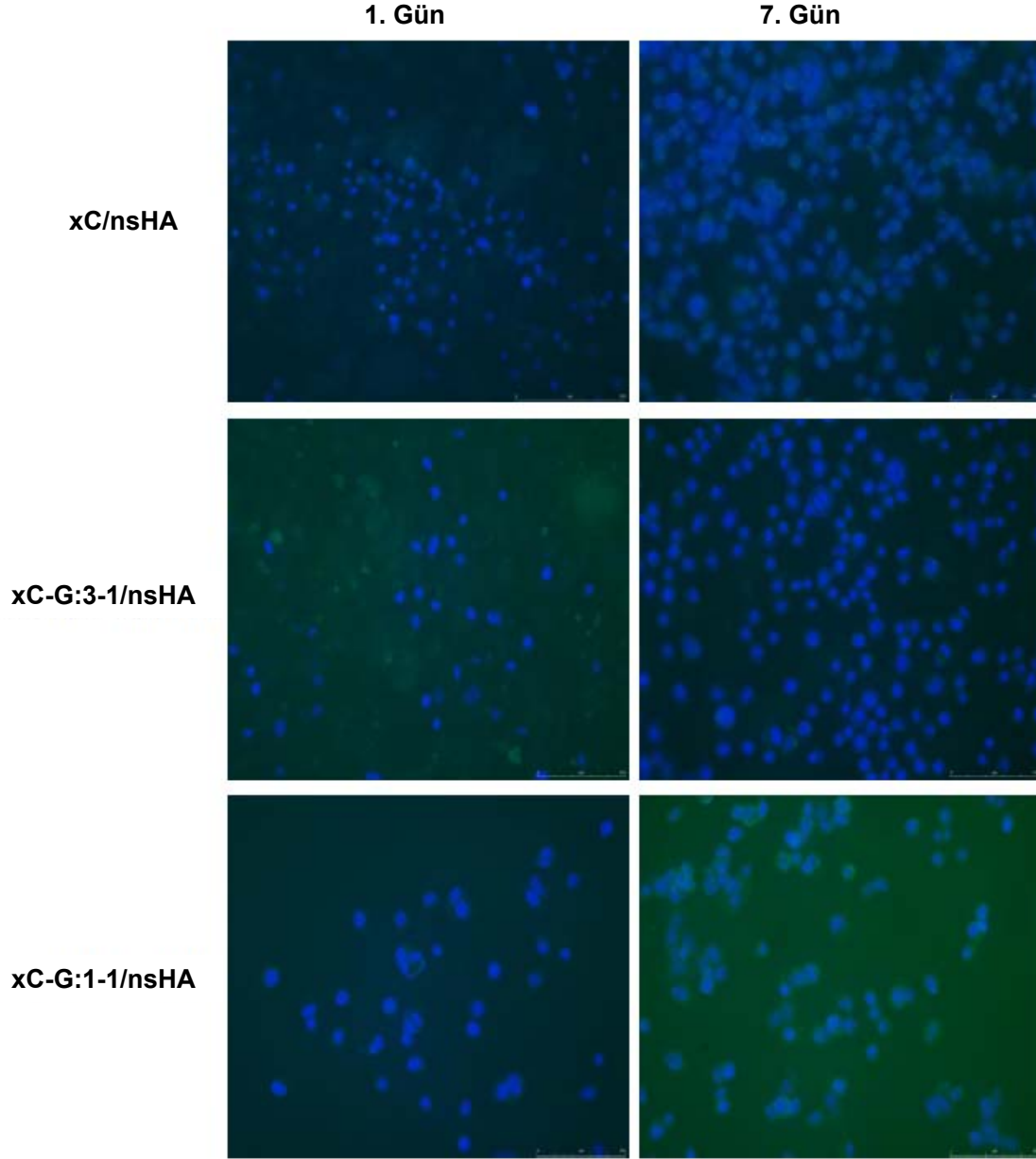
**Şekil 15 Filmler üzerindeki Saos-2 hücrelerinin 1. ve 7. gün sayıları**

Çapraz bağlı kitosan-jelatin karışım filmlerin üzerindeki Saos-2 hücrelerinin yapışmalarını incelemek için floresan fotoğrafları alınmıştır (Şekil 16). DAPI-falloidin ile boyanan hücrelerin çekirdekleri mavi renkte görünürken sitoplazmaları ise yeşil renkte görünmektedir. Kitosan otoflerasan bir malzeme olduğu için bu boyama yöntemi literatürde de sıklıkla kullanılmaktadır. Floresan resimlerinden de görüldüğü üzere farklı oranlardaki kitosan-jelatin karışım örneklerde artan jelatin miktarı osteosarkoma hücrelerinin yapışmasını artırmıştır.



**Şekil 16 Çapraz bağlı kitosan-jelatin filmlerin Saos-2 hücre ekimi sonrası 1. ve 7. gün floresan mikroskop fotoğrafları (20X)**

DAPI (çekirdek) ve falloidin (stoplazma) boyalı kitosan-jelatin/nsHA kompozitler 7. güne ait floresan mikrograflarında fark edilir değişiklikler göstermişlerdir. xC/nsHA ve xC-G:3-1/nsHA kompozit filmler xC-G:1-1 filme göre daha yüksek sayıda hücre çoğalmasına sahiptir (Şekil 17). Ayrıca, yüzeye tutunmuş hücrelerin sayısı, 7. günde ilk güne göre artış göstermiştir.

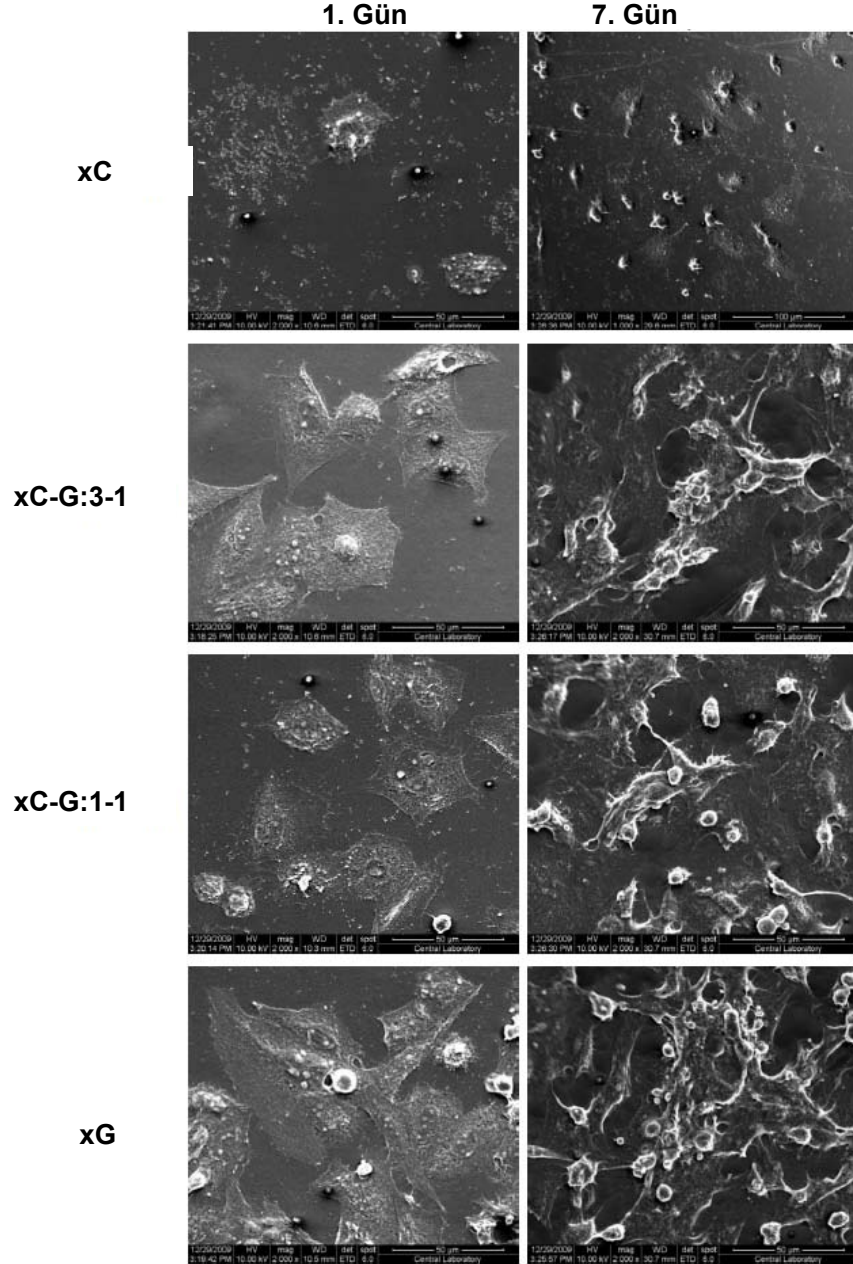


**Şekil 17 Çapraz bağlı kitosan-jelatin/hidroksiapatit filmlerin Saos-2 ekimi sonrası 1. ve 7. gün floresan mikroskop fotoğrafları (20X)**

Film yüzeyler üzerindeki hücre-malzeme ilişkisi floresan mikroskopu resimlerinden çok net açıklanamadığı için hazırlanan örneklerin SEM mikrografları incelenmiştir. Polimerik karışım filmlerin Saos-2 hücreleri ile olan SEM resimleri 7. günde belirgin hücre yayılmasını göstermektedir (Şekil 18). İlk güne ait resimlerde ise hücreler daha dairesel şekillerdeyken yüzeye tam yayılamadıkları görülmektedir. Sadece kitosan



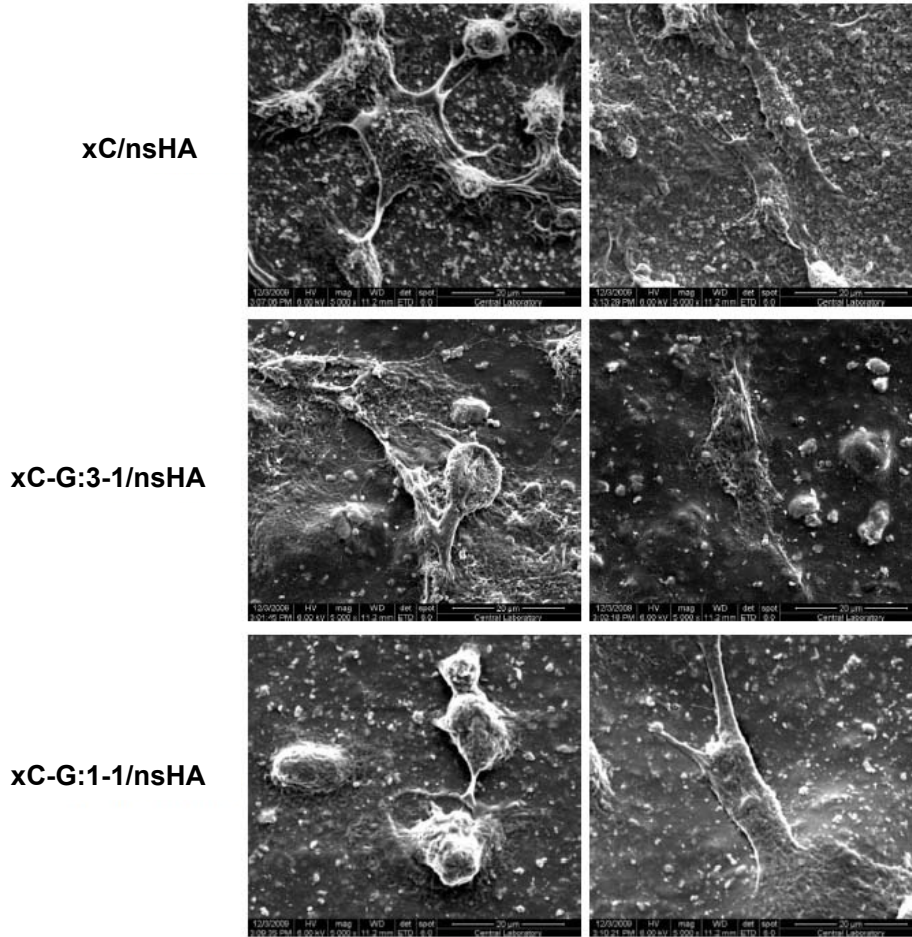
içeren xC filmler üzerinde en az hücre yayılması gözlenirken, jelatin yoğunluğu artan filmlerde hücrelerin yıldızimsı şekillerde yayıldıkları gözlenmektedir.



**Şekil 18 Çapraz bağlı kitosan-jelatin filmlerin Saos-2 ekimi sonrası 1. ve 7. gün SEM mikrografları**

Kompozit filmlerin SEM mikrograflarından (Şekil 19) görüldüğü üzere, hücreler ilk gün dairesel şekillere sahipken yedinci gün nSHA ekli yüzeylerde yayılmış halde bulunmaktadırlar. MTS sonuçlarının aksine SEM mikrografları farklı kitosan-jelatin

oranlı filmler arasında hücre yayılması konusunda büyük farklılıklar göstermemektedir. Rizzi ve ekibi PCL ve PLA kullanılarak hazırlanmış biyobozunur polimer/sinterlenmemiş HA filmlerin SEM mikrograflarına göre, insan osteoblastlarının polimer yüzeyden çok HA'nın bulunduğu bölgelerde fazla yayılma gösterdiklerini belirtmişlerdir (RIZZI, 2001). Sonuç olarak, bu çalışmanın SEM mikrograflarına bakarak nsHA parçacıklarının yüzeyde yeterli miktarda yer aldığında hücre yayılmasını desteklediği fikri ortaya çıkabilir.

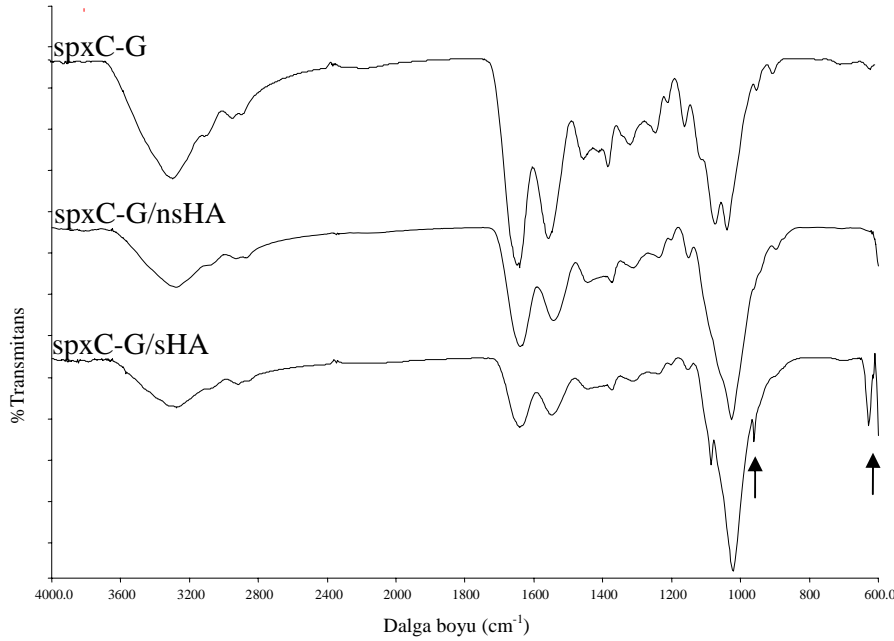


**Şekil 19 Çapraz bağlı kitosan-jelatin/hidroksiapatit filmlerin Saos-2 ekimi sonrası 1. ve 7. gün SEM mikrografları**

#### 4.5 Gözenekli Kitosan-jelatin (spxC-G), Kitosan-jelatin/nsHA (spxC-G/nsHA) ve Kitosan-jelatin/sHA Yapıların Karakterizasyonu

Dondurma-kurutma yöntemi ile hazırlanan gözenekli ve çapraz bağlı sünger yapılar ve hidroksiapatit eklenerek hazırlanan kompozit süngerlerin özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla, kitosan-jelatin (spxC-G), kitosan-jelatin/nsHA (spxC-G/nsHA) ve kitosan-jelatin/sHA örnekler kimyasal yapıları, mekanik özellikleri ve hücre etkileşimleri açısından incelenmiştir.

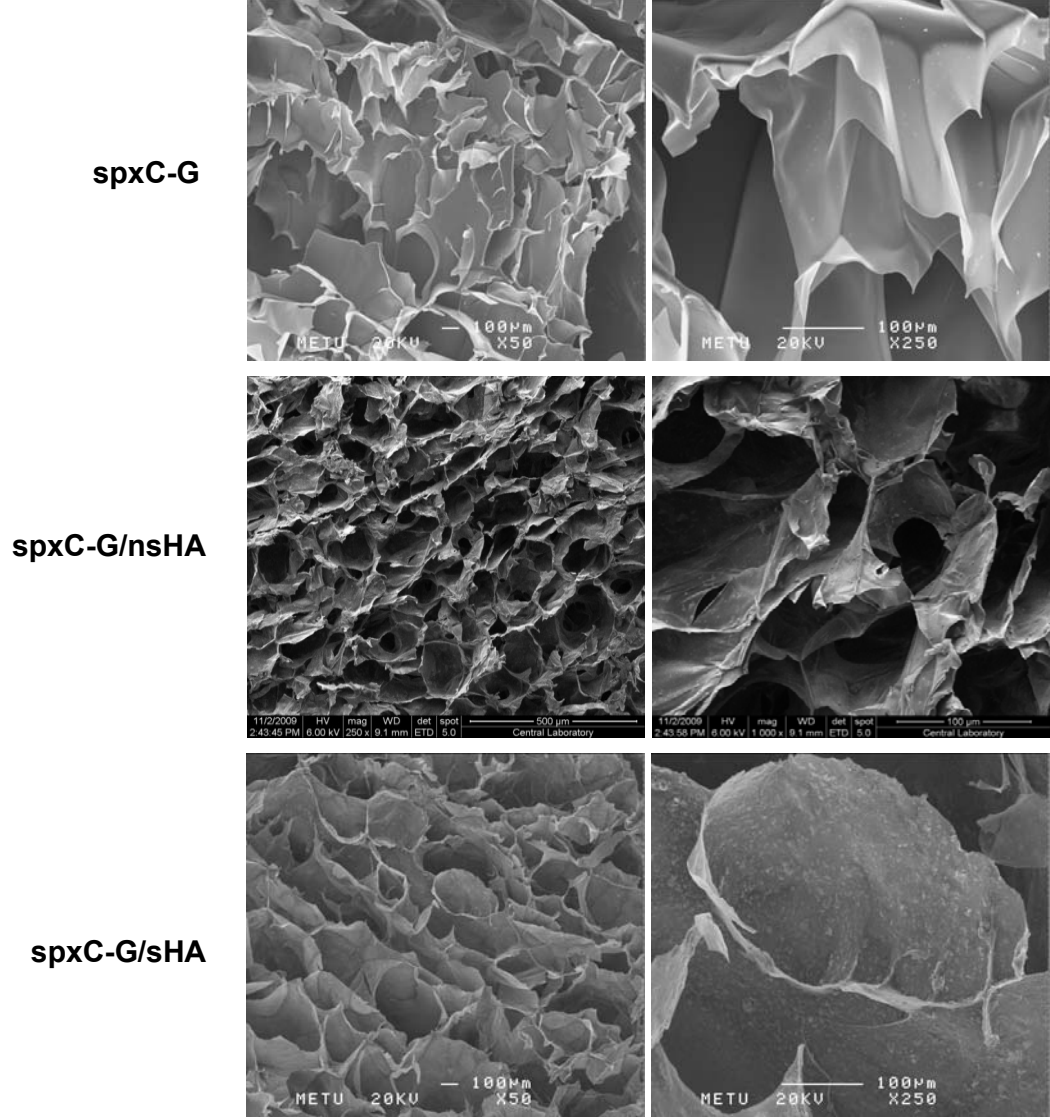
FTIR-ATR sonuçlarına göre HA parçacıklarının  $961\text{ cm}^{-1}$ ,  $603\text{ cm}^{-1}$  dalga boylarındaki  $\text{PO}_4^{3-}$  pikleri ve  $629\text{ cm}^{-1}$  deki OH titreşim pikleri görülmüştür (Şekil 20).



Şekil 20 Gözenekli sünger yapıların FTIR-ATR spektraları

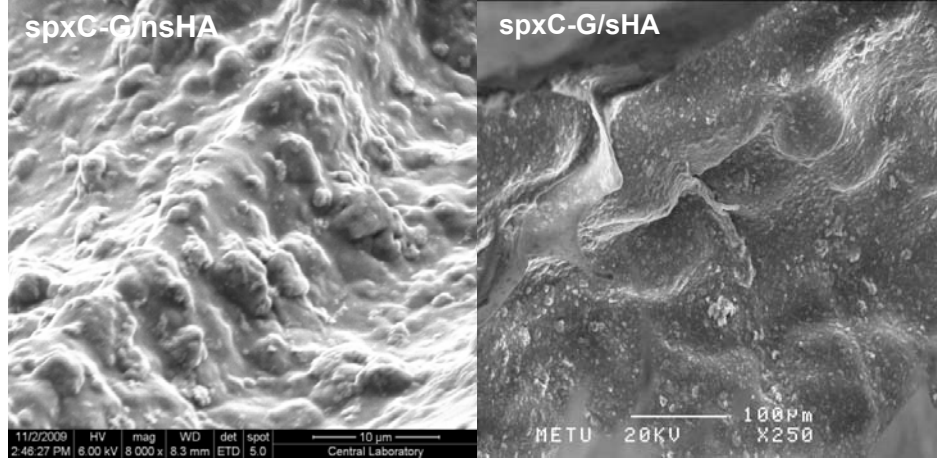
##### 4.5.1 Gözenekli Sünger Yapıların Morfolojileri

Sünger yapıların morfolojik özellikleri SEM mikrograflarından incelenmiştir. Gözenekli kitosan-jelatin (spxC-G), kitosan-jelatin/nsHA (spxC-G/nsHA) ve kitosan-jelatin/sHA yapıların SEM mikrografları Şekil 21 de verilmiştir. Bu yapılarda gözenek büyüklükleri  $100\text{ }\mu\text{m}$  ve  $500\text{ }\mu\text{m}$  dolaylarında değişiklik göstermiştir.



**Şekil 21 Gözenekli yapıların taramalı elektron mikroskop mikrografları**

SEM mikrografları, çapraz bağlama sırasında sulu ortamda 48 saat kalmasına rağmen HA partiküllerinin destek yapıardan ayrılmadığını, desteğin duvarlarına yapıştığını ve bulunduğu bölgede kararlı olduğunu göstermiştir. Doku mühendisliğinde çok önemli bir faktör olan gözenek dağılımının ise homojen olduğu görülmüştür. Gözenek duvarlarında 5-15 µm HA parçacıkları bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 22).

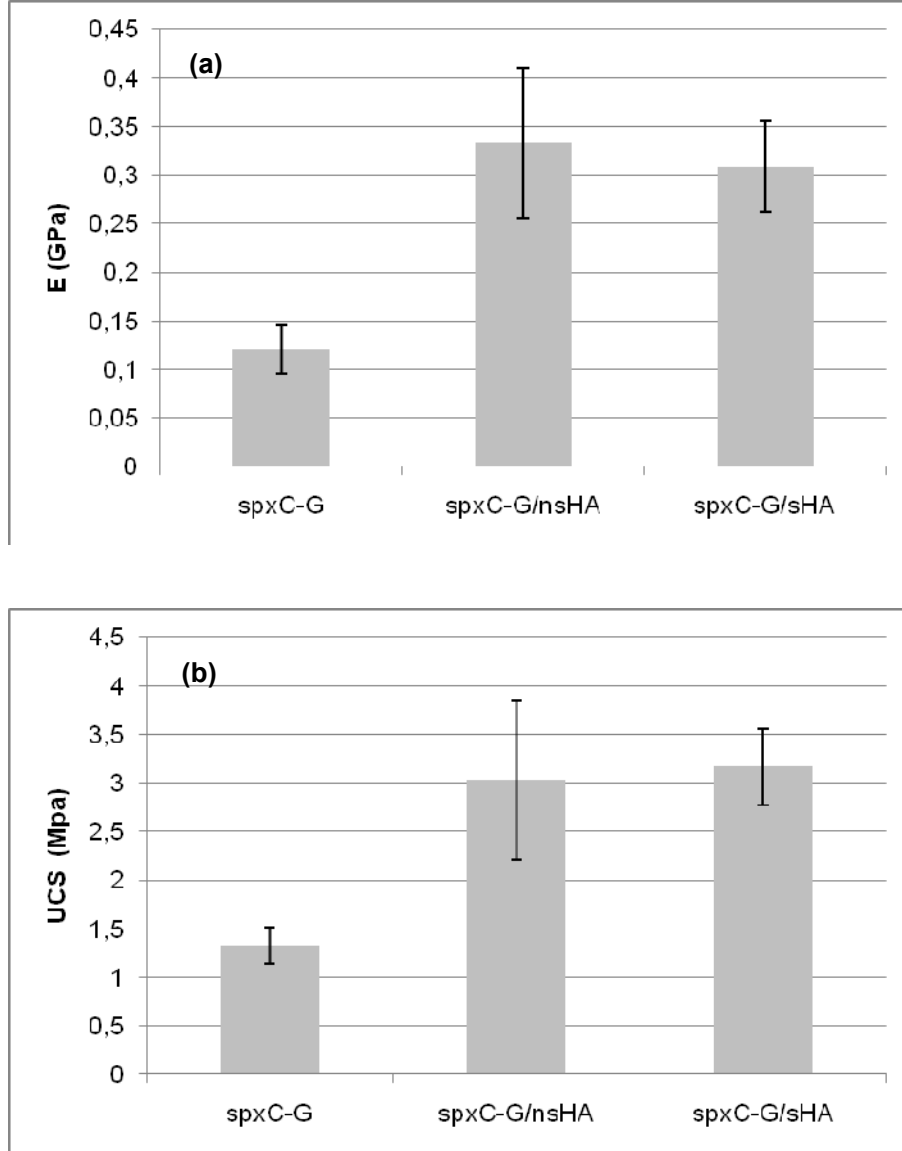


**Şekil 22 Hidroksiapatit eklenmiş destek yapıların gözenek duvarlarının SEM mikrografları**

#### **4.5.2 Mekanik Özellikler**

Mekanik özelliklerin incelenmesi için sünger yapılara sıkıştırma testleri uygulanmıştır. Bu amaçla, süngerler 1 cm kenarları olan küp şeklinde kesilmiş ve mekanik cihazın basma modülü içine yerleştirilmiştir. Süngerlerin elastomerik yapıları nedeniyle kırılma noktası göstermedikleri ve uygulanan güç arttıkça malzeme direncinin de arttığı görülmüştür. Bu testlerin sonucunda elastik modülüs (E), maksimum sıkışma direnci (UCS) değerleri hesaplanmıştır (Şekil 23a ve 23b).

Yapılara sinterlenmemiş hidroksiapatit (nsHA) veya sinterlenmiş hidroksiapatit (sHA) eklenmesi sonrası her iki mekanik değer de kompozit sünger yapılarda arttığı görülmüştür. UTS değerleri yaklaşık 3 kat artış göstermiş ve 1.33 MPa'dan 3 Mpa üzerine çıkmış, elastik modülüs değerleri de yaklaşık 3 kat artışla 0.12 GPa'dan 0.30 GPa üstü değerlere çıkmıştır.



**Şekil 23** Sünger yapıların basma deney sonuçları, (a) elastik modülüs (E) , (b) maksimum sıkışma direnci (UCS)

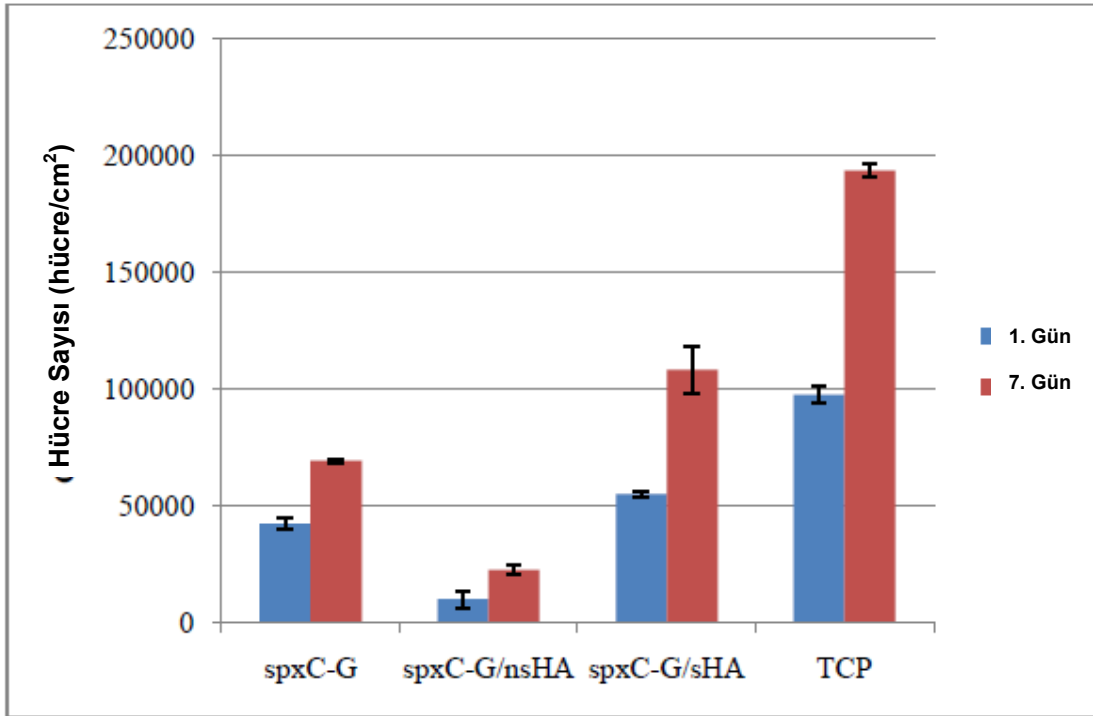
**Tablo 6** Sünger yapıların ve süngerimsi kemik dokusunun mekanik özellikleri

Örnek	UCS (MPa)	E (GPa)
Sünger Kemik	2-12	0.05-0.5
spxC-G	1.33 ± 0.19	0.12 ± 0.03
spxC-G/nsHA	3.03 ± 0.82	0.33 ± 0.08
spxC-G/sHA	3.17 ± 0.39	0.31 ± 0.05

Sonuçlara göre HA eklenmesi yapıların mekanik özelliklerini arttırmıştır. Ayrıca, HA eklenmiş sünger yapılar sünger kemik yapısının mekanik özellikleri (UCS=2-12 MPa), E=0.05-0.5 GPa) (HENCH, 1993) ile benzer değerler göstermiştir. Dolayısıyla bu tür malzemelerin süngerimsi kemik tedavisi için kullanılabileceği önerilebilir.

#### 4.5.3 *In vitro* Test Analizleri

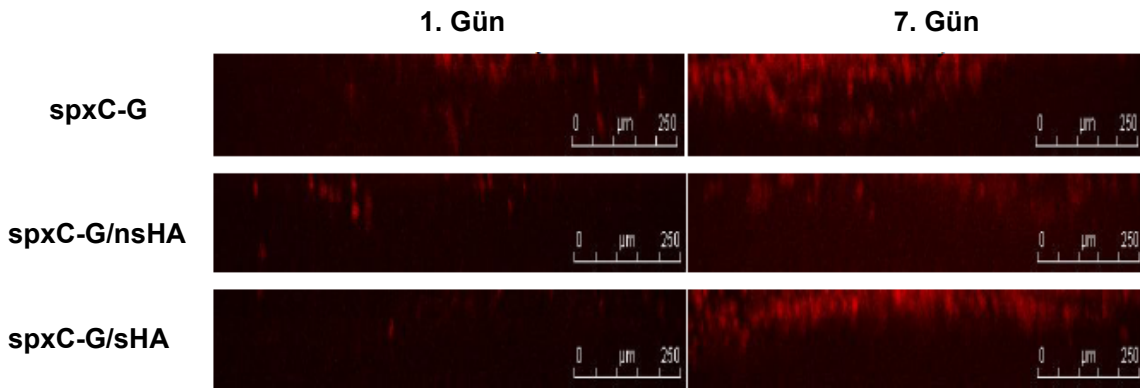
Destek yapıların hücre yayılmasına ve çoğalmasına uygunluğu MTS testi ve mikroskopik yöntemlerle incelenmiştir. MTS testi sonuçları Şekil 24 te verilmiştir. Gözenekli yapılara 100.000 hücre/cm<sup>2</sup> ekim yapılmıştır ve 7. günün sonunda en yüksek hücre çoğalması sinterlenmiş HA bulunan yapılarda gözlenmiş en az çoğalmayı ise spxC-G/nsHA örnekleri göstermiştir. Bu sonuçların nedeni kimyasal kompozisyon kadar, gözenek boyutlarındaki farklılıklar da olabilir. SEM resimlerinden de görülebildiği gibi spxC-G/nsHA yapıları en küçük gözenek yapısına (yaklaşık 100 µm) sahipken spxC-G/sHA örnekleri en büyük gözenek boyutuna (yaklaşık 500 µm) sahiptir.



Şekil 24 Gözenekli sünger yapıların MTS testi ile yapılan hücre çoğalması sonuçları

Konfokal mikroskop, hücrelerin yapılar içindeki dağılımını ve hücrelerin gözeneklerden geçişini incelemek için kullanılmıştır. Hücre ile kültür edilen sünger destek yapılarının z-eksenleri incelenmiş ve hücrelerin gözenekler içinden ilerleyişi fotoğraflanmıştır. MTS test sonuçlarını destekleyen konfokal resimlerinden (Şekil 25) görüldüğü gibi propidyum-iyodür boyalı Saos-2 hücreleri 7. günde spxC-G/sHA örneğinde daha fazla sayıda görülmektedir. Ayrıca z-kesitli konfokal resimleri hücrelerin spxC-G yapılar da 100 µm derinliğe kadar indiğini gösterirken bu değer spxC-G/sHA örneklerinde 60 µm ye düşmektedir.

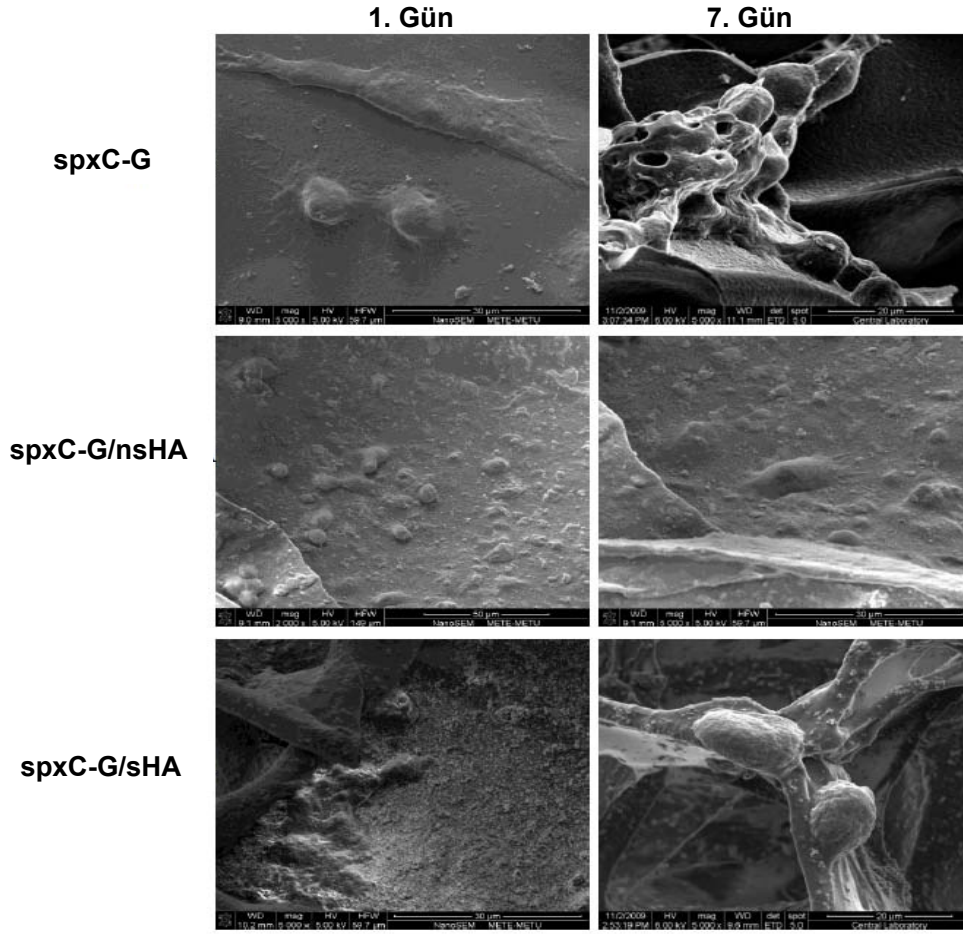
spxC-G/sHA örnekleri en yüksek hücre sayısına sahip olmasına rağmen, spxC-G destek yapıları en yüksek geçişi göstermiştir. Bunun nedeni gözenek büyüklüklerindeki değişimlerin hücre penetrasyonu üzerindeki kritik etkisi olabilir.



**Şekil 25 Saos-2 hücreleri ekilmiş çapraz bağlı kitosan-jelatin, kitosan-jelatin/nsHA ve kitosan-jelatin/sHA kompozit sünger destek yapılarının 1. ve 7. gün konfokal resimleri**

Gözeneklerden içeri göç etmiş hücreleri gözlemleyebilmek amacıyla, yapıların SEM analizleri de yapılmıştır. Hücrelerin gözenek içlerindeki varlığı SEM mikrograflarında da görülebilmektedir (Şekil 26). SEM resimleri incelendiğinde hücrelerin birinci günde dairesel şekillere sahip olduğu ancak 7. güne gelindiğinde gözenek duvarlarına yapıştıkları ve yayıldıkları söylenebilir.





**Şekil 26 Saos-2 hücreleri ekilmiş çapraz bağlı kitosan-jelatin, kitosan-jelatin/nsHA ve kitosan-jelatin/sHA kompozit sünger destek yapılarının 1. ve 7. gün SEM mikrografları**

Sonuç olarak, süngerimsi yapıda hazırlanan kitosan-jelatin karışım, kitosan-jelatin/nsHA ve kitosan-jelatin/sHA kompozitlerin konfokal ve SEM mikrograflarına göre Saos-2 osteosarkoma hücreleri üç-boyutlu yapılara yapışmakta, gözenek içlerine difüzlennmekte ve yapı içinde yayılmaktadır. MTS test sonuçları özellikle sinterlenmiş hidroksiapatit (sHA) eklenmesinin hücre çoğalmasını arttırdığını göstermiştir.

## 5 TARTIŞMA

Bu çalışmada, doğal biyouyumlu ve biyobozunur olduğu bilinen jelatin ve kitosan polimerleri, sinterlenmemiş ve sinterlenmiş şekilde laboratuvarlarımızda hazırlanan hidroksiapatit tozları ile birleştirilerek kemik doku mühendisliğine yönelik 2-D film ve 3-D sünger destek yapıların hazırlanması hedeflenmiştir.

Öncelikle laboratuvarlarımızda sentezlenen hidroksiapatit yapısı, FTIR-ATR, X-Işını ve SEM ile incelenmiş ve sinterlenmemiş hidroksiapatit parçacıklarının yüksek oranda amorf, sinterlenmiş hidroksiapatit taneciklerinin ise kristal yapıda olduğu gözlemlenmiştir.

Farklı kitosan-jelatin oranlarında hazırlanan kitosan-jelatin filmler suda-çözünmediği için EDC/NHS çapraz bağlayıcıları ile sabitlenmiş ve FTIR-ATR sonuçlarıyla çapraz bağlama aşamasının başarıyla gerçekleştiği doğrulanmıştır. Hem çapraz bağlı, hem de çapraz bağlanmayan film örneklerinde bazı karakterizasyon testleri yapılmış, ancak dayanıklılığı az, çözünürlüğü fazla olan çapraz bağlanmamış örnekler şişme ve hücre deneylerinde kullanılmamıştır.

2-D hazırlanan filmler osteojenik özelliklerini geliştirmek için sinterlenmemiş hidroksiapatit (nsHA) ve sinterlenmiş hidroksiapatit (sHA) eklenmesiyle modifiye edilmiştir. SEM sonuçları nsHA taneciklerinin polimerik film yüzeylerde homojen dağılımını kanıtlamıştır. Diğer taraftan, sHA tanecikleri eklenmiş iki-boyutlu yapılar homojen olmayan bir dağılım göstermiş ve filmlerin kırılma dayanıklılığını artırmıştır. Dolayısıyla, bu filmler detaylı incelenememiş ve kullanılamamıştır.

Termal analiz sonuçlarına göre; DSC verileri çapraz bağlama sonrası bozunma sıcaklıklarının arttığını, hidroksiapatit eklenmesinin muhtemelen  $Ca^{2+}$  ve  $PO_4^{3-}$  grupları ile  $COO^-$  ve  $NH_4^+$  grupları arasındaki etkileşimler nedeniyle bozunma sıcaklığını yükselttiğini göstermiştir.

Mekanik test sonuçlarına göre çapraz bağlama, kitosan-jelatin yapıların çekme dayanımlarını ve sertliklerini arttırmıştır. Ayrıca, kristalin özellikler gösterebilen kitosan oranı arttıkça örneklerin mekanik gücü de artış göstermiştir. Yapılara sinterlenmemiş hidroksiapatit (nsHA) eklenmesi sonrası UTS ve E değerleri azalmıştır. Bunun nedeni, polimer film içerisindeki nsHA taneciklerinin homojen olmayan faz ayırımına gitmesi ve kırılma aşamasını hızlandırması olabilir. Buna rağmen kompozit filmlerin mekanik özellikleri sert kemiğin özelliklerine çok benzer

değerler gösterdiği için xC-G/nsHA filmler sert doku mühendisliğine yönelik potansiyele sahip malzemelerdir.

Yüzey hidrofiliği incelendiğinde xC-G:1-1 filmler en hidrofilik yüzey özelliklerini göstermiştir ve şişme test sonuçları da bu özelliği desteklemiştir.

Saos-2 kemik hücreleri ile yapılan deneylere göre polimerik film örneklerde jelatin artışı hücre çoğalmasını arttırmıştır. Bu sonuç, jelatin içinde bulunan ve hücre yapışmasını tetikleyen RGD gruplarının varlığından dolayı oluşmuştur. Ancak nsHA eklenmiş kompozit yapılarda tam tersi bir etki gözlenmiştir. Bu durumun nedeni de HA parçacıkları ile RGD grupları arasındaki etkileşime dayanabilir.

Yapıların hücre dışı ortama benzerliğini arttırmak adına iki-boyutlu film örneklerin yanı sıra üç-boyutlu sünger yapılar da hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Polimer oranı 1-1 tutulan örneklerde sinterlenmemiş ve sinterlenmiş olmak üzere iki çeşit hidroksiapatit tozu yapılara eklenmiştir. FTIR-ATR ve SEM sonuçları HA taneciklerinin gözenekli yapılardaki kararlılığını kanıtlar niteliktedir.

SEM sonuçlarına göre, spC-G/sHA en büyük gözenek boyutuna (~500 µm) sahip olan örnektir. Diğer örneklerin; spC-G yaklaşık 200 µm ve spC-G/nsHA yaklaşık 100 µm boyutlarında gözeneklere sahip olduğu SEM resimlerinde görülebilmektedir. Gözenek boyutu yüzey alanını etkilediği için hücrelerin tutunması ve ilerlemesi açısından biyouyumluluğu arttıran önemli olan bir faktördür.

Mekanik test sonuçları, hazırlanan ve HA içeren kompozit yapıların insan süngerimsi kemiği ile benzer değerler gösterdiğini ve bu yapıların süngerimsi kemik mühendisliği uygulamalarına yönelik potansiyelini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, sinterlenmemiş veya sinterlenmiş hidroksiapatit kullanılarak hazırlanan 2-D film ve 3-D sünger kitosan-jelatin desteklerinin kemik doku mühendisliği uygulamaları için aday malzemeler olduğu söylenebilir.

## 6 KAYNAKLAR

ABSHAGEN, K., Schrodi, I., Gerber, T., Vollmar, B., In vivo analysis of biocompatibility and vascularization of the synthetic bone grafting substitute NanoBone<sup>®</sup>, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91, 557-566, 2009.

AGNIHOTRI, S.A., Mallikarjuna, N.N., Aminabhavi, T.M., Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 100, 5-28, 2004.

BIGI, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Roveri, N., Rubini, K., Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin, *Biomaterials*, 23, 4827-4832, 2002.

BLACK, J., *Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility*, CRC Press Taylor and Francis Group, Northwest Florida, 2006.

BUCKWALTER, J.A., Musculoskeletal tissues and the musculoskeletal system, Turek's Orthopaedics Principles and their Applications, ed: Wenstein, S.L., Buckwalter, J.A. Lippincott Company, 2005.

BYRD, H.S., Hobar, P.C., Shewmake, K., Augmentation of the craniofacial skeleton with porous hydroxyapatite granules, *Plast Reconstr Surg*, 91, 15-22, 1993.

CHANG, M.C., Ko, C.C., Douglas, W.H., Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite, *Journal of Biomaterials*, 2853-2862, 2003.

CHOMARAT, N., Robert, L., Seris J.L., Kern, P., Comparative efficiency of pepsin and proctase for the preparation of bovine skin gelatin, *Enzyme and microbial technology*, 16, 756-760, 1994.

DANG, J.M., Leong, K.W., Natural polymers for gene delivery and tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 487- 499, 2006.

- DAVIES, R.C., Neuberger, A., Wilson, B.M. , The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength, *Biochem Biophys Acta*, 178, 294–305, 1969.
- DEFAIL, A.J., Edington, H.D., Matthews, S., Lee, W-C.C., Kacey G., Controlled release of bioactive doxorubicin from microspheres embedded within gelatin scaffolds, *Marra Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 79A, 954–962, 2006.
- DI MARTINO, A., Sittinger, M., Risbud, M.V., Review; Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering, *Biomaterials*, 26, 5983–5990, 2005.
- DORNISH, M., Kaplan, D., Skaugrud, O., Standards and guidelines for biopolymers in tissue-engineered medical products, *Ann N Y Acad Sci*, 944, 388–97, 2001.
- EVERAERTS, F., Torrianni, M., Hendriks, M., Feijen, J., Biomechanical properties of carbodiimide crosslinked collagen: Influence of the formation of ester crosslinks, *Journal of Biomedical Materials Research*, 85, 547-555, 2008.
- GADES, M.D., Stern, J.S., Chitosan supplementation and fat absorption in men and women, *Journal of the American Dietetic Association*, 105, 72-77, 2005.
- GEORGE, M., Abraham, T.E., Review: Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan, *J. Control. Release*, 114, 1–14, 2006.
- HENCH, L.L., Wilson, J. Advanced Series in Ceramics vol 1: An introduction to bioceramics, ed: McLaren, M., Niesz, D.E., World Scientific Pub, London, 1-4, 1993.
- HIROSHI, U., Takashi, M., Toru, F., Topical formulations and wound healing applications of chitosan, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52, 105-115, 2001.
- HUANG, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A., Madihally, S.V., In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 26, 7616-7627, 2005.

IGNATIUSA, A., Blessinga, H., Liederta, A., Schmidta, C., Neidlinger-Wilkea, C., Kaspara, D., Friemertb, B., Claesa, L., Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices, *Biomaterials*, 26, 311–318, 2005.

ISHIHARA, M., Nakanishi, K., Ono, K., Sato, M., Kikuchi, M., Saito, Y., Yura, H., Matsui, T., Hattori, H., Uenoyama, M., Kurita, A., Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process, *Biomaterials*, 23, 833–840, 2002.

KAS, H.S., Review chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems, *Jornal of Microencapsulation*, 14, 689–711, 1997.

KAWAI, K., Suzuki, S., Tabata, Y., Ikada, Y., Nishimura Y., Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis, *Biomaterials*, 21, 5, 489-499, 2000.

KHOR, E., Lim, L.Y., Implantable applications of chitin and chitosan, *Biomaterials*, 24, 2339–2349, 2003.

KIM, H-W, Kim, H-E, Salih, V., Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin–hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds, *Biomaterials*, 26, 5221-5230, 2005.

KIZILTAY A., Hindie M., Hasirci N., Hasirci V., Micropatterned chitosan films for cell guidance, *Tissue Engineering Part A*, 14, 880-880, 2008.

KLOKKEVOLD, P.R., Vandemark, L., Kenney, E.B., Bernard, G.W., Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro, *J Peridont*, 67, 1170–5, 1996.

KONG, L., Gao, Y., Lu, G., Gong, Y., Zhao, N., Zhang, X., A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *European Polymer Journal*, 42, 3171-3179, 2006.

KUIJPERS A.J., Engbers G.H.M., Feijen J., De Smedt S.C., Meyvis T.K.L., Demeester J., Krijgsveld J., Zaat S.A.J., Dankert J., Characterization of the

network structure of carbodiimide cross-linked gelatin gels, *Macromolecules*, 32, 3325-3333, 1999.

KUMAR, M.N.V.R., A review of chitin and chitosan applications, *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1–27, 2000.

LANGER, R., Biomaterials in Drug Delivery and Tissue Engineering: One Laboratory's Experiences, *Accounts of Chemical Research*, 33, 94-101, 2000.

MA, P.X., Scaffolds for tissue fabrication, *Materials Today*, 7, 30-40, 2004.

MADIHALLY, S.V., Matthew, H.W.T., Porous chitosan scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 20, 1133–1142, 1999.

MAMORU, S., Tetsuhiko, I., Manabu, K., Method for synthesis of hydroxyapatite, and hydroxyapatite complex and method for preparing the same, *US Patent 6592989*, 2003.

MANAFI, S.A., Yazdani, B., Rahimiopour, M.R., Sadrnezhad, S.K., Amin, M.H., Razavi, M., Synthesis of nano-hydroxyapatite under a sonochemical/hydrothermal condition, *Biomedical Materials*, 3, 1-6, 2008.

MARTUCCIA, J.F., Ruseckaitea, R.A., Vázquez, A., Creep of glutaraldehyde-crosslinked gelatin films, *Materials Science and Engineering: A*, 435-436, 681-686, 2006.

MUVAFFAK, A, Gurhan, I, Hasirci, N., Prolonged cytotoxic effect of colchicine released from biodegradable microspheres, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 15, 295-304, 2004.

ONG, S.Y., Wu, J., Moochhala, S.M., Tan, M.H., Lu, J., Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties, *Biomaterials*, 29, 4323-4332, 2008.

OZCAN, C., Hasirci, N., Evaluation of Surface Free Energy for PMMA Films, *Journal of Applied Polymer Science*, 108, 438–446, 2008.

QUARTO, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S.M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E., Marcacci, M., Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells, *N Engl J Med*, 6, 344-385, 2001.

RABEA, E.I., Badawy, M.E.-T., Stevens, C.V., Smagghe, G., Steurbaut, W., Reviews: Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action, *Biomacromolecules*, 4, 1457-1465, 2003.

REZWANA, K., Chena, Q.Z., Blakera, J.J., Boccaccini, A.R., Review: Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 27, 3413-3431, 2006.

RIZZI, S.C., Heath, D.J., Coombes, A.G.A., Bock, N., Textor, M., Downes, S., Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: Surface analysis and initial attachment of human osteoblasts, *Journal of Biomedical Materials*, 55, 475-486, 2001.

ROCHET, N., Balaguer, T., Boukhechba, F., Laugier, J.-P., Quincey, D., Goncalves, S., Carle G.F., Differentiation and activity of human preosteoclasts on chitosan enriched calcium phosphate cement, *Biomaterials*, 30, 4260-4267, 2009.

ROHANIZADEH, R., Swain, M.V., Mason, R.S., Gelatin sponges (Gelfoam®) as a scaffold for osteoblasts, *J Mater Sci: Mater Med*, 19, 1173-1182, 2008.

ROSELLINI, E., Cristallini, C., Barbani, N., Vozzi, G., Giusti, P., Preparation and characterization of alginate/gelatin blend films for cardiac tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91, 447-453, 2009.

SARASAM A.R., Brown P., Khajotia S.S., Dmytryk J.J., Madihally S.V., Antibacterial activity of chitosan-based matrices on oral pathogens, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 1083-1090, 2008.

TANG, X.J., Gui, L., Lü, X.Y., Hard tissue compatibility of natural hydroxyapatite/chitosan composite, *Biomedical Materials*, 3, 1-9, 2008.



- TIĞLI, R.S., Gümüşderelioğlu, M., Evaluation of alginate-chitosan semi IPNs as cartilage scaffolds, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 699-709, 2009
- ULUBAYRAM, K., Cakar, A.N., Korkusuz, P., Ertan, C., Hasirci, N., EGF containing gelatin-based wound dressings, *Biomaterials*, 22, 1345-1356, 2001.
- VIJAYALAKSHMI, U., Rajeswari, S., Preparation and Characterization of Microcrystalline Hydroxyapatite Using Sol Gel Method, *Trends Biomaterials Artificial Organs*, 19, 57-62, 2006.
- WANG, A., Ao, Q., Cao, W., Zhao, C., Gong, Y., Zhao, N., Zhang, X., Fiber-Based Chitosan Tubular Scaffolds for Soft Tissue Engineering: Fabrication and in Vitro Evaluation, *J Tsinghua Science & Technology*, 10, 449-453, 2005.
- WANG, X., Wang, X., Tan, Y., Zhang, Bo., Gu, Z., Li, X., Synthesis and evaluation of collagen-chitosan-hydroxyapatite nanocomposites for bone grafting, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 89, 1079-1087, 2008.
- WANG, Y., Yin, S., Ren, L., Zhao, L. Surface characterization of the chitosan membrane after oxygen plasma treatment and its aging effect, *Biomedical Materials*, 4, 1-7, 2009.
- WHITE, S.C., Atchison, K.A., Gornbein, J.A., Nattiv, A., Paganini, A., Service, S.K., Risk factors for fractures in older men and women: The leisure world cohort study, *Hard Gender Medicine*, 3, 2, 2006.
- WOODARD, J.R., Hildorea, A.J., Lanb, S.K., Park, C.J., Morgan, A.W., Eurell, J.A.C., Clark, S.G., Wheeler, M.B., Jamison, R.D., Johnson, A.J.W., The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity, *Biomaterials*, 28, 45-54, 2007.
- XIA, Z., Breward, C.J.W., Tissue Engineering of Bone: The role of osteoblasts and osteoclasts, *Description for a problem studied at the UK Mathematics-in-Medicine Study Group*, Strathclyde, 2004.

YILGOR, P., Tuzlakoglu K., Reis R.L., Hasirci N., Hasirci V., Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 30, 1–9, 2009.

ZHANG, R., Tang, M., Bowyer, A., Eisenthal, R., Hubble, J., A novel pH- and ionic-strength sensitive carboxy methyl dextran hydrogel, *Biomaterials*, 26, 4677-4683, 2005.

ZIVANOVIC, S., Li J., Davidson P.M., Kit K., Physical, Mechanical and Antibacterial Properties of Chitosan/PEO Blend Films, *Biomacromolecules*, 8, 1505-1510, 2007.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No: 109M325</b>
<b>Proje Başlığı:</b> Kitosan-Jelatin Yapıların Doku Mühendisliği Amaçlı 2-D ve 3-D Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Biyouyumluluk Özelliklerinin İncelenmesi
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Prof. Dr. Nesrin Hasırcı Cansel Işıklı Aysu Küçükturhan
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> ODTÜ Kimya Bölümü, 06531, Ankara
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> Destekleyen başka kuruluş bulunmamaktadır.
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01/08/2009-01/08/2010
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Doku mühendisliği polimerik destek yapıları kullanarak hücre dışı matriksi taklit edip zarar görmüş doku bölgelerini iyileştirmeyi amaçlar. Bu çalışmada doku mühendisliğine yönelik özellikle kemik hasarlarının tedavisinde kullanılmak üzere iki- ve üç-boyutlu kitosan-jelatin/hidroksiapatit yapılar hazırlanmıştır. Hazırlanan bu yapılar FTIR-ATR, SEM, DSC, TGA gibi karakterizasyon yöntemleriyle incelenmenin yanı sıra mekanik, şişme ve yüzey testlerine de tabii tutulmuştur. Osteoblast hücreleriyle etkileşimleri ise MTS analizi ve çeşitli mikroskopik yöntemlerle araştırılmıştır.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Kitosan, jelatin, hidroksiapatit, doku mühendisliği
<b>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu?</b> Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input type="checkbox"/>
Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> <b>Hazırlanan Yayınlar:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Cansel Isikli, Vasif Hasirci, Nesrin Hasirci. 'Development of Porous Chitosan-Gelatin/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Hard Tissue Engineering Applications', <i>Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine</i>, sunuldu, 2010.</li><li>Cansel Isikli, Tugba Endogan, Aysel Kiziltay, Vasif Hasirci, Nesrin Hasirci. 'Preparation and Characterization of Chitosan-Gelatin/Hydroxyapatite Composite Films', <i>Carbohydrate Polymers</i>, sunuldu, 2010.</li><li>Tugba Endogan, Cansel Isikli, Mariangela Fedel, Antonella Motta, Andrea Morelli, Federica Chellini, Nesrin Hasirci. 'Protein and polysaccharide-based 2D-films: a comparison of the physicochemical, mechanical and biological properties', Hazırlanmakta, 2010.</li></ul>

**Toplantı Sunumları:**

- Biomedical Science and Technology Symposium-Poster Sunumu  
ODTÜ- Kuzey Kıbrıs Kampüsü Güzelyurt KKTC 2009
- International Symposium on Biotechnology-Poster Sunumu  
ODTÜ- Ankara 2009
- European Conference on Biomaterials-Poster Sunumu  
European Society for Biomaterials- Lozan 2009
- European Symposium on Biopolymers-Poster Sunumu  
3B's Research Group in Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics- Portekiz 2009
- Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı-Sözlü Sunum  
Akdeniz Üniversitesi- Antalya 2010
- International Bioengineering Congress-Poster Sunumu (**En İyi Poster Ödülü**)  
Ege Üniversitesi- İzmir 2010
- Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) EU-  
Poster Sunumu  
TERMIS- Galway 2010