İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜSTÜN MEKANİK ÖZELLİKLERE SAHİP İPEK FİBROİN İSKELETLERİNİN YÜKSEK FİBROİN KONSANTRASYONLARINDA ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Caner AKINCI

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oğuz OKAY

ARALIK 2015

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜSTÜN MEKANİK ÖZELLİKLERE SAHİP İPEK FİBROİN İSKELETLERİNİN YÜKSEK FİBROİN KONSANTRASYONLARINDA ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Caner AKINCI

(509121037)

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oğuz OKAY

ARALIK 2015

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509121037 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Caner AKINCI, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı " Üstün Mekanik Özelliklere Sahip İpek Fibroin İskeletlerinin Yüksek Fibroin Konsantrasyonlarında Üretimi " başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

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

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

Doç. Dr. Suzan ABDURRAHMANOĞLU.....
Marmara Üniversitesi

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

Aileme,

ÖNSÖZ

Kendisi ile çalışma fırsatı veren, mesleğine olan sevgisini hayranlıkla örnek aldığım, adım attığım bu yolda bana idol olan değerli hocam Prof. Dr. Oğuz OKAY'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Yaşadığım her anda desteğini hissettiğim ve hissedeceğim aileme teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimde beni motive eden, desteğini hep hissettiğim Dilek İKİZ' e teşekkür ederim.

Bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen Arş. Gör. Ümit GÜLYÜZ'e, çalışmam boyunca yardımını eksik etmeyen Aslıhan ARĞUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Araştırma grubumuzda aynı amaç uğruna beraber emek harcadığım diğer tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi iletirim.

Yüksek lisans eğitim döneminde proje dahilinde çalışmamı sağlayan TÜBİTAK' a (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştıma Kurumu) ve dönem boyunca burs sağlayan TÜBA' ya (Türkiye Bilimler Akademisi) teşekkür ederim.

Aralık 2015 Caner AKINCI

(Kimyager)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **vii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
KISALTMALAR ..... **xi**
SEMBOLLER ..... **xiii**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xv**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xvii**
ÖZET ..... **xix**
SUMMARY ..... **xxi**
1. GİRİŞ **1**
2. TEORİK BİLGİ **5**
2.1 Hidrojeller 5
2.2 Makrogözenekli Jeller 9
2.3 Kriyojeller 10
2.3.1 Kriyojellerin uygulamaları 14
2.4 İpek ve İpek Fibroin 15
2.4.1 İpek fibroin kriyojelleri 19
3. DENEYSEL KISIM **23**
3.1 Kullanılan Kimyasallar 23
3.2 İpek Kozasından Fibroin Eldesi ve Sulu Fibroin Çözeltisinin Hazırlanması 24
3.3 İpek Fibroin Kriyojellerinin Sentezi 25
3.4 İpek Fibroin Kriyojellerinin Karakterizasyonu 27
3.4.1 Şişme davranışları ve jel kesri 27
3.4.2 Mekanik ölçümler 28
3.4.3 Morfolojik özelliklerin incelenmesi 30
3.4.4 ATR-FTIR ölçümleri 31
4. BULGULAR ve DEĞERLENDİRMELER **33**
4.1 Çapraz Bağlayıcı Varlığında Hazırlanan Kriyojellerin Özellikleri 33
4.1.1 Jel kesri ve şişme özellikleri 33
4.1.2 Kriyojel ağyapı zincirlerinin konformasyonu 38
4.1.3 Morfolojik özellikler 41
4.1.4 Mekanik özellikler 43
4.2 Sürfaktan Varlığında Elde Edilen İpek Fibroin Kriyojellerinin Özellikleri 51
4.2.1 Jel kesri ve şişme özellikleri 52
4.2.2 Kriyojel ağ yapı zincirlerinin konformasyonu 54
4.2.3 Young modüllerin belirlenmesi 55
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **59**
KAYNAKLAR **63**
ÖZGEÇMİŞ **69**

KISALTMALAR

İF **:** İpek Fibroin
BDDE **:** 1,4-bütandiol diglisidil eter
SDS **:** Sodyum dodesil sülfat
TEMED **:** *N,N,N',N'*- tetrametilendiamin
EGDE **:** Etilen glikol diglisidil eter
SEM **:** Taramalı elektron mikroskobu
ATR-FTIR **:** Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektrometresi
IVD **:** İntervertebral disk
UV **:** Ultraviole
PEG **:** Poli(etilen glikol)

SEMBOLLER

C_{iF}	: İpek fibroin konsantrasyonu
m_o	: Sentez sonrası ağırlık
D_o	: Sentez sonrası çap
$m_{şişmiş}$	: Şişmiş durumdaki ağırlık
$D_{şişmiş}$	: Şişmiş durumdaki çap
m_{kuru}	: Kuru durumdaki ağırlık
D_{kuru}	: Kuru durumdaki çap
W_g	: Jel kesri
m_{rel}	: Ağırlıkça bağıl şişme oranı
V_{rel}	: Hacimce bağıl şişme oranı
q_v	: Kuru duruma göre hacimce şişme oranı
q_w	: Kuru duruma göre ağırlıkça şişme oranı
ρ	: Yoğunluk
P	: Gözeneklilik
E	: Young modül
σ_{nom}, $\sigma_{gerçek}$	: Nominal gerilim, Gerçek gerilim
σ_{plato}	: Plato gerilimi
$\sigma_{parçalanma}$	: Parçalanma gerilimi
F	: Kuvvet
A, A_0	: Kesit alanı, İlk kesit alanı
L, L_0	: Uzunluk, İlk uzunluk
λ	: Deformasyon oranı

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge3.1 : BDDE çapraz bağlayıcı varlığında kriyojellerinin eldesinde kullanılan kimyasalların miktarları..... **26**

Çizelge 3.2 : Sürfaktan varlığında kriyojellerinin eldesinde kullanılan kimyasalların miktarları. **27**

Çizelge 4.1 : Çapraz bağlayıcı kullanılarak farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında elde edilen kriyojellerin jel kesirleri, şişme oranları ve % gözeneklilik değerleri. Çizelgede ± kolonunda değerlerin standart sapmaları verilmiştir. **34**

Çizelge 4.2 : Farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında ($C_{İF}$) elde edilen kriyojellerin yüzde konformasyon oranları.. ..... **41**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Polimerik jel yapısının genel gösterimi. **5**
Şekil 2.2 : Çözücü içerisindeki hidrojellerin şişme davranışının şematik gösterimi... **6**
Şekil 2.3 : Hidrojellerin belli özelliklere göre sınıflandırılması **6**
Şekil 2.4 : Kuvvet etkisiyle parçalanan hidrojel (A) ile hidrofobik modifiye sonucunda dağılmayan hidrojelin (B) gösterimi **8**
Şekil 2.5 : Kriyojelleşme yöntemi ile elde edilen makro gözenekli kriyojellerin sentez aşamalarının şematik gösterimi **11**
Şekil 2.6 : Aminoasit içeren polimerik zincirlerin epoksi grupları ile reaksiyonu. ... **12**
Şekil 2.7 : Kriyojellerin gözenek yapılarının şematik gösterimi **13**
Şekil 2.8 : İpek kaynaklarından olan *Bombyx Mori* (a) ve örümcek (b)..... **15**
Şekil 2.9 : *Bombxy Mori* türü ipek kozası (a) ve ipek kozasının fibroin ve serisinden oluşan katman yapısı (b) **16**
Şekil 2.10 : Hidrofobik ve hidrofilik bölgerden oluşan ağır fibroin zincirinin şematik gösterimi … **16**
Şekil 2.11 : İpek fibroinde oluşan ikincil yapı konformasyonları 1**7**
Şekil 2.12 : Paralel ve antiparalel β-tabaka oluşumları 1**8**
Şekil 2.13 : İpek fibroin kriyojellerinin (solda) ve gözenekli yapılarının (sağda) örnek gösterimi **19**
Şekil 2.14 : Fibroin zincirlerinin çapraz bağlanmasıyla meydana gelen β-tabaka oluşumlarının gösterimi **20**
Şekil 2.15 : Şişmiş kriyojellerinin mekanik ölçüm sırasındaki görüntüleri..... **21**
Şekil 3.1 : 1,4 bütandiol diglisidil eter..... **23**
Şekil 3.2 : *N,N,N',N'*- tetrametiletilendiamin **23**
Şekil 3.3 : Sodyum dodesil sülfat **24**
Şekil 3.4 : Gerilim-gerinim eğrisinde plato geriliminin ve eğri bölgelerinin örnek gösterimi..... **29**
Şekil 3.5 : Deformasyon oranına karşı çizilen nominal (mavi) ve gerçek gerilim eğrilerinde (kırmızı) parçalanma geriliminin belirlenmesi **31**
Şekil 4.1 : Farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında ($C_{İF}$) elde edilen kriyojellerin jel kesri sonuçları **35**
Şekil 4.2 : Farklı ipek fibroin konsantrasyonlarındaki ($C_{İF}$) kriyojellerin m_{rel} (●) ve V_{rel} (○) değerleri **36**
Şekil 4.3 : Farklı İF konsantrasyonlarında sentezlenen kriyojellerin q_w(●), q_v (○) değerleri ve teorik q_w eğrisinin (=1/$C_{İF}$, kesikli eğri) gösterimi..... **37**
Şekil 4.4 : Fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak değişen gözeneklilik yüzdesi **38**
Şekil 4.5 : İpek fibroinin jelleşme öncesi (kesikli eğri) ve BDDE ile jelleşme sonrası (kalın eğriler) ATR- FTIR spektrumları. Kriyojelleşme sırasındaki fibroin konsantrasyonları (%) şekilde verilmiştir **39**

Şekil 4.6 : Farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında ($C_{İF}$) elde edilen kriyojellerinin Amid I bölgesi ATR-FTIR spektrumları. *Peak Fit* yazılımı ile elde edilen spektrum (kalın eğri), orijinal ATR-FTIR spektrumu (noktasal eğri) ve orijinal spektrum altında kalan gizli pikler (ince eğri) **40**
Şekil 4.7 : Fibroin ve BDDE çapraz bağlayısı ile farklı fibroin konsantrasyonlarında sentezlenen fibroin ağ yapılarının SEM görüntüleri. Skala (soldan sağa) = 1 mm, 50 μm, 10 μm, Büyütme oranı (soldan sağa) = x25, x500, x100. **42**
Şekil 4.8 : Fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak Young modülün (E) değişimi. . **44**
Şekil 4.9 : Farklı fibroin konsantrasyonlarında ($C_{İF}$) sentezlenen kriyojellerin nominal (A) ve gerçek (B) gerilim – deformasyon oranı eğrileri. **45**
Şekil 4.10 : Kriyojellerin fibroin konsantrasyonlarına bağlı olarak ($C_{İF}$) değişen plato gerilimleri (A) ve basınç dayanımları (B) **46**
Şekil 4.11 : Farklı konsantrasyonlarda elde edilen kriyojellerin deformasyon oranına (λ) karşı çizilen nominal gerilim σ_{nom} (kesikli eğriler) ve gerçek gerilim $\sigma_{gerçek}$ (kesiksiz eğriler) eğrileri ve parçalanma gerilimi ($\sigma_{parçalanma}$) ile deformasyon oranının belirlenmesi **47**
Şekil 4.12 : İpek fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak incelenen parçalanma gerilimleri (A) ve % deformasyon oranları (B) **49**
Şekil 4.13 : Kuru(●) ve şişmiş(○) durumdaki kriyojellerin Young modüllerinin (*E*) karşılaştırılması **50**
Şekil 4.14 : Şişmiş (○) ve kuru (●) durumdaki kriyojellerin plato gerilimleri (A) ve basınç dayanımlarının (B) karşılaştırılması **51**
Şekil 4.15 : % 4,2 fibroin konsantrasyonunda farklı SDS miktarlarında elde edilen kriyojellerin jel kesri (W_g) sonuçları **52**
Şekil 4.16 : Farklı SDS miktarında elde edilen kriyojellerin m_{rel} (●) ve V_{rel} (○) değerleri **53**
Şekil 4.17 : Farklı SDS miktarındaki kriyojellerin q_w (●) ve q_v (○) değerleri **54**
Şekil 4.18 : SDS ile fibroin zincirleri arasında oluşan hibrofobik etkileşimler ve β-tabaka oluşumu **54**
Şekil 4.19 Fibroinin jelleşme öncesi (kesikli eğri) ve SDS varlığında jelleşme sonrası (kesiksiz eğriler) ATR- FTIR spektrumları **55**
Şekil 4.20 : SDS varlığında elde edilen ipek fibroin kriyojellerinin kuru durumdaki SEM görüntüleri. SDS = 5 mM (üst sıra) ve 20 mM (alt sıra). Skala (soldan sağa) = 1 mm, 100 μm, 50 μm, Büyütme oranı (soldan sağa) = x25, x100, x500, Fibroin konsantrasyonu = % 4,2 ..... **56**
Şekil 4.21 : % 4,2 İF konsantrasyonunda farklı SDS miktarlarında elde edilen kriyojellerin Young modülleri (E) **57**

ÜSTÜN MEKANİK ÖZELLİKLERE SAHİP İPEK FİBROİN İSKELETLERİNİN YÜKSEK FİBROİN KONSANTRASYONLARINDA ÜRETİMİ

ÖZET

Dejeneratif, cerrahi ya da travmatik süreçlere bağlı olarak oluşan kemik kırıklarında veya kemik doku kayıplarında iyileşmeyi ve yenilemeyi sağlamak için doku isketleri kullanılmaktadır. Doku isketleri bu süreçte hücrelerin doğal yapılarına ulaşması için, destekleyici ve koruyucu olmalıdır. Ayrıca, toksik olmamalı, biyouyumlu ve biyobozunur olmalı en önemlisi kolayca üretilmelidir. Doku iskeletleri, sadece biyolojik değil aynı zamanda belirli kimyasal ve fiziksel özellikleri de sağlamalıdır. Bu nedenle mekanik fonksiyonlarını yerine getirecek sağlamlık ve sertliğe sahip olmalıdır. Birbiri ile bağlantılı gözenekli yapısı kontrol edilebilir ve gözeneklilik oranı % 90'nın üzerinde olmalıdır. Anlaşılacağı gibi, doku isketlerinde gözeneklilik ve mekanik özellikler arasındaki bu yakın ilişki oldukça fazla öneme sahiptir.

Hidrojellerin pratik uygulamalarında, dışarıdan gelen uyarılara hızlı tepki vermesi, aynı zamanda mekanik dayanımının çok yüksek olması amaçlanmaktadır. Ancak, hidrojellerin uygulamalarını sınırlayan en büyük etken mekanik olarak dayanıksız oluşlarıdır. Dayanıklı ve tok hidrojellerin eldesi için son yıllarda yoğun araştırmalar yapılmakta, çeşitli teknikler geliştirilmekte, diğer yandan onlara makrogözenekli bir yapı kazandırılması amacıyla çalışmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalar ışığında kriyojelleşme tekniği ile makro gözenekli ve mekanik özellikleri geliştirilmiş jellerin elde edilmesi mümkün olmaktadır.

Kriyojelleşme, reaksiyon çözeltisinin donma noktasının altındaki uygun bir sıcaklıkta soğutularak oluşan çözücü kristallerinin etrafındaki donmamış mikro bölgelerde konsantrasyon artışına bağlı olarak ilerler. Kriyokonsantrasyon etkisi olarak adlandırılan bu durum, kriyojeleşmenin temel prensibidir. Elde edilen jelin (kriyojel) üstün özelliklerinin oluşmasında etkilidir. Donmuş çözücü ise, kalıp etkisi oluşturarak kriyojelleşme sonrasında eritilmesiyle, birbiri ile bağıntılı gözenekleri oluşturmasını sağlar.

Kemik doku mühendisliğinde yapı iskeleti olarak kullanılması amacıyla, biyobozunur, biyouyumlu ve üstün mekanik özelliklere sahip olan ipekten yola çıkarak, laboratuarımızda kriyojeller üretilmiştir.

İpek yapısında bulunan fibroin proteini, başlıca glisin ve alanin amino asit ünitelerinden oluşan ve hidrofobik bloklar ile bunların aralarında hidrofilik bloklar içeren bir kopolimer yapısındadır. Hidrofilik bloklar suda çözünürlüğü sağlarken, hidrofobik bloklar arası asosiyasyonlar, fibroinin rastgele yumak yapısından β-tabaka yapısına bir konformasyon geçişine neden olur. İpek fibroinin (İF) yapısındaki β-tabakaları malzemeye dayanıklılık ve sertlik kazandırırken, daha düzensiz olan hidrofilik bloklar tokluğu ve elastisiteyi arttırır.

Tez kapsamında yapılan deneysel calışmalarda, gerek 1,4-bütandiol diglisidil eter (BDDE) çapraz bağlayıcısı ve gerekse sodyum dodesil sülfat (SDS) sürfaktanı kullanılarak fibroinin β-tabaka konformasyonuna geçişi sağlanmış ve kriyojeller elde edilmiştir.

BDDE çapraz bağlayıcı kullanılarak,fibroinin jelleşmesi -18ºC' de, 24 saatte gerçekleştirilmiştir. % 1 ile % 61,4 arasında değişen fibroin konsantrasyonlarında hazırlanan kriyojellerin şişme özellikleri, konformasyonel değişimleri, mekanik özellikleri ve gözenekli yapısı açıklanmıştır. Fibroinin jelleşmesi sırasındaki konformasyonel değişimler *ATR-FTIR* ölçümleri ile belirtilmiştir. Kriyojelleşme ile fibroin rastgele yumak yapısından β-tabakaya geçişi gösterilmiştir. Şişme ölçümleri yapılmış kriyojellerin hacimce ilave şişmeyip, fakat kütlece şiştiği belirtilmiştir. Şişme ölçümleri sonucunda gözeneklilik oranının fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak % 97 ile % 69 arasında ayarlanabileceği ortaya çıkmıştır. Farklı fibroin konsantrasyonlarında hazırlanan kriyojellerin kuru durumdaki mekanik özellikleri test edilmiştir. En çarpıcı sonuç, % 46,2 İF konsantrasyonunda hazırlanan kriyojelin Young modülünün 126 MPa değerine ulaşmasıdır. Ayrıca, kriyojellerin parçalanma gerilimleri ve deformasyon oranları belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan tüm kriyojeller % 95-100' e kadar deforme olabilmektedirler. Kriyojellerin parçalanma gerilimleri 243 MPa kadar çıkmaktadır. *SEM* görüntüleri incelenmiş, kriyojelleşme ile düzenli gözeneklerin oluştuğu görülmüştür. Gözenek boyutu ile mekanik özellikler arasındaki ilişki açıklanmıştır. Artan fibroin konsantrasyonuyla gözenek duvarlarının kalınlaştığı, gözenek boyutlarının küçüldüğü, kriyojellerin daha dayanıklı olduğu yorumlanmıştır. Kuru durumdaki ölçümlerine ek olarak, suda dengeye gelmiş kriyojellerin mekanik ölçümleri yapılmıştır. Kuru durumdakilere oranla, mekanik test sonuçlarının önemli ölçüde düştüğü saptanmıştır. Şişmiş kriyojellerin bu durumu, fibroin ağ yapı zincirlerinin hidrofilik yapısı nedeniyle gözenek suyunu tutması ve kauçuksu duruma geçmesi ile açıklanmıştır.

SDS sürfaktanı kullanılarak, ipek fibroinin jelleşmesi kriyojelleşme tekniği ile hızlandırılmıştır ve -18ºC' de ve 48 saatte gerçekleştirilmiştir. SDS sürfaktanının fibroin zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşimleri tetiklediği ve böylece jelleşmeyi sağlayan ajan olarak davrandığı düşünülmektedir. % 4,2 İF konsantrasyonunda 5 mM ile 125 mM arasındaki farklı SDS konsantrasyonlarında kriyojeller sentezlenmiştir. Sürfaktan miktarının, fibroinin kriyojelleşme prosesinde önemli bir farklılığa yol açmadığı gözlemlenmiştir. Tüm SDS konsantrasyonlarında kriyojellerin şişme özellikleri benzer davranış göstermiştir ve gözeneklilik % 97 civarında hesaplanmıştır. Mekanik ölçümler sonucunda 5 mM SDS konsantrasyonunda elde edilen kriyojelin biraz daha sağlam olduğu gözlenmiştir. Düşük SDS konsantrasyonlarında fibroin zincirleri arasında oluşan hidrofobik blokların daha düzenli olduğu düşünülmüştür. *SEM* görüntüleri incelendiğinde 5 mM SDS konsantrasyonundaki kriyojelin gözenekli yapısının daha iyi olduğu görülmüş ve mekanik özellikler ile tutarlı olduğu saptanmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda, ipek fibroinin donmuş sulu çözeltilerinde kriyojelleşmesi ile makro gözenekli, hemen hemen % 100 deforme olabilen, mekanik özellikleri çok iyi kriyojeller elde edilmistir. Bu tip malzemeler, kemik doku mühendisliği uygulamalarında yapı iskeleleri olarak kullanıma uygun iskeletlerdir.

PRODUCTION OF SILK FIBROIN SCAFFOLDS WITH REMARKABLE MECHANICAL PROPERTIES AT HIGH FIBROIN CONCENTRATIONS

SUMMARY

The deformation and degeneration of bone with age, trauma, congenital defects, and tumor cause not repairable damage to bone, resulting in increasing requirements for bone implants. Bone tissue engineering is a promising strategy to regenerate bone and is regarded as a future alternative to current clinical treatments. In this whole process, the patient's own cells could be used which would be a key tool for personalized medicine. The aim is to make 3D bone tissues by combining cells, scaffolds and to some extent also growth factors or mechanical stimuli. One of the main challenges is the choice of an appropriate biomaterial which can mimic the natural bone tissue matrix with its mechanical and biological characteristics to support tissue development. Various materials have been tested for bone tissue engineering purposes. An ideal scaffold for bone tissue engineering should be biocompatible, biodegradable with an architecture that mimics in vitro extra cellular matrix and possess good mechanical properties to facilitate bone formation. Pore structure also is an essential consideration in the development of scaffolds for tissue engineering. Pores must be interconnected to allow for cell growth, migration and nutrient flow.

Regeneration of large bone defects is challenging in the next few years because the age of the population is growing. In recent years, many novel materials and processing methods have been introduced to construct the native bone extracellular matrix and restore the functions of degenerated bone. Silk fibroin as a natural polymer, has established a good reputation for bone tissue engineering applications due to its many unique properties. Silks are generally defined as protein polymers that are synthesized and spun into fibers by many organisms, including silkworms, spiders, scorpions, mites and flies. The more commonly utilized silk, such as from the silkworm, *Bombyx Mori*, has been used for thousand years due to its visual appeal and mechanical properties. The silk consist of fibroin held together with a layer of sericin on their surfaces. Upon degumming silk to remove the sericin, one obtains fibroin fibers for many applications.

Silk fibroin derived from *Bombyx Mori* is a fibrous protein exhibiting extraordinary material properties such as good biocompibility, biodegradabilitiy, high strength and toughness and also ease of processability. Silk fibroin has been used for cell culture, wound dressing, drug delivery and it has been proven to be a promising biomaterial for scaffold fabrication in general and its remarkable mechanical properties appreciate it for bone tissue engineering applications. Silk fibroin has a blocky structure consisting of less ordered hydrophilic and crystallizable hydrophobic blocks. Hydrophilic blocks provide solubility in water and responsible for fibroin

elasticity and toughness, while hydrophobic blocks form intermolecular β-sheet structures leading to the insolubility and high strenght of fibroin.

One class of polymeric materials is hydrogels, which consist of three-dimensional solid networks made from crosslinked hydrophilic polymer chains swollen in water. Owing to their outstanding characteristics such as water absorption and retention ability, biocompatibility and tunable physical, chemical and biological properties, polymeric networks are excellent candidates for a broad range of biomedical applications, which include scaffolds for tissue engineering, carriers for drug delivery, molecular filters in biological science and superabsorbent devices. Furthermore, when exposed to an environmental signal such as temperature and pH, some sensitive hydrogels are able to respond and translate this stimulus into a macroscopic event, allowing their application as sensors or actuators and smart drug release devices. But, the most interesting feature about these 3D networks is their high resemblance, in terms of structure and physical properties, with the native extracellular matrix, highlighting their potential for tissue engineering and biomedical purposes. However, their use in stress-bearing applications is often hindered since hydrogels, when highly swollen, often lack of mechanical properties such as strength, toughness, elongation and recoverability. This poor mechanical performance is in high contrast with native structural hydrogels such as cartilage, bone, tissue and may result in unintended failure in vivo. Hydrogels were classified as mechanical weak materials. Nevertheless, in the last few years, new strategies have been developed to toughen hydrogels including double networks, topological and nanocomposite hydrogels and also cryogels; allowing the application of these 3D structures, for instance, as artificial substitutes of native tissues with structural properties similar to hydrogels such as skin , heart valves, spinal disks , cartilage , muscles and nerves.

In recent years, strategies for the synthesis of macroporous gels have been continually optimized and the concept of cryogelation has become increasingly important for the synthesis of such smart materials. Cryogelation is a simple strategy that allows the preparation of macroporous gels with high toughness and superfast responsivity. Cryogels are producted in frozen systems known as cryogelation. Cryogels are very tough gels that can withstand high levels of deformation, and can be squeezed almost completely without any crack propagation. Current research in the field of macroporous gels is focused on formation the pore structure. The crosslinking reactions at subzero temperatures that lead to cryogels are multicomponent systems composed of a polymer network with solvent crystals. All concentrations and properties of the system components change continuously during the cryogelation process. A more complete understanding of this complicated gel formation system is needed in order to improve the structuring of cryogels overall length scales from nanometer to micrometer. Moreover, because the volume swelling ratio of the cryogels and their porosity are inversely coupled, new synthetic approaches are also needed for the preparation of cryogels exhibiting drastic volume changes in response to external stimuli. In cryogelation reaction solution, generally containing the monomer and the iniator, is cooling below the freezing point of the system. Since the monomers/polymers and the iniator will be enriched in unfrozen microzones surrounded by ice crystals. The cross-linking reactions only proceed in these unfrozen regions containing a high concentration of polymer the increased polymer concentration in the unfrozen reaction zones polymer concentration in the unfrozen reaction (cryoconcentration) and is responsible for extraordinary properties

of cryogels. A macroporous structure appers due to the existence of solvent crystal acting as template or porogen for formation of pores. In contrast to the mechanically weak macroporous gels prepared by phase separation technique, cryogels are very tough and withstand very large strains without permanent deformation or fracture. Cryogel is an emerging class of biomaterials which have recently started as potential tissue scaffolds for regenerative medicine

In this thesis, formation conditions and properties of mechanically strong macroporous cryogels based on silk fibroin were investigated. Gelation reactions of silk fibroin were conducted at -18^{o}C. In the first part of this thesis, silk fibroin cryogels were synthesized at various fibroin concentrations in the presence of 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE) as a cross-linker and *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) as a catalyst. Swelling behaviour, mechanical and morphological properties of the cryogels were investigated depending on the fibroin concentration in the gelation solution. For this purpose, aqueous solutions of fibroin at various concentrations between 1 and 61.4 w/v % were mixed with BDDE and TEMED. The homogenous reaction solution was transferred into several plastic syringes of 4 mm internal diameters and then, they were placed in a thermostat at -18^{o}C to conduct the cross-linking reactions for 24 hours. Epoxide groups on the both ends of BDDE react with the amino groups of fibroin to form crosslinks between fibroin molecules. As reported before, BDDE triggers the conformational transition of fibroin from random coil to β-sheet structure and hence, fibroin gelation.

The swelling equilibrium was tested by measuring the diameter of the gel samples by using digital compass and also the swelling equilibrium was tested by weighing the gel samples. Then, the equilibrium swollen gel samples were frozen in a freeze-drying system to obtain dry cryogels. While the equilibrium weight ratio q_w decreases from 35 to 3, the equilibrium volume ratio q_v does not change much and remains around unity with increasing silk fibroin concentration. We estimated the total volume of the pores in the cryogel scaffolds from their weight q_w and volume swelling ratios q_v. Because the weight swelling ratio includes water locating in both pores and in the fibroin region of the gel, while, assuming isotropic swelling, the volume swelling only includes water in the fibroin gel, the larger the difference between q_w and q_v, the larger the amount of water in the pores, that is, the larger the volume of pores in the scaffolds. From the weight and volume swelling ratios of the cryogels, the porosity P was estimated. The porosity of cryogel scaffolds decreases from 97 to 69 % with increasing fibroin concentration from 1 to 61.4 %. Moreover, measurements also show that the gel fraction $W_g \cong 1$ at fibroin concentrations between 4 and 30 % while at higher fibroin concentrations, it becomes almost equal to 0.5.

The conformation of fibroin molecules in the cryogels was assessed by ATR-FTIR spectra of freezed-dried cryogel samples. The spectrum of fibroin before gelation is characterized by a peak at 1640 cm^{-1} indicating the presence of primarily random coil and/or α- helix conformations. After cryogelation, all samples display a main peak at 1620 cm^{-1} which was assigned to β-sheet conformation. This indicates the occurrence of a conformational transition from random coil to β-sheet structure during the cryogelation reactions.

It was also shown that the scaffolds of fibroin cryogels consist of interconnected pores. The pore size of the cryogel scaffold could be regulated depending on the

fibroin concentration. Increasing fibroin concentration led to scaffolds with thicker pore walls, but smaller pore size. The pore diameter decreased from 28 ± 7 to 9 ± 4 μm as silk fibroin concentration increased from 4.2 to 61.4 %.

Mechanical properties of the scaffolds were investigated by uniaxial compression tests. The modulus and strength of cryogel networks changed depending on the fibroin concentration at the gel preparation. The compressive modulus *E* increases from 7 ± 2 to 126 ± 2 MPa with increasing fibroin concentration from 4.2 to 46.2 %. Simultaneously, the plateau and compressive stresses also increase from 0.3 to 7.6 MPa and from 0.1 to 13 MPa, respectively, with increasing fibroin concentration. Comparison of the results of the mechanical tests with the morphology of cryogels clearly show that a decrease in the average pore diameter increases the mechanical stability of fibroin scaffolds formed by cryogelation. Furthermore, fracture stress of cryogels scaffolds also increases from 16 ± 2 to 243 ± 23 MPa with increasing fibroin concentration from 4.2 to 11.6 %. Above 11.6 % fibroin concentration, the fracture stress does not change much with increasing silk fibroin concentration. All the fibroin cryogels reported in this thesis remained mechanically stable without any fracture up to 95-100 % compressions.

In the second part of the thesis, instead of BDDE and TEMED, sodium dodecyl sulfate (SDS) was used to trigger conformational transition in fibroin and hence, fibroin gelation. The gelation reactions were carried out at a fibroin concentration of 4.2 w/v % in the presence of SDS at various concentrations between 5 and 125 mM. Homogenous reaction solution containing fibroin and SDS was transferred into several plastic syringes of 4 mm internal diameters and then, they were placed in a thermostat at -18^{o}C to conduct gelation reactions for 2 days. It was found that gelation of fibroin using SDS occurs faster than using BDDE crosslinker. We may speculate that the alkyl chains of SDS bring hydrophobic blocks of fibroin together due to hydrophobic interactions which accelerates conformational transition in fibroin chains.

The conformational change in fibroin due to the SDS-induced gelation was assessed by ATR-FTIR spectra of freezed-dried fibroin samples. The spectrum of fibroin before gelation is characterized by a peak at 1640 cm^{-1} indicating the presence of primarily random coil and/or α- helix conformations. After cryogelation, all samples display a main peak at 1620 cm^{-1} which was assigned to β-sheet conformation. This indicates the occurrence of a conformational transition from random coil to β-sheet structure in frozen fibroin solutions. We have to mention that cryogelation and thus, gelation do not occur without SDS in gelation solution.

All fibroin scaffolds formed at various SDS concentration (from 5 to 125 mM) exhibit similar swelling behavior. The equilibrium weight q_w and equilibrium volume swelling ratios q_v were measured as 35 and 1, respectively, independent of the SDS concentration. In addition, porosity of all scaffolds was calculated as 97 %

SEM images of fibroin scaffolds formed in presence of SDS showed that cryogels consist of more regular pores at low surfactant concentration. Moreover, the scaffolds formed at 5 mM SDS exhibited a compressive modulus *E* of 1.0 MPa, while it reduced to 0.2 MPa when SDS concentration is increased to 125 mM SDS.

The results thus show that, in the presence of BDDE crosslinker, silk fibroin cryogels with remarkable properties were obtained from frozen fibroin solutions (4.2−61.4%) at −18 °C. One of the unique features of fibroin cryogels is their elasticity that allows

them to resist up to 95-100 % compression without any crack development. The scaffolds obtained by freeze-drying of the cryogels consist of regular, interconnected macropores of diameters ranging from 28 to 9 μm that could be regulated by the fibroin concentration. The mechanical compressive strength and the modulus of the scaffolds increase with decreasing pore diameter, that is, with increasing fibroin content. Especially, the scaffolds produced at 46.2 % fibroin exhibit a very high compressive modulus (126 MPa) making them good candidates as bone scaffold materials.

1. GİRİŞ

İpek, binlerce çeşit örümcek, farklı türlerdeki tırtıl, güve ve kelebeğin özel epitel hücreleri tarafından salgılanan sürekli lif yapısına sahip bir biyopolimerdir [1]. İpek, beş yüzyıldan beri, yumuşak yapısı, parlaklığı ve dayanıklılığı ile tekstil malzemesi olarak günlük hayatımızda yer almaktadır. Bilinen en sağlam doğal lifleri yapısında barındırması, çelik ve kevlar gibi sentetik malzemelere alternatif olarak kullanılmasını yaygınlaştırmaktadır [2]. Ayrıca biyobozunur ve biyouyumlu olmasından dolayı biyolojik uygulamalarda tercih edilmektedir [3].

İpek, tıpta enzim bloklamada, kemik benzeri malzeme yapımında, yaraların örtüsünde, ilaç salınımında ve doku iskeleti yapımında kullanılmaktadır [4]. Üstün özelliklerinin yanı sıra kolaylıkla işlenebilirliği ile de malzeme bilimi, biyoloji, biyokimya, moleküler biyoloji, protein kimyası ve biyomühendislik gibi farklı akademik alanlarda çalışılan bir malzeme haline gelmiştir [5].

Kemik doku mühendisliği; dejeneratif, cerrahi ya da travmatik süreçlere bağlı olarak oluşan kemik doku kaybında dokunun yenilenmesini hedefleyen bir bilim dalıdır. Aynı zamanda kemik kırıklarının hızlıca iyileşmesini de amaçlamaktadır. Doku iskeleti doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmasındaki başlıca amaç kullanılan malzemenin hücre etkileşimleri için gerekli koşulları sağlaması ve yeni oluşan dokunun ekstraselüler matriks oluşumuna destek sağlamasıdır. Ekstraselüler matriksin fizyolojik işlevlerini sağlayan üç boyutlu yapının, hücrelerin doğal hallerine dönüşme sürecinde destekleyici olması ve dokuda meydana gelebilecek değişiklere karşı koruyucu özelliklere sahip olması gereklidir. Doku iskeleti, toksik olmamalı, biyouyumlu ve biyobozunur olmalı ve kolayca üretilebilmelidir [6]. Doku iskeleti; birbirleriyle bağlantılı ve dokunun hemen hemen tamamına yayılan iç gözenekliliğe başka bir deyişle gözenekliliği yüksek bir yapıya sahip olmalıdır. Bu durum; hücre yapışmasına, büyümesine, yeniden düzenlenmesine, dolayısıyla da canlı içerisinde yeni damar oluşumu için gerekli hacimsel boşluğun sağlanmasını sağlayacaktır. Gözeneklerin kendi içlerindeki bağlantıları; besleyici maddelerin ve gazların hücre içerisinde yayılmasında ve hücrelerden metabolik artıkların ya da yan

ürünlerin uzaklaştırılmasında yararlı olacaktır [7]. Gözenek büyüklüğü, gerek doku iskelesinin sağlamlığı, gerekse işlevi açısından önem taşımaktadır. Doku iskeletleri; sadece biyolojik değil, aynı zamanda belirli kimyasal ve fiziksel kriterleri de barındırmalıdır. Herhangi bir doku iskeleti; mekanik fonksiyonlarını yerine getirecek sağlamlık ve sertliğe sahip olmalıdır. Örneğin, deriye yönelik hasarda kullanılacak bir doku iskeleti, yara kontraksiyon kuvvetleri (şişme veya büzülme oluşturan kuvvetler) karşısında sağlam kalabilmelidir. Kemik doku mühendisliğinde kullanılacak bir doku iskeletinin, asıl doku olgunlaşana kadar oluşacak yük bindirici kuvvetlere dayanma zorunluluğu bulunmaktadır [8].

Disiplinlerarası bir çalışma alanı olan doku mühendisliğinde, tıptaki ve malzeme bilimindeki ilerleme sayesinde deri, kemik, kıkırdak, sinir dokusu ve kan damarları gibi bir çok konuda çalısmalar yapılmaktadır. Her bir dokunun kimyasal ve fiziksel özellikleri, hücre yapıları ve iyileşme durumları birbirinden farklı olduğundan, farklı dokuların yenilenmesinin hedeflendiği doku mühendisliği çalışmalarında, farklı stratejiler geliştirilmesi gerekmektedir.

Jel bazlı polimerik bir malzemenin biyolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için belli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Parçalanmadan yüksek oranlara kadar deforme olabilmeli ve tepki verebilme özelliği gösterebilmedir. Özellikle kemik-doku mühendisliğinde kullanımı düşünüldüğünde mekanik dayanımı iyi ve gözenekliliğin % 90-100 oranlarında olmalıdır. Fakat, hidrojellerin gereğinde fazla şişmesi ve mekanik özelliklerinin zayıf oluşu kullanımını sınırlandırmaktadır.

Biyolojik jellere örnek olarak intervertebral disk (IVD) verilebilir. İç kısmı %80'e kadar su içerebilen, yumuşak ve viskoz, dış kısmı ise sert ve elastik iki bölgeden oluşan IVD, bu yapısının bir sonucu olarak yüksek yüklere dayanabilmektedir. Doğal IVD ile aynı statik ve dinamik mekanik özelliklere sahip biyouyumlu bir malzeme bugüne kadar geliştirilememiştir. Araştırma grubumuz IVD üretimini hedeflemektedir. IVD oluşturulurken kriyojelleşme yöntemi ile ipek fibroin bazlı sert bir dış kısım eldesi amaçlanmaktadır.

Kriyojeller, gözenekli bir malzeme grubudur. Kriyojel kelimesi Yunancadan soğuk, buz anlamına gelen cryos ile yumuşak malzemeler için kullanılan gel sözcüklerinden türetilmiştir. Kriyo kelimesi literatürde birçok anlamda kullanılmaktadır. Kan plazma tedavilerinde kriyo-çöktürme olarak adı geçmektedir. Sol-jel tekniği ile sentezlenip

ardından dondurmalı kurutma işlemi ile elde edilen sentetik veya doğal polimerik malzemelere kriyojeller denilmektedir. Gerçek tanımıyla kriyojeller, kriyojelleşme tekniği ile donmuş çözeltiden elde edilen malzemelerdir. Kriyojellerin makro gözenekli morfolojik yapıları ve üstün mekanik özellikleri dolayı biyoteknolojide kullanımı yaygınlaşmaktadır. Canlı yapısında biyomateryal olarak işlev yapabilmekte ve biyobozulma göstererek yerini doğal doku ve hücreler alabilmektedir [6,9,10].

Kriyojelleşme tekniği, makro gözenekli jelleri elde etmek için kullanılan basit bir yöntemdir. Kriyojelleşme, çözücünün donma noktasının altındaki sıcaklıklarda ve donmamış bölgelerde monomer veya polimer konsantrasyonun artması sonucu gerçekleşir. Ortamdaki buz kristallerinin kalıp etkisi yapması sonucu gözenekli bir yapı meydana gelir. Bu yöntemin uygulanması sonucunda, birbiri ile bağlantılı gözenek yapısına sahip, mekanik dayanımı yüksek malzemeler elde edilmektedir [11].

İdeal bir doku iskeleti birbiri ile bağlantılı, kontrol edilebilir gözenek yapısı ile yüksek gözeneklilik oranına sahip olmalıdır. İdeal bir doku iskeleti biyobozunur, biyouyumlu, mekanik özellikler açısından yenilenmesi istenen dokuya benzer olmalıdır. Bu özelliklerin sağlanması, doku iskeletinin üretim metoduna ve kullanılan malzemeye bağlıdır.

Araştırma grubumuzda daha önce yapılan çalışmalarda *Bombxy Mori* türü ipek böceği kozalarından ipek fibroin doğal polimeri elde edilmiş, fibroinin diepoksit çapraz bağlayıcısı varlığında çok hızlı bir şekilde jelleştiği saptanmıştır [12]. -18^{o}C'de ve % 4,2 fibroin konsantrasyonunda 1,4-bütandiol diglisidil eter çapraz bağlayıcısı varlığında kriyojelleşmesi sonucunda makrogözenekli ipek fibroin iskeletleri elde edilmiştir. Üstün mekanik özellikleri sayesinde ipek fibroin iskeletleri kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilecek bir malzeme olabileceği belirtilmiştir [13].

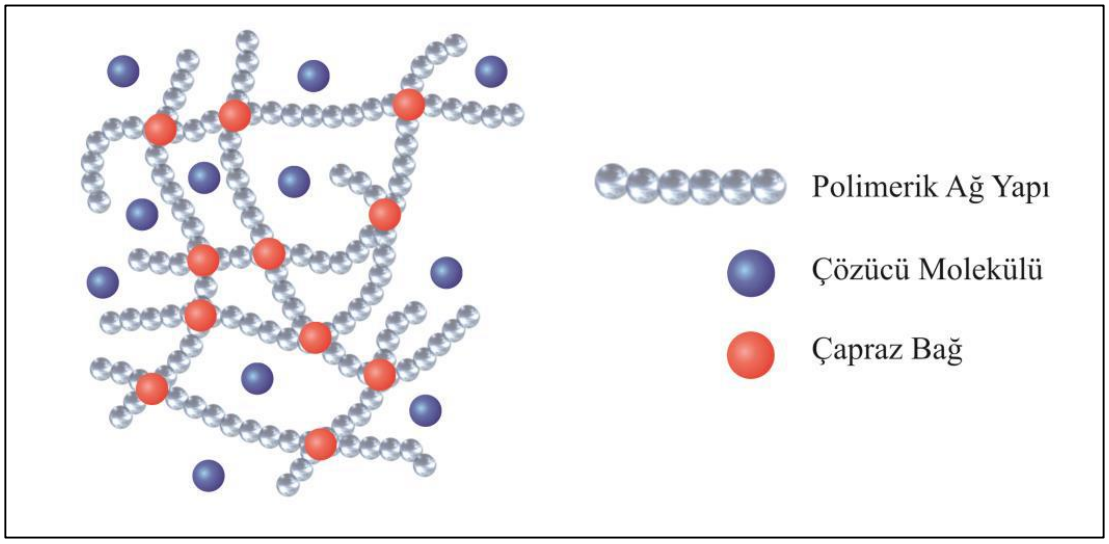
Tez kapsamında yapılan çalışmaların amacı, kriyojelleşme yöntemi ile kemik doku yenilenmesini destekleyecek özelliklere sahip ipek fibroin iskeletlerinin üretilmesidir. Şişme davranışlarının ölçülmesiyle, mekanik testlerin yapılmasıyla, *ATR-FTIR* analizleri ve kriyojellerin morfolojisinin belirlenebilmesi için *SEM* görüntüleri ile ipek fibroin kriyojellerinin fiziksel, kimyasal ve morfolojik

özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, ipek fibroin konsantrasyonu değiştirilerek 1,4-bütandiol diglisidil eter çapraz bağlayıcısı varlığında elde edilen fibroin kriyojellerinin gözenek boyutu ile kriyojelleşme sürecindeki fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak kriyojellerin Young modül, basınç dayanımı, plato ve parçalanma gerilimlerinin değişimi incelenmiştir. Ayrıca üretilen kriyojellerin jel kesirleri, ağırlıkça ve hacimce şişme sonuçları ve % gözenekliliği hesaplanmıştır. Ek olarak, çapraz bağlayıcı yerine sadece farklı konsantrasyonlarda sodyum dodesil sülfat (SDS) sürfaktanı kullanılarak kriyojeller üretilip, jel kesri ve şişme özellikleri ile mekanik dayanımları açıklanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda literatürde rapor edilmemiş en yüksek mekanik dayanıma sahip ipek fibroin iskeletleri elde edilmiştir.

2. TEORİK KISIM

2.1 Hidrojeller

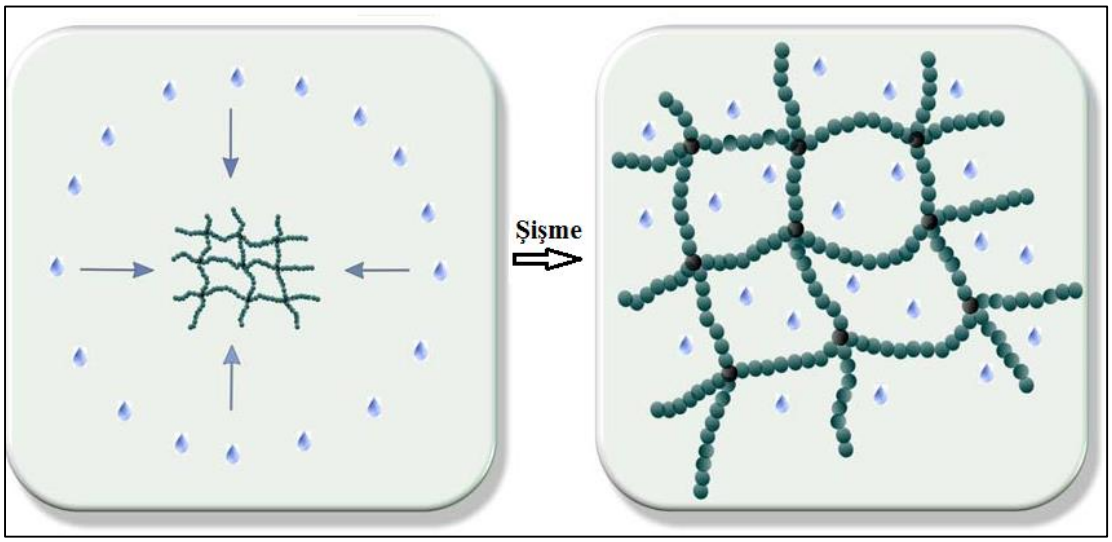
Polimerik jeller çapraz bağlı ağ yapı ve bu ağ yapı içindeki boşlukları dolduran sıvıdan oluşan, dolayısıyla ıslak ve yumuşak yapıda olup, çözücü içerisinde şişebilme özelliği gösteren sistemlerdir.



Şekil.2.1 : Polimerik jel yapısının genel gösterimi.

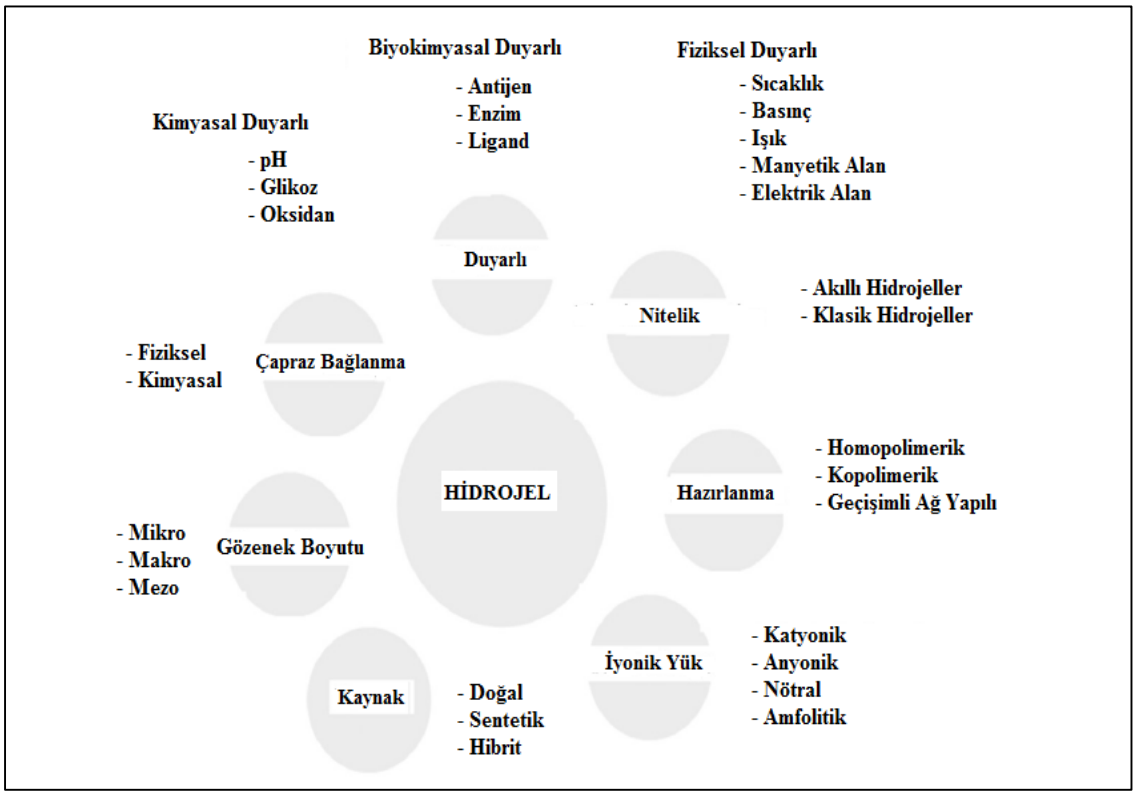
Hidrojeller, ağ yapılarında hidrofilik gruplar içeren, suyu ve sulu çözeltiyi absorblayabilen çapraz bağlı polimerik yapılardır. Polimerlerin çapraz bağlanarak oluşumu temel olarak komşu moleküllerin kovalent bağlarla birbirine aktif gruplar aracılığıyla bağlanma mekanizmasına dayanır. Moleküller arası bağlanma iyonik veya dipol etkileşimler, hidrojen bağı ve van der Waals gibi zayıf kuvvetlerle de gerçekleşebilmektedir. Moleküller arasında oluşan bu etkileşimlerle çapraz bağlı ağ yapı, su içerisindeki mekanik dayanımını sağlamaktadır. Dolayısıyla bir hidrojelin yapısı ve termodinamik uygunluğu, sudaki şişme davranışları ile belirlenmektedir. Moleküller arası çapraz bağlanma ve sonucunda oluşan kompleks yapıdan dolayı ağ yapı içerisine çözücünün difüzlenmesiyle zincirler arası mesafe açılır ve jel şişmesi

gerçekleşir (Şekil 2.2). Böylece suda çözünmeksizin ağırlığının yaklaşık 2000 katına kadar su taşıyabilmektedir [14,15,16].



Şekil 2.2 : Çözücü içerisindeki hidrojellerin şişme davranışının şematik gösterimi.

Hidrojeller, kaynağına, bileşenlerine, sentez metoduna, fiziksel yapısına, iyonik yük, tepki verebilme veya ağ yapı durumuna göre sınıflandırılabilmektedir. Şekil 2.3 'de bazı kriterlere göre hidrojellerin sınıflandırılması şematize edilmiştir.



Şekil.2.3 : Hidrojellerin belli özelliklere göre sınıflandırılması.

Kaynak türüne göre doğal ve sentetik hidrojeller, bileşenlerine göre homopolimer ve kopolimer, fiziksel yapısına göre yarı-kristal ve amorf hidrojeller, iyonik yük durumuna göre nötral, katyonik, anyonik veya amfolitik hidrojeller, kullanılan çapraz bağlayıcı türüne göre fiziksel ve kimyasal çapraz bağlı hidrojeller olarak adlandırılmaktadır [17].

Kimyasal çapraz bağlı jeller, kovalent bağlarla oluşan çapraz bağları içermektedir. Kimyasal çapraz bağ noktaları kalıcı ve tersinmezdir [18]. Kimyasal çapraz bağlanma, aldehitler gibi tamamlayıcı grupların çapraz bağlanarak kimyasal reaksiyonu ile, kimyasal çapraz bağlayıcı varlığında düşük molekül ağırlıklı monomerlerin radikalik polimerleşmesiyle, katılma reaksiyonlarıyla, enzimlerin kullanılmasıyla, kondenzasyon reaksiyonlarıyla, ya da yüksek enerjili ışıma ile gerçekleştirilebilmektedir [19]. Fiziksel çapraz bağlı jeller ise Van der Waals etkileşimleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşmeler gibi fiziksel etkileşimler ile bir araya gelen moleküllerin oluşturduğu polimer yapılarıdır [20]. Fiziksel çapraz bağlar, dinamik ve tersinirdirler. Bu özellikler fiziksel çapraz bağı, kimyasaldan ayıran en temel özelliktir.

Gözenek boyutu 10-200 μm olanlar makrogözenekli, 1-10 μm olanlar mikrogözenekli ve gözeneksiz olanlar olmak üzere hidrojeller gözenek yapılarına göre de sınıflandırılmaktadır [17].

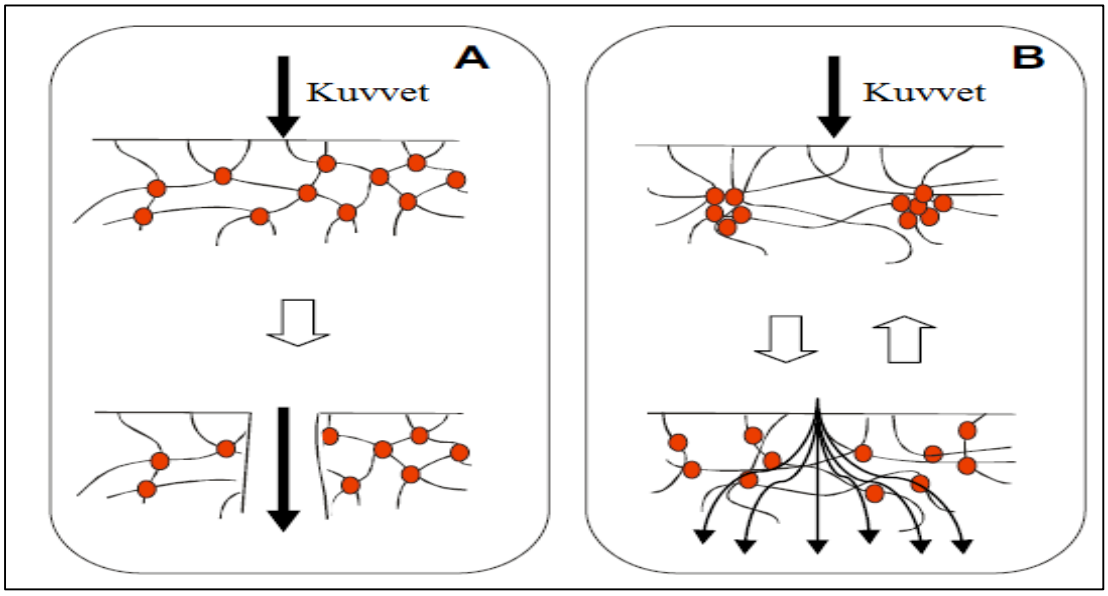
Sentetik hidrojeller, genel olarak çapraz bağlı poli(2-hidroksietil metakrilat), poli(N-izopropil-2-akrilamid), ve poli(vinil alkol) gibi lineer polimerlerden oluşurken, çitosan, keratin, fibroin ve hyaluronik asit gibi polimerler de doğal hidrojellerin sentezinde kullanılmaktadır. Ayrıca, amorf ve kristalin hidrojeller bağların fiziksel ve kimyasal olmasına bağlı olarak özellik gösterirler [15,17,21].

Hidrojeller bir kuvvetle veya herhangi bir dış uyaranla karşılaştığında kolaylıkla deforme olabilmektedir. Çevresel etkilere karşı tepkiler mikroskobik düzeyden makroskopik düzeye geçtiğinde kimyasal enerjinin mekanik enerjiye dönüşümü sağlanabilmektedir. 1948 yılında Kuhn, Breitenbach ve Katchalsky suda şişmiş polimerik jellerin izotermal koşullarda kimyasal enerjiyi direkt olarak mekanik işe dönüştürdüğünü ortaya koymuştur. Bu olay ortam özelliklerinin değişimleri veya karboksil grupları gibi tersinir iyonize olabilecek fonksiyonel gruplarla gerçekleşebilmektedir. Polimer ağ yapısı boyunca gerçekleşen bu dönüşümlere

Katchalsky mekanokimyasal reaksiyonlar veya mekanokimyasal sistemler olarak belirtmiştir [14]

pH, sıcaklık, iyonik güç gibi parametrelerin değişimi ile tepki verebilen hidrojeller akıllı hidrojeller olarak adlandırılmaktadır. Tepki verebilme ve akıllılık bir hidrojelin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak ayarlanabilmektedir. Şişme dengesinde ulaşmış hidrojelin gözenekliliği ile ağ yapının kauçuksu karakteri arttırılarak hidrojelin tepki verebilmesi de geliştirilmektedir.

Oldukça avantajlı özelliklerinin karşın, kimyasal çapraz bağlı hidrojeller zayıf mekanik özelliklere sahiptir [22]. Örneğin kırılma enerjisi 10.000 $j.m^{-2}$ dolaylarında olan kauçuğa nazaran çoğu hidrojelin kırılma enerjisi 10 $j.m^{-2}$ mertebelerindedir [23,24]. Kimyasal çapraz bağlı hidrojellerin parçalanan kısımlarında depolanan enerji ağ yapıda dağılamamaktadır. Polimerik ağ yapı boyunca viskoelastik dağılım arttırılarak daha tok ve dayanıklı hidrojeller elde edilebilmektedir. Polielektrolit jellerin hidrofobik etkileşimleri modifiye edilerek viskos modülleri önemli ölçüde artmaktadır. Özetle, belirli koşullarda hidrofobik etkileşimleri arttırılan hidrojeller, klasik hidrojellerle karşılaştırıldığında daha iyi mekanik özellik gösterebilmektedirler. Yani hidrofobların tersinir bir şekilde bozulmasıyla parçalanma enerjisi yayılarak makroskopik düzeyle parçalanmalar önlenebilmektedir (Sekil 2.4) [25].



Şekil 2.4 : Kuvvet etkisiyle parçalanan hidrojel (A) ile hidrofobik modifiye sonucunda dağılmayan hidrojelin (B) gösterimi.

Son yıllarda, hidrojellerin tokluğunu arttırmak için birçok teknik uygulanarak çift ağ yapılı jeller, nanokomposit jeller, topolojik jeller ve kriyojeller gibi mekanik dayanımı iyi polimerik jeller üretilmeye başlanmıştır [25].

Hidrojellerin özellikle biyolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için üstün mekanik özellikler gösterebilmeli, makroskopik düzeyde iyi tanımlanmış bir yapı oluşturabilmelidir. Hidrojellerin bazı durumlarda istenenden fazla şişebilmesi ve kolaylıkla parçalanabilmesi düşünülen uygulamalarda kullanımını sınırlandırmaktadır. Makro gözenekli jellerin elde edilmesi bu dezanantaja bir alternatif olarak düşünülmektedir [26,27,28].

2.2 Makrogözenekli Jeller

Gözenekli bir ağ yapı oluşturulması hızlı tepki verebilen jellerin elde edilmesinde kullanılan tekniklerden biridir. Makrogözenekli jellerin kanal tipinde birbiri ile bağlantılı gözeneklerden oluşmasıyla, çözücünün jel matriksi boyunca gözeneklere dolmasını ve çıkmasını yani şişmesini ve büzülmesini hızlıca gerçekleştirebilmesini sağlamaktadır. Dolayısıyla gözeneklerin bağlanabilirliği makro gözenekli jellerin şişme ve büzülme davranışlarında önemli bir rol oynamaktadır. Gözeneksiz bir jelin şişmesi yavaş bir şekilde difüzyon olayı ile gerçekleştiği düşünüldüğünde makrogözenekli jellerin ciddi bir avantajı olduğu görülmektedir [29,30].

Makrogözenekli jeller, genellikle spesifik sorbentlerin yapımında, kontrollü ilaç salınım sistemlerinde, tarım ürünlerinin imalatında ve biyoteknolojide ayırma işlemlerinde kullanılmaktadır [31,32].

Makrogözenekli jeller, çapraz bağlanmış polimer bölgelerinin arasında oluşan bağlantılı gözenekler içermektedir. Yoğun polimerik bölgeler mekanik kararlılığı sağlarken, bağlantılı gözenekler yapıya ekstra özellikler sağlamaktadır [33].

Makrogözenekli jellerin oluşturulmasındaki en önemli husus homojen gözeneklerin oluşturulabilmesidir. Düzenli ve makro gözenekli metaryaller özellikle doku mühendisliği ve mikro akışkanların uygulama alanlarında kullanılmaktadır [34,35].

Gaz kromatografisi ve katalizörler için jellerin kullanılması istendiğinde daha küçük boyutlarda gözenekler düşünülürken, nükleik asitlerin veya enzimlerin immobilizasyonu için daha büyük boyutlarda gözenek çapları tercih edilmektedir. Bu

nedenle; makrogözenekli jellerin hazırlanmasında tercih edilen sentez yöntemleri gözenek özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir faktördür [36,37].

Faz ayrımı, gaz oluşturma, dondurma kurutma tekniği ve kriyojelleşme makrogözenekleri jellerin sentezi için başlıca tercih edilen yöntemlerdir.

Faz ayrımı, makrogözenekli hidrojellerin sentezinde ise en çok tercih edilen yöntemdir. Reaksiyon sistemindeki polimer-çözücü etkileşmelerinin boyutlarına bağlı olarak bir makro faz ayrımı ile gerçekleşebilmektedir [38,39]. Fazla miktarda çapraz bağlayıcı kullanılması, sonucunda şişme oranını azalması ve oluşan gözeneklerin düzensizliği faz ayrımı tekniğini yetersiz kılmaktadır. Hatta, faz ayrımı ile elde edilen makro gözenekli polimerik jellerin mekanik özellikleri oldukça zayıf olmakta ve hatta % 10 – 30 deformasyon oranlarında parçalanabilmektedir [40].

Gaz oluşturma tekniğinde, gaz dağılımının kontrolü zor olmaktadır. Oluşan gözenekler daima büyük ve düzensizdir. Gözenek duvarları oldukça dayanıksız oluşu mekanik dayanımını düşürmektedir [41,42].

Dondurma kurutma tekniğinde, gözenekli yapı bal peteği şeklinde olmaktadır ve yapı içerisinde polimerleşme sadece belli bölgelerde yoğunlaşabilmektedir [43].

Kriyojelleşme, diğer metotlarla karşılaştırıldığında aşağıda belirtilen avantajlara sahiptir [44,45].

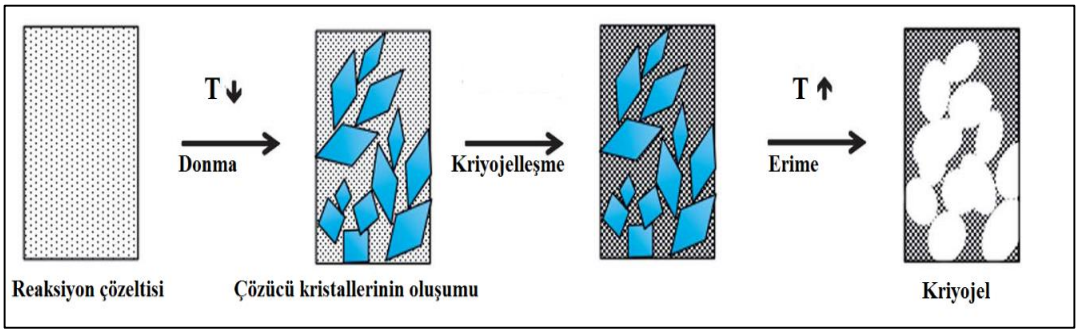
- Bağlantılı ve düzenli makrogözenekler oluşturur.
- Mekanik dayanımı oldukça iyi ve parçalanması zor ağ yapı meydana getirir.
- Gözenek oluşturucu (*porogen*) olarak özel bir gereksinime ihtiyaç duymaz.
- Maliyeti düşüktür.
- Reaksiyon süreci oldukça basittir.

2.3 Kriyojeller

Polimerik hidrojeller, fonksiyonel malzemelerin önemli bir sınıfını oluşturmaktadır. Ancak, hidrojellerin zayıf mekanik özellikleri onların yaygın kullanımını engellemekte, mekanik dayanımlarını arttırmak için son yıllarda yeni yöntemler geliştirilmiştir. Kriyojelleşme, bu yöntemlerden biridir ve hızlı tepki verebilen,

makro gözenekli ve mekanik dayanımı oldukça iyi olan jellerin hazırlanmasında tercih edilmektedir.

Kriyojelleşme prosesi, reaksiyon çözeltisinin donma noktasının altındaki uygun bir sıcaklıkta soğutularak oluşan çözücü kristallerinin etrafındaki donmamış mikro bölgelerde konsantrasyon artışına bağlı olarak ilerler. Kriyokonsantrasyon etkisi olarak adlandırılan bu durum, kriyojeleşmenin temel prensibidir. Elde edilen jelin (kriyojel) üstün özelliklerinin oluşmasında etkilidir. Donmuş çözücünün kriyojelleşme sonrası eritilmesi birbiri ile bağıntılı gözenekleri oluşturmasını sağlamaktadır (Şekil 2.5). Dolayısıyla, kriyojeller çözücünün donma noktası altındaki sıcaklıklarda hazırlanan, üç boyutlu makrogözenekli hidrojeller olarak tanımlanabilmektedir [11].

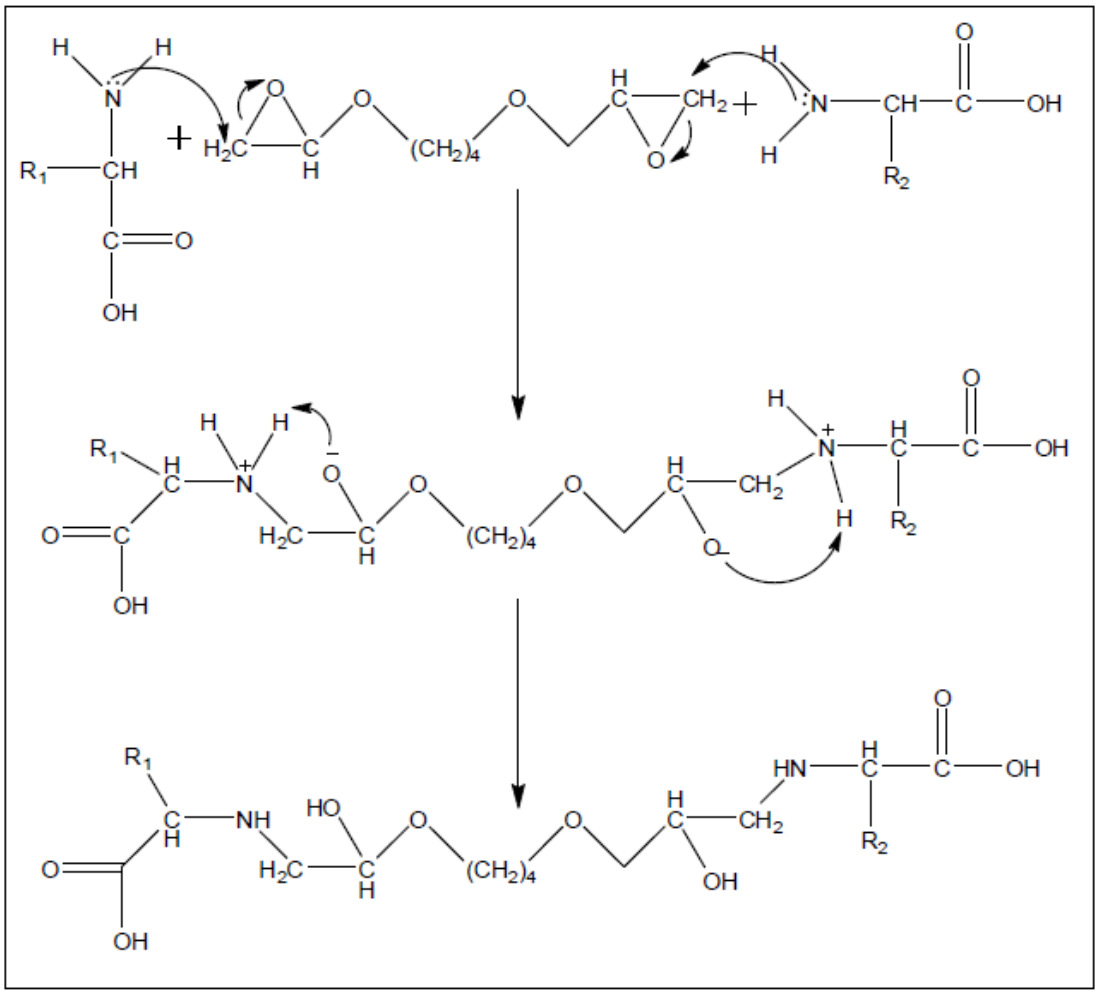


Şekil.2.5 : Kriyojellerin gözenekli yapısının oluşumu.

Kriyojeller üç boyutlu gözenekli yapısıyla, germe ve bükme gibi deformasyonlara karşı koyabilen ve tokluğu oldukça yüksek malzemelerdir. Kriyojellerin bu üstün mekanik, fiziksel ve kimyasal özellikleri birçok parametreye bağlı olarak değişmektedir. Bunlar; monomerik veya polimerik başlatıcılar, çapraz bağlayıcılar, organik veya inorganik çözücüler, donma sıcaklığı ve türü ve en önemlisi kullanılan monomer veya polimerin türü ve miktarıdır [11].

Serbest radikal çapraz bağlanma kopolimerizasyonu ile monovinil-divinil monomer çiftleri kullanılarak kriyojeller hazırlanabilmektedir. Bu amaçla genel olarak akrilamid, akrilik asit, *N*-izopropilakrilamit gibi suda çözünebilir monomerler ile *N,N*- metilen(bis)akrilamid, poly(etilen glikol diakrilat) gibi çapraz bağlayıcılar kullanılarak da kriyojeller sentezlenebilmektedir. Başlatıcı olarak genellikle amonyum persülfat ve *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin (TEMED) redoks başlatıcı çifti kullanılmaktadır [11,46,47]. Hatta kriyojelleşme ultraviole (UV) veya elektron demeti tercih edilerek te başlatılabilmektedir. Kriyojeller ayrıca polimerlerin çapraz

bağlanması sonucunda elde edilebilmektedir. Doğal veya sentetik polimerlerle, glütaraldehit, 1,4-bütandiol diglisidil eter (BDDE) ve etilen glikol diglisidil eter (EGDE) gibi çapraz bağlayıcılar kullanılarak fonksiyonel kriyojeller üretilebilmektedir (Şekil 2.6) [11,48].



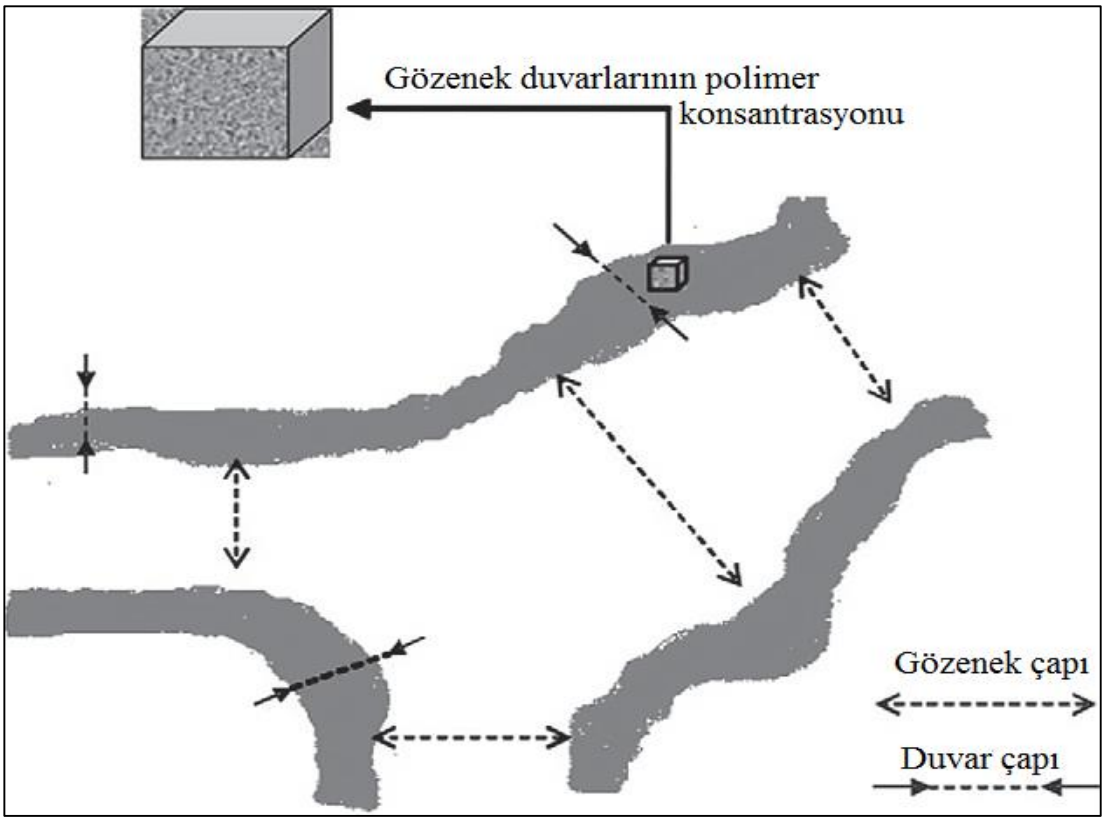
Şekil 2.6 : Biyopolimer zincirleri üzerinde bulunan amino gruplarının epoksi grupları ile çapraz bağlanma reaksiyonu.

Su, dimetil sülfoksit, dioksan, formamid, ve siklohekzan kriyojelleşme için kullanılabilen uygun çözücülerdir. Biyolojik sistemlere uyumu ve ucuzluğundan dolayı su başlıca tercih edilen çözücü olmaktadır [11,49].

Kriyojellerin özelliklerini belirleyen en önemli etkenlerden biri jelleşmenin gerçekleştiği sıcaklıktır. Kriyojelleşme sıcaklığı genellikle çözücünün donma noktasının 2-20^{o}C altına ayarlanmaktadır. Çözeltinin dondurulma sıcaklığına ek olarak donma hızı ve dondurulma türü bir kriyojelin morfolojik özelliklerini etkilemektedir [11,50].

Kriyokonsatrasyon etkisinden dolayı daha düşük başlangıç konsantrasyonlarında kriyojel sentezi gerçekleşebilmektedir. Başlangıç konsantrasyonuna bağlı olarak gözenek boyutu ayarlanabilmektedir[11,51].

Özetle yukarıda belirtilen parametreler ile çapraz bağlayıcıların türü veya miktarı da kriyojellerin makrogözeneklerinin yapısı değiştirmektedir. Örneğin, çapraz bağlayıcı kullanılmadan elde edilen poli(vinil alkol) kriyojellerinin gözenek çapları 100 nm ile 1 μm aralığında iken, çapraz bağlayıcı kullanıldığında ise 1μm ile 150 μm aralığında olmaktadır [52]. Şekil 2.7' de kriyojellerin tipik gözenek yapısı gösterilmiştir. Gözenek duvarlarının polimer konsantrasyonuna bağlı olarak oluştuğu vurgulanmıştır.



Şekil 2.7 : Kriyojellerin gözenek yapılarının şematik gösterimi.

Birbiri ile bağlantılı makrogözeneklerden ve tok gözenek duvarlarından oluşan yapısıyla kriyojeller çökme olmadan kurutulabilmektedir. Kuru kriyojeller çözücü içerisine bırakılıp gözeneklerin tekrar sıvı ile dolmasıyla şişmiş duruma dönebilmektedir. Bu nedenle kriyojeller kuru olarak saklanabilir ve istendiğinde tekrar şişmiş olarak kullanılabilmektedir [52]. Şişmiş durumdaki kriyojeller kuvvete maruz bırakıldığında mekanik olarak kararlığı sürdürebilmektedir. Şişmiş kriyojel

kuvvet sonucu yapısındaki çözücüyü serbest bırakarak yüksek deformasyon oranlarında bile parçalanmadan kalabilmektedir [53].

2.3.1 Kriyojellerin uygulamaları

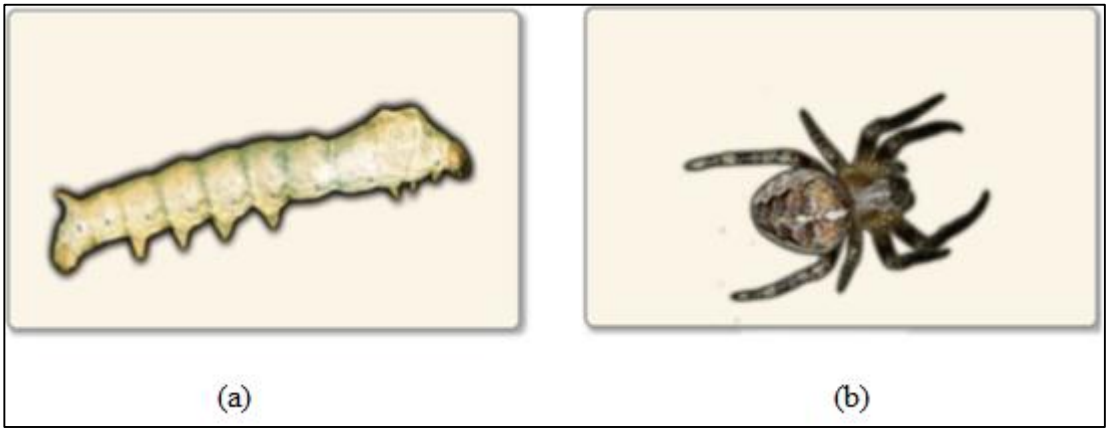
Makrogözenekli kriyojeller bağlantılı gözenek yapısı ve kolay üretim metodu ile doku mühendisliği ve hücre kültürü alanında büyük ilgi kazanmıştır. Yapı iskeleti olarak kullanılan kriyojeller üstün mekanik ve fiziksel özelliklerinden dolayı hücreler arası ortamlarda kullanılabilmekte ve doğal, gözenekli yapısı ile hücre büyümesi için ideal bir ortam oluşturmaktadır. Kriyokonsantrasyondan dolayı oldukça katı ve dirençli olan kriyojellerin temel olarak hedeflenen kullanım amacı kemik ve kıkırdak doku yenilenmesi üzerine olmaktadır [54].

Kriyojellerin diğer uygulama alanlarına bakıldığında; küçük parçacıklar içeren sıvıların kromatografilerinde, hücrenin ve enzimlerin kimyasal olarak immobilizasyonunda, hücre kültürü için taşıyıcı kalıp oluşturulmasında [55], medikal amaçlı matriks olarak, kemik doku implantlarında taşıyıcı polimerik matriks olarak hayvan hücrelerinin kültürü için jel matriks olarak ve kontrollü ilaç salımında kullanıldıkları göze çarpmaktadır [56].

Hassaslığı ve yüksek ayrıştırma gücüne rağmen klasik kromatografiler uygulamada parçacık içeren sıvıların analizinde kısıtlı yeterliliğe sahiptirler. Bu parçacıklar, kromatografik taşıyıcıyı olumsuz etkileyerek kolondaki akışın ya azalmasına ya da tamamen durmasına neden olurlar. Kriyojellerin gözenekliliği ise bu noktada, süper makrogözenekli kromatografik malzemelerin tasarımında ön plana çıkmaktadır. Geleneksel jel taşıyıcılarından daha iyi sonuçlar verdiği için bazı biyopolimerlerin matriksi olarak kriyojellerin kullanımı tercih edilmektedir. Biyoparçacıkların ayrıştırılması için tasarlanan kriyojel kromatografik kolonlarının, devamlılık sergileyen süper makrogözenekli yapının varlığı nedeniyle, biyoreaktör yapımı için çok uygun oldukları saptanmıştır. Kuvvetli su tutucu yeteneği olan poli(vinil alkol) kriyojellerin, akışkan olmayan biyokatalizörlerin taşınmasında son derece etkili olduğu belirlenmiştir. Kriyojel matriks, organik ortamda enzimin reaksiyonu katalizlemesi için gerekli olan suyu sağlamaktadır [57].

2.4 İpek ve İpek Fibroin

Yüz yıllar boyunca günlük hayatımızda tekstil ürünü olarak yer alan ipek, son yıllarda doku mühendisliğinden tıbbi uygulamalara kadar birçok alanda popüler olmaktadır. Malzeme üretimi için kolayca işlenebilirliği, mekanik özelliklerinin ayarlanabilirliği ve biyobozunabilirliği bu kadar yaygın bir şekilde kullanılabilmesine öncülük etmektedir. Doğal bir polimer olan ipek lif formuna getirildiğinde hem dayanıklılık hem de elastik yapı sağlayabildiğinden sentetik polimerlere üstünlük sağlamaktadır. İpek, böcek ve örümceklerin çeşitli türlerinden üretilmektedir [58,59]. Ancak kaynağına bağlı olarak ipeğin kimyasal yapısında değişiklikler olabilmektedir. Örneğin, böcek türleri ile örümcekten türlerinden elde edilen ipeklerin yapısında yer alan aminoasitlerin dizilimleri farklılık göstermektedir [60].



Şekil 2.8 : İpek kaynaklarından olan *Bombyx Mori* (a) ve örümcek (b).

Doğada ipeğin en yaygın üreticisi *Bombx Mori* türü ipek kozalarıdır [61]. Çapı 10-20 µm olan ipek liflerinin meydana getirdiği ipek kozaları serisin ve fibroin olmak üzere iki protein türü içermektedir. Fibroin ipek liflerinin iç kısmını oluştururken, serisin dış katmanı oluşturmaktadır (Şekil 2.9).

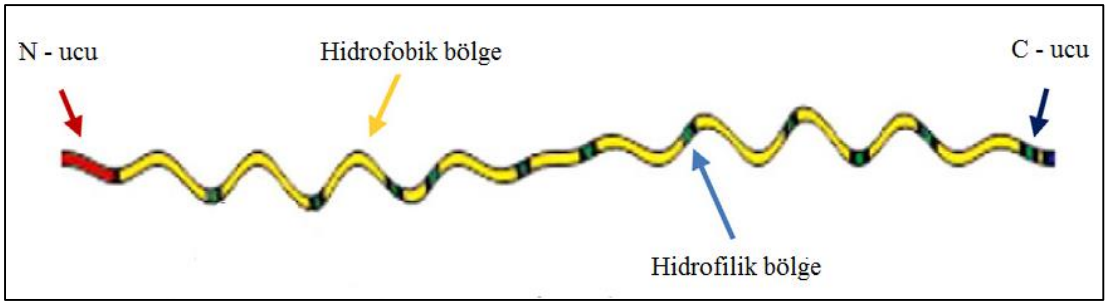
Serisin proteini amorf yapıdadır ve bağlayıcı özellik göstererek ipek kozalarındaki liflerin yapısal bütünlüğü sağlamaktadır. Fibroin ise yarı kristal yapıdadır ve liflere üstün mekanik özellikleri sağlayan proteindir.



Şekil 2.9 : *Bombxy mori* türü ipek kozası (a) ve ipek kozasının fibroin ve serisinden oluşan katman yapısı (b).

Bu iki protein farklı miktarlarda glisin, serin ve alanin başta olmak üzere 18 aminoasit türü içermektedir. İpeğin yapısında aminoasitlere ek olarak yağ, vaks, pigmentler ve mineraller de bulunmaktadır [58,62].

İpek fibroin, yaklaşık ağırlıkları 25 kDa olan hafif zincir ile 350 kDa olan ağır zincirlerin 1:1 oranında disülfit bağları ile bağlanmasıyla oluşur[63]. Ağır fibroin zinciri, yapısında başlıca glisin (~43-46%), alanin (~25-30%) ve serin (~12%) olmak üzere başlıca üç aminoasit içerir. Bunların yanısıra tirosin (~5%) ve valin (~2%) aminoasitleri ve az miktarlarda aspartik asit, fenilalanin, treonin, glutamik asit, izolösin, prolin, arginin, lisin ve histidin de içermektedir. Ağır fibroin zinciri 12 hidrofobik bölge ve bunların arasında bulunan 11 hidrofilik bölgeden oluşan bir biyopolimerdir (Şekil 2.10).



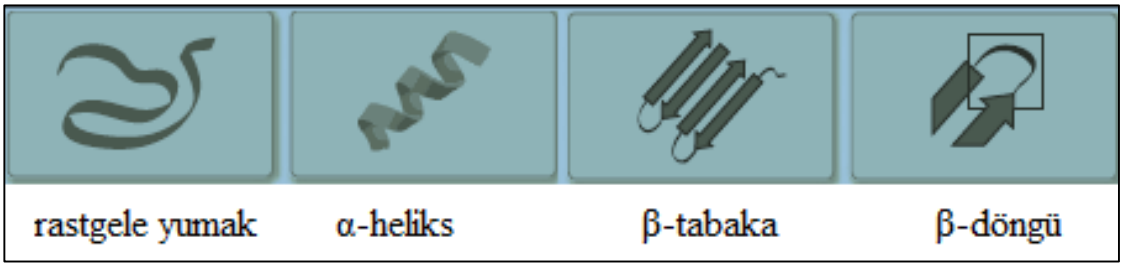
Şekil 2.10 : Hidrofobik ve hidrofilik bölgerden oluşan ağır fibroin zincirinin şematik gösterimi.

Hidrofobik kısımlarda bulunan aminoasitler tekrarlayan dizilişte olurken, hidrofilik kısımlarda tekrarlanmayan aminoasit dizilimleri vardır. Hidrofobik kısımlar, H-bağları ve van der Waals kuvvetleri ile kristalin bölgeleri oluşturmada görev alır [64,65].

İpek, protein yapısı itibariyle bir blok kopolimer olarak da adlandırılabilir. Sulu çözeltisi hazırlandığında her bir protein bölgesi farklı özellikler yansıtabilmekte ve sulu çözelti içerisindeki süreç sonrasında mekanik olarak daha dirençli bir özellik gösterebilmektedir. Oluşan β-tabakalar ipeğin bu özelliklerini yansıtmasında temel faktör olarak rol almaktadır. β-tabaka konformasyonu polimerik zincirlerinin hidrofobik etkileşimler sonucu kristalin bölgeler oluşturması ile gerçekleşmektedir. İpek fibroin zincirleri kristalize olurken suda çözünür rastgele yumak/α-heliks konformasyonundan (*silk I* yapısı), suda çözünmeyen hidrojen bağlı anti paralel β-tabaka (*silk II* yapısı) konformasyonel yapısına dönüşmektedir. *Silk I* yapısı ipek bezlerinde baskın olurken, *silk II* yapısı ise lif halinde iken etkin olmaktadır [66].

Proteinler, birçok dokunun ana bileşenini oluşturan, doku mühendisliğinde ve ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak denenmiş ve kullanılmış biyopolimerlerdir. Protein bazlı biyomalzemeler, doğal kontrollü yıkılım süreçleri ile biyobozunuma uğrarlar [67]. Protein yapıları başlıca dört basamaktan oluşur. İlk basamak, farklı amino asitlerin peptit bağlarıyla bir arada tutulduğu lineer yapı olan birincil yapıdır. Bu lineer yapılar, hidrojen bağları aracılığıyla ikincil yapıları oluştururlar. Sekonder bağların üç boyutlu yapı oluşturacak şekilde bir araya gelmesiyle üçüncül yapılar, diğer proteinlerle etkileşecek şekilde organize olmalarıyla da kuaterner yapılar oluşur [68].

İpek fibroinde aminoasitler arasında var olan peptit bağları birincil yapıyı belirlemektedir [69,70]. Supramoleküler etkileşimlerin (hidrojen bağları, π-bağı etkileşimleri gibi) sonucu ikincil yapı ortaya çıkmaktadır. İkincil yapıda; düzenli bir şekilde α-heliks, β-tabaka ve β-döngü durumları görülmektedir. Düzenlenmemiş olan protein bölgeleri ise rastgele yumak yapısı olarak belirtilmektedir (Şekil 2.11).



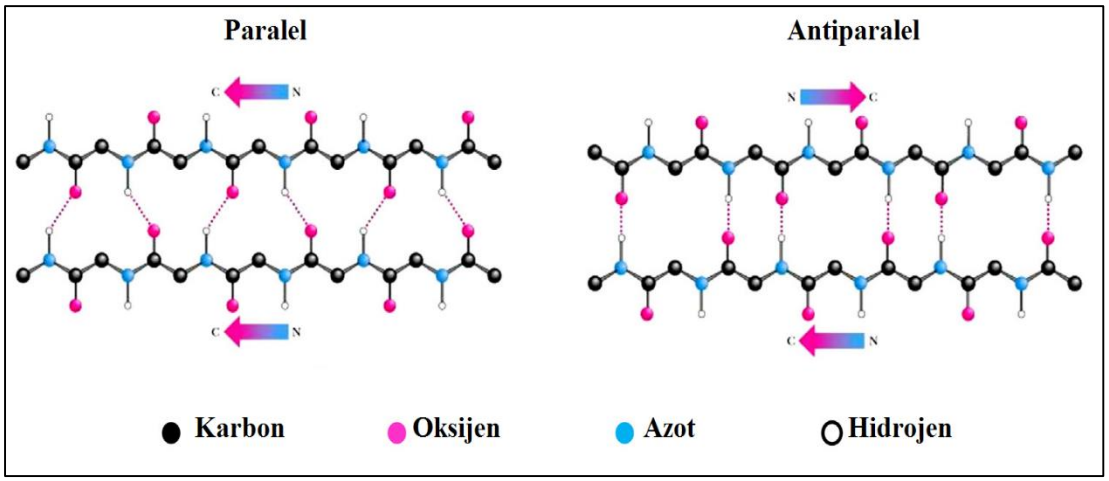
Şekil 2.11 : İpek fibroinde oluşan ikincil yapı konformasyonları.

Rastgele yumak yapısı, amorf kısımlarda görülüp fibroin zincirine elastik özelliği vermektedir.

α-heliks yapısı, bir peptidteki azot atomuna bağlı hidrojen atomu ile 4. sıradaki amino asidin karbonil oksijenleri arasında oluşan hidrojen bağları sonucu proteinin bir eksen etrafında dolanmasıyla oluşur. Heliksin her dönüşünde 3,6 amino asit kalıntısı bulunur ve her heliks yapısındaki uzaklık 0,54 nm'dir.

Protein zincirinde ikincil yapı oluşurken döngüler ve dönüşler sık sık görülmektedir. En yaygın görülen ise 180^{o} olan ve 4. amino asidin amin hidrojeni ile 1. amino asidin karbonil oksijeni arasındaki hidrojen bağı sonucu oluşan β- döngüdür.

Zincirler arasındaki hidrojen bağları, peptid zincirlerinin yeni bir konformasyon oluşturmasına sebep olmaktadır. Zikzak şeklindeki bu konformasyon β-tabaka olarak adlandırılmaktadır. Şekil 2.12' de görülüdüğü gibi, peptid zincirleri zıt yönlerde (azot atomu ucundan karbon atomu ucuna doğru) ise bu yapıya antiparalel β-tabaka, zincirler aynı yönde ise yapıya paralel β-tabaka adı verilmektedir [69,71,72].



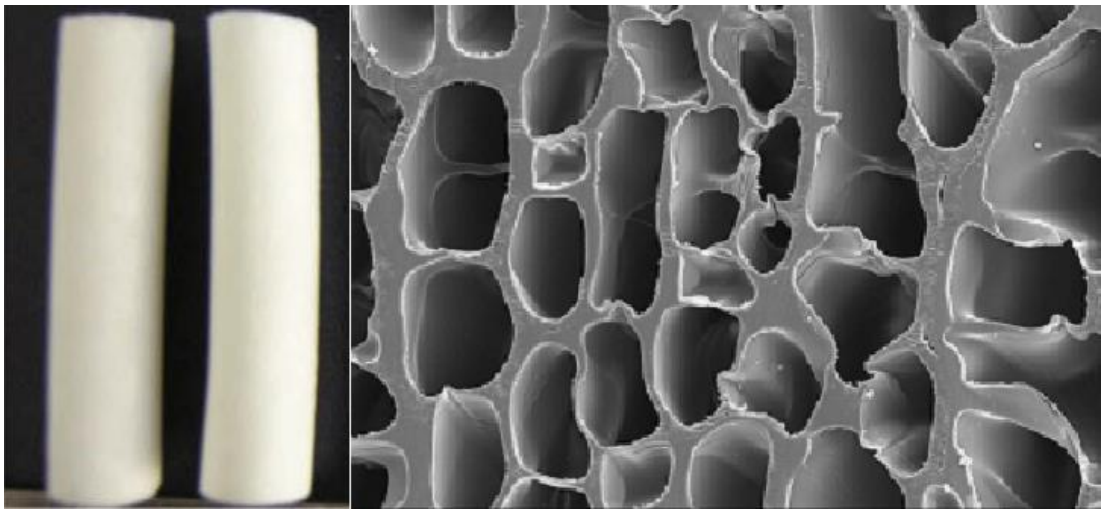
Şekil 2.12 : Paralel ve antiparalel β-tabaka oluşumları.

β-tabakaların oluşması ipeğin üstün fiziksel ve kimyasal özelliklerinin oluşmasında belirleyici olmaktadır. Diğer biyouyumlu polimerlerle kıyaslandığında bozunabilmesi daha uzun sürede gerçekleşmektedir ve en önemlisi, üstün mekanik özelliklere sahip olmasını sağlamaktadır [73,74]. Özellikle kemik doku iskeleti olarak kullanılabilecek bir yapının sahip olması gereken parametreler direkt olarak yapıyı oluşturan malzemenin özellikleri ile ilgilidir. Gerekli parametreler göz önüne alındığında ipek, biyomalzemeler için uygun bir tercih olmaktadır.

2.4.1 İpek fibroin kriyojelleri

Kemik-doku mühendisliğinde kullanılabilecek doku iskeletlerinin üç boyutlu tasarımı, hem kimyasal ve fiziksel özellikleri, hem de gerekli mekanik bütünlüğü sağlaması gerekmektedir. Vücut dışında bu koşulları sağlayabilmesi için doku iskeletlerinin yapıldığı malzemeler ve üretim yöntemleri çok büyük önem taşır. Genel olarak, ideal bir doku iskeleti, yüksek gözeneklilikte, 3 boyutlu ve birbiri ile bağlantılı gözenek ağına sahip, biyouyumlu, biyobozunur ve uygun mekanik özellikleri sürdürebilir nitelikte olmalıdır [75].

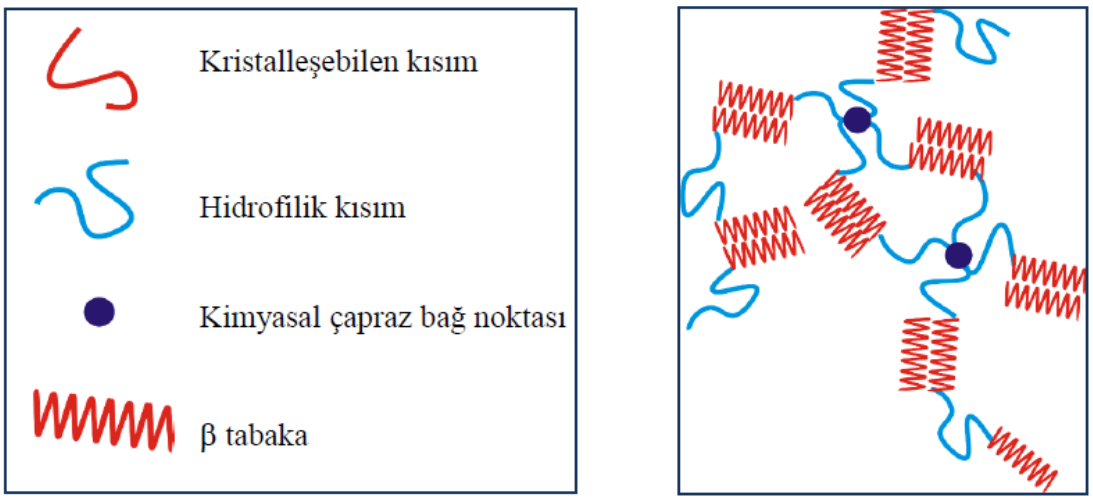
Bombyx Mori türü ipek kozalarından elde edilen fibroin, biyouyumluluk, biyobozunurluk, yüksek mukavemet, tokluk ve kolay işlenebilirlik gibi sıra dışı özelliklere sahiptir. İpek fibroin, ilaç salınımı, yara örtüsü, hücre kültürü ve kemik doku mühendisliğinde kullanılan iskelelerin yapımında kullanılmaktadır. İpek fibroin az düzenli hidrofilik ve daha düzenli hidrofobik kısımlardan oluşmaktadır. Hidrofilik bloklar fibroinin suda çözünürlüğü ve esnekliği sağlar, hidrofobik bloklar ise β-tabaka oluşumlarını sağlayarak mekanik dayanımını oluşturmasına öncülük eder. Fibroin konsantrasyonu, pH, sıcaklık, metal iyonları, elektriksel alan gibi çeşitli dış faktörler ipek yapısındaki konformasyon geçişleri kolaylaştırmaktadır [11]. Fibroinin sulu çözeltilerde jelleşmesi uzun süre almaktadır. Fibroinin jelleştirilmesi ve gözenekli fibroin iskelelerin hazırlanabilmesi için faz ayrımı tekniği, gaz oluşturma, dondurma kurutma gibi bir çok metod geliştirilmiştir [74].



Şekil 2.13 : Silindirik ipek fibroin kriyojellerinin (solda) ve gözenekli yapılarının (sağda) örnek görüntüleri [53].

Oldukça gözenekli, 3 boyutlu fibroin yapılarını oluşturabilmek için bir diğer yöntem kriyojelleşme tekniğidir. Araştırma grubumuz, fibroinin düşük sıcaklıklarda jelleştirilmesini sağlayıp üstün özelliklere sahip fibroin kriyojellerini elde etmiştir (Şekil 2.13) [53].

Kriyojelleşme, reaksiyon sisteminde etilen glikol diglisidil eter (EGDE) çapraz bağlayıcısı varlığında hızlı bir süreçte, 24 saatte, gerçekleştirilmiştir. EGDE çapraz bağlayıcısı kullanılmadan fibroin moleküllerinin jelleşemediği görülmüştür [53]. Deneysel sonuçlar, EGDE çapraz bağlayıcısının fibroin moleküllerini bir arada tutarak hidrofobik blokların oluşmasını tetiklediğini, şekil 2.14'de görüldüğü gibi fibroinin jelleşme sonucunda β-tabaka yapısına geçerek jelleşmeyi gerçekleştirdiği ortaya koymuştur.

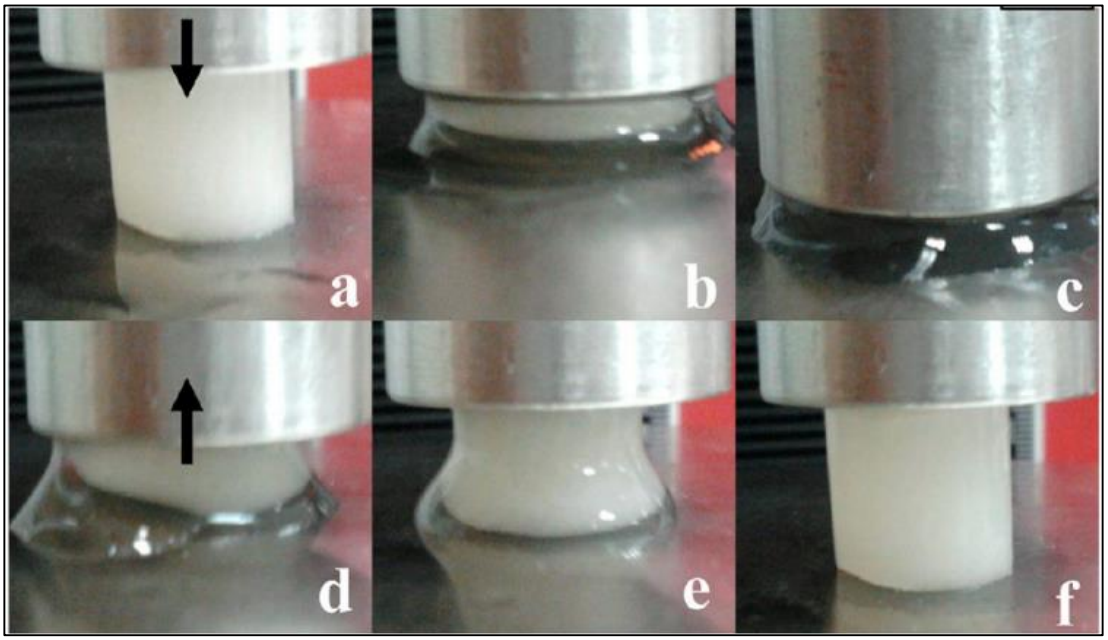


Şekil 2.14 : Fibroin zincirlerinin çapraz bağlanmasıyla meydana gelen β-tabaka oluşumlarının gösterimi.

Jelleşme öncesi ve sonrasında ipek fibroinin Amid I bandı *ATR-FTIR* ölçümleriyle karakterize edilmiştir [53]. Jelleşme öncesi 1640 cm^{-1} dalga sayısında görülen ve rastgele yumak konformasyonuna karşılık gelen pik, jelleşme sonrası için β-tabaka konformasyonuna karşılık gelen 1620 cm^{-1} dalga sayısında görülerek konformasyonel değişimler sonucunda jelleşmenin gerçekleştiği açıklanmıştır.

Yapılan çalışmalarda fibroin kriyojellerinin parçalanmaksızın % 99,8'e kadar sıkıştırılabilirliği en dikkat çekici özelliklerinden biri olarak vurgulanmıştır [53]. Şekil 2.15' de görüldüğü gibi, sıkıştırılma sırasında yapısındaki suyu bırakabilmekte, uygulanan kuvvet kesildiğinde bıraktığı suyu hızlıca tekrar yapısına alabilmektedir.

Böylece şişmiş durumdaki kriyojellerin akıllı polimerik malzemeler olduğu belirtilmiştir.



Şekil 2.15 : Şişmiş kriyojellerinin mekanik ölçüm sırasındaki görüntüleri [53].

Oluşturulan fibroin iskelelerinin mekanik özellikleri diğer parametreler ile ilişkilendirilmiştir. Fibroin konsantrasyonu arttıkça, sentez sıcaklığı düştükçe veya gözenek boyutu küçüldükçe mekanik özelliklerin iyileştiği yorumlanmıştır [53]. Örneğin, -18ºC' de hazırlanan kriyojellerin fibroin konsantrasyonu % 4,2 den 12,6 (g fibroin/mL çözelti)' ya çıkarıldığında Young modülün 7 MPa' dan 48 MPa kadar arttığı, gözenek boyutunun 33 ± 10' dan 10 ± 3 μm' ye kadar küçüldüğü rapor edilmiştir [53].

Alkollerle ön işleme tabi tutulmuş dondurmalı kurutma yöntemi kullanılarak elde edilen fibroin iskelelerinin modüller 10-100 kPa aralığında değişmektedir. Tuz yardımıyla gözenek oluşturarak elde edilen iskelelerin modülü 0,5 MPa civarındadır [76]. Bu değerler ile kriyojelleşme ile oluşturulan 3 boyutlu fibroin yapılarının modülleri karşılaştırıldığında fibroin miktarına bağlı olarak mekanik dayanımın oldukça fazla arttığı anlaşılmaktadır. Bu durum, kriyojelleşme sonucu polimer konsantrasyonu çok yüksek gözenek duvarlarının meydana gelmesiyle ve ağ yapının düzenli ve makro gözeneklere sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Kriyojelleşme sürecinde meydana gelen donmamış mikro bölgelerde fibroin konsantrasyonun beklenenden daha fazla artması (kriyokonsantrasyon) ile açıklanmaktadır.

Bu tez calışmasının amacı, daha üstün mekanik dayanıma sahip fibroin kriyojellerinin eldesidir. Bu amaca yönelik olarak, fibroin konsantrasyonu geniş bir aralıkta değiştirilerek fibroin kriyojelleri elde edilmiş ve ayrıntılı olarak karakterize edilmiştir. Ek olarak, çapraz bağlayıcı yerine sadece farklı konsantrasyonlarda sodyum dodesil sülfat (SDS) sürfaktanı kullanılarak kriyojeller üretilip, jel kesri ve şişme özellikleri ile mekanik dayanımları incelenmiştir. Asağıdaki paragraflardan görüleceği üzere, yapılan çalışmalar sonucunda literatürde rapor edilmiş en yüksek mekanik dayanıma sahip ipek fibroin iskeletleri elde edilmiştir.

3. DENEYSEL KISIM

3.1 Kullanılan Kimyasallar

- *Bombyx Mori* türü ipek böceği kozaları (Bursa Kozabirlik)

İpek fibroini elde etmek için kullanılmıştır.

- Sodyum karbonat (Na_2CO_3, 105,99 g/mol, Merck)

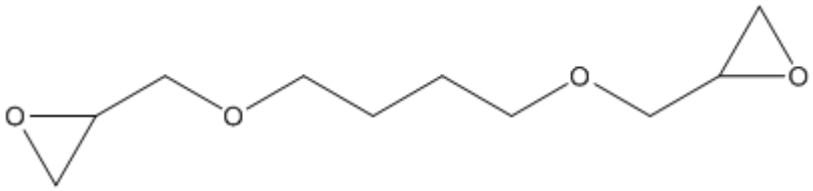
İpekte bulunan serisin proteinini fibroin proteininden uzaklaştırmak amacıyla Na_2CO_3, çözeltisi hazırlanmıştır.

- Lityum bromür (LiBr, 86,84 g/mol, Merck)

İpek fibroini çözmek için LiBr çözeltisi hazırlanmıştır.

- 1,4 bütandiol diglisidil eter (BDDE, 202,25 g/mol, ≥95%, Aldrich)

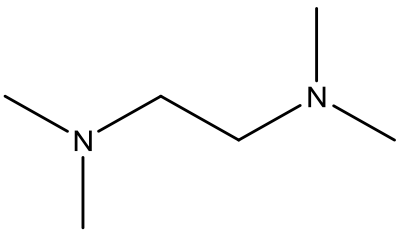
Çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1 : 1,4 bütandiol diglisidil eter.

- *N,N,N',N'*- tetrametiletilendiamin (TEMED, 116,21g/mol, Merck)

Katalizör ve pH ayarlayıcısı olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.2 : *N,N,N',N'*- tetrametiletilendiamin.

- Diyaliz tüpü (Thermo Scientific, Snake skin, 10.000 MWCO)

Fibroin çözeltisinden lityum bromürü uzaklaştırmak ve fibroin çözeltisini seyreltme aşamasında kullanılmıştır.

- Poli(etilen glikol) (PEG, 10000 g/mol, Fluka)

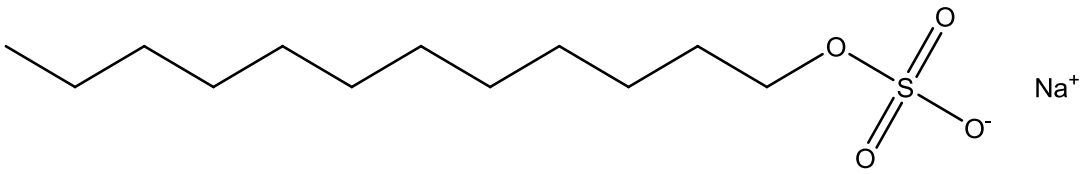
Fibroin çözeltisinin konsantrasyonunu artırmak için PEG çözeltisi hazırlanmıştır.

- Diyaliz tüpü (Thermo Scientific, Snake skin, 3.500 MWCO)

Fibroin konsantrasyonunu arttırmak için diyaliz işlemi sırasında kullanılmıştır.

- Sodyum dodesil sülfat (SDS, 288,38 g/mol, Merck)

Yüzey aktif madde (Sürfaktan) olarak kullanılmışır.



Şekil 3.3 : Sodyum dodesil sülfat.

3.2 İpek Kozasından Fibroin Eldesi ve Sulu Fibroin Çözeltisinin Hazırlanması

İpek kozalarının içerisinden ipek böcekleri çıkartılıp temizleme işlemi yapılmıştır. Kesilen ipek kozalarından yaklaşık 10 gramı musluk suyu altında ve ardından saf su ile yıkanarak iyice temizlenmiştir.

İlk olarak fibroini serisinden ayırmak için 1 L, 0,02 M Na_2CO_3 çözeltisi hazırlanmıştır. Çözelti kaynamakta iken ipek kozaları çözelti içine atılıp ve 1 saat süresince ipek kozaları kaynatılarak serisin uzaklaştırılmıştır. Ardından dört kez 1 L saf suda 70^oC'de yıkama işlemi yapılmıştır. Son kez 2 L saf suda 60^oC' de olmak üzere yıkanarak diğer istenmeyen bileşenler uzaklaştırılmıştır.

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra fibroin yapısına zarar vermeden parçalara ayırıp 24 saat süresince desikatörde kurutulmaya bırakılmıştır.

Kuru haldeki fibroin 50 ml, 9,3 M LiBr çözeltisinde 60^oC'de yaklaşık 1,5 saat içerisinde çözülmüştür.

LiBr tuzunun uzaklaştırılması için diyaliz tüpü (10.000 MWCO) içerisine ipek fibroin çözeltisi konulmuştur ve 3 gün boyunca saf suya karşı diyaliz işlemi yapılmıştır. Diyaliz işlemi sonunda LiBr içermeyen, yaklaşık % 5 konsantrasyonda ipek fibroin çözeltisi elde edilmiştir.

İpek fibroin çözeltisinin konsantrasyonunu arttırmak için 1 L, kütlece % 10-15 PEG çözeltisi hazırlanmıştır. Diyaliz tüpü (3.500 MWCO) içerisine % 5 konsantrasyonda fibroin çözeltisi konulmuş ve ardından hazırlanan PEG çözeltisine karşı 1-2 gün boyunca diyaliz işlemi uygulanmış, bu şekilde fibroin konsantrasyonunun % 5 ile % 77 arasında ayarlanması sağlanmıştır.

3.3 İpek Fibroin Kriyojellerinin Sentezi

Diyaliz sonrası elde edilen fibroin çözeltilerinin gravimetrik yöntemle konsantrasyonları belirlenmiştir. Kriyojeller, BDDE çapraz bağlayıcısı veya SDS sürfaktanı kullanılmak üzere iki ayrı yöntemle sentezlenmiş olup ayrıntılar aşağıda verilmektedir.

a) BDDE çapraz bağlayıcısı kullanılarak kriyojel sentezleri: Çizelge 3.1' de belirtilen miktarlarda BDDE, TEMED ve saf su kullanılarak kriyojelleşme yöntemi ile farklı konsantrasyonlarda ipek fibroin kriyojelleri elde edilmiştir. Katalizör ve pH ayarlayıcı olarak kullanılan TEMED miktarı % 0,25 (hac/ağ) olacak şekilde sabit tutulmuştur. BDDE miktarı ise 0,11 ml ile 2,2 ml arasında değişmektedir. Sentez sırasında ani jelleşmeleri önlemek için yüksek fibroin konsantrasyonu içeren çözeltilerde daha düşük miktarlarda çapraz bağlayıcı kullanılmıştır. Eklenen su miktarı ise 0-4,7 ml arasında değişmektedir.

Oda koşullarında hazırlanan jel çözeltileri manyetik karıştırıcıda homojen bir şekilde karıştırılmasının ardından iç çapları 4 mm olan 1'er ml' lik plastik şırıngalara çekilerek sıcaklığı -18^{o}C olan buzdolabının derin dondurucusuna bırakılmıştır. Konsantrasyonu % 1 ile 61,4 arasında değişen ipek fibroin jelleşmesi 24 saat boyunca -18^{o}C' de gerçekleşmiştir.

Çizelge 3.1 : BDDE çapraz bağlayıcısı varlığında kriyojellerinin eldesinde kullanılan kimyasalların miktarları.

Diyaliz sonrası fibroin konsantrasyonu (g /g çözelti)	Fibroin çözeltisi miktarı (g)	BDDE (ml)	Su (ml)	Toplam çözelti miktarı (g)	% Fibroin (g/g çözelti)	% TEMED (hac/ağ)
0,05	1,1	0,1	4,7	6,0	1,0	0,25
0,05	2,4	0,2	3,4	6,0	2,0	0,25
0,05	3,6	0,3	2,1	6,0	3,0	0,25
0,05	5,0	0,5	0,5	6,0	4,2	0,25
0,09	5,0	0,8	0,2	6,0	7,5	0,25
0,16	4,0	1,15	0,4	5,5	11,6	0,25
0,19	4,0	1,4	0,6	6,0	12,6	0,25
0,19	6,0	2,2	0,2	8,4	13,5	0,25
0,27	6,5	1,6	1,3	9,4	18,8	0,25
0,24	5,0	0,7	0,3	6,0	20,2	0,25
0,28	3,0	0,3	0,7	4,0	21,0	0,25
0,32	4,0	1,2	0,3	5,5	23,6	0,25
0,32	5,0	0,50	0,0	5,5	29,1	0,25
0,48	4,0	0,50	0,5	5,0	38,4	0,25
0,52	3,0	0,50	0,5	4,0	39,0	0,25
0,60	4,0	1,00	1,0	6,0	39,9	0,25
0,68	4,0	1,00	1,0	6,0	45,3	0,25
0,52	4,0	0,25	0,3	4,5	46,2	0,25
0,77	4,0	0,50	0,5	5,0	61,4	0,25

b) SDS sürfaktanı kullanılarak kriyojel sentezleri: Çizelge 3.2' de % 4,2 fibroin ve farklı SDS konsantrasyonlarında hazırlanan jelleşme çözeltilerinin içerdiği kimyasal miktarları belirtilmiştir. 5 ml, % 4,2 konsantrasyonunda ipek fibroin (İF) çözeltilerine farklı molaritelerde hazırlanan stok SDS çözeltilerinden 1' er ml eklenip toplam hacim 6 ml olacak şekilde jel çözeltileri hazırlanmış, çözeltilerdeki SDS molarite miktarının 5 ile 125 mM arasında ayarlanması sağlanmıştır.

Manyetik karıştırıcıda homojen karışım sağlandıktan sonra iç çapları 4 mm olan 1'er ml' lik plastik şırıngalara çekilerek sıcaklığı -18^{o}C olan buzdolabının derin dondurucusunda 48 saat boyunca kriyojelleşme reaksiyonlarının tamamlanması için bırakılmıştır.

Çizelge 3.2 : Sürfaktan varlığında kriyojellerinin eldesinde kullanılan kimyasalların miktarları.

Stok SDS çözeltisi (mM)	%5 İF çözeltisi (ml)	SDS çözelti hacmi (ml)	Toplam jel çözelti hacmi (ml)	% İF (ağ/hac)	SDS (mM)
30	5	1	6	4.2	5
120	5	1	6	4.2	20
210	5	1	6	4.2	35
300	5	1	6	4.2	50
390	5	1	6	4.2	65
570	5	1	6	4.2	95
750	5	1	6	4.2	125

Hem BDDE hem de SDS varlığında kriyojelleşmenin gerçekleşmesinin ardından suda şişme dengesine ulaşılması ve ardından dondurmalı kurutucuda kurutma işlemleri yapılarak mekanik testleri ve karakterizasyonu tamamlanmıştır.

3.4 İpek Fibroin Kriyojellerinin Karakterizasyonu

3.4.1 Şişme davranışları ve jel kesri

Sentez sonrası şırıngalardan çıkarılan kriyojellerden parçalar kesilerek sentez sonrası ağırlıkları (m_0) ve dijital kumpas ile sentez sonrası çapları (D_0) ölçülüp şişme dengesine ulaşması için saf su içerisinde bekletilmiştir. 3 günde şişme dengesine ulaştıktan sonra şişmiş durumdaki ağırlık ($m_{şişmiş}$) ve şişmiş durumdaki çapları ($D_{şişmiş}$) ölçülmüş, ardından ağırlıkça bağıl şişme oranları (m_{rel}) ve hacimce bağıl şişme oranları (V_{rel}) aşağıdaki formüller yardımıyla hesaplanmıştır.

$$m_{rel} = \frac{m_{şişmiş}}{m_o} \tag{3.1}$$

$$V_{rel} = \left(\frac{D_{şişmiş}}{D_o}\right)^3 \tag{3.2}$$

Suda denge durumundaki kriyojeller dondurmalı kurutucu cihazında 3 gün süresince kurutulmaya bırakılmıştır. Dondurmalı kurutucuda 1.gün kriyojellerin dondurulması -25^{o}C' de gerçekleştirilmiştir. Ardından kurutma aşamasına geçilmiştir. 2. gün -40^{o}C, 0,12 mbar, 3. gün -60^{o}C, 0,01 mbar sıcaklık ve basınç değerlerinde kurutma işlemleri

tamamlanmıştır. Kriyojellerin kuru durumdaki kütleleri (m_{kuru}) ve çapları (D_{kuru}) ölçüldükten sonra kuru duruma göre ağırlıkça (q_w) ve hacimce şişme oranları (q_v) aşağıdaki denklemlerle hesaplanmıştır.

$$q_w = \frac{m_{şişmiş}}{m_{kuru}} \tag{3.3}$$

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

q_w ve q_v değerleri aşağıdaki bağıntıda kullanılarak kriyojelin toplam gözenekliliği teorik olarak hesaplanmıştır[24].

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

Denklemde P toplam gözenek kesri, ρ ise fibroin yoğunluğudur (1,35 g/mL) .

Kuru durumdaki ipek fibroin kriyojellerinin jel kesri (W_g), başka bir ifade ile bir gram ipek fibroinden elde edilen çapraz bağlı fibroin miktarı, kuru durumdaki (m_{kuru}) ve sentez sonrası (m_o) jel ağırlıkları ile fibroin konsantrasyonuna ($C_{İF}$, g İF/g çözelti cinsinden) bağlı olarak aşağıdaki bağıntı kullanılarak hesaplanmıştır.

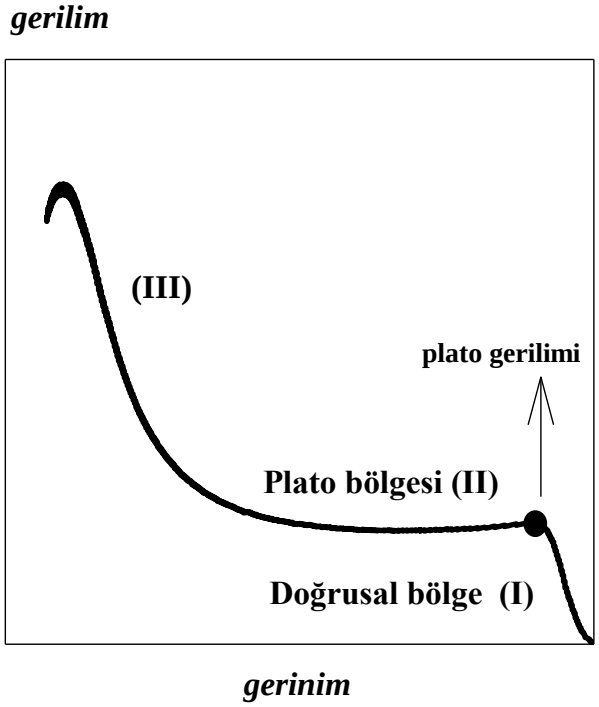
$$W_g = \frac{m_{kuru}}{m_0\, C_{İF}} \tag{3.6}$$

3.4.2 Mekanik ölçümler

Malzemelerin mekanik özellikleri, tek eksenli sıkıştırma testlerinden elde edilen gerilim-gerinim grafikleri yorumlanarak belirlenmiştir. Sentezlenen ipek fibroin kriyojellerinin Young modülünü (E), plato ve basınç dayanım gerilimini belirlemek için evrensel test cihazı (Zwick/Roell Z 0.05) kullanılmıştır. Ölçümler, 500 N' luk yük hücresi kullanılarak 3-4 mm çapındaki silindirik numunelere 0,1 N' luk ön yük uygulanıp, 24 ± 0,5ºC ve 0,3 mm/dak test hızında gerçekleştirilmiştir. Parçalanma gerilimini ($\sigma_{parçalanma}$) görebilmek için germe-koparma-sıkıştırma test cihazı (Devotrans GL.E) kullanılmıştır. Ölçümler 10 kN'luk yük hücresi ile 1 N ön yük uygulanarak 3-4 mm çapında silindirik numuneler kullanılarak 24 ± 0,5ºC ve 0,6 mm/dak test hızında gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.4' de ipek fibroin kriyojellerinin tipik bir gerilim-gerinim eğrisi şematik olarak verilmiştir [39]. Şekilden görüldüğü gibi gerilim-gerinim eğrileri 3 bölgeden

oluşmaktadır. Birinci bölge gözenekli yapının mekanik olarak dayanıklı olduğu doğrusal bölgedir. İkinci bölge ise plato bölgesi olarak adlandırılmaktadır. Bu bölge, gözeneklerin deforme olduğu bölgedir. Üçüncü bölge ise, eğiminin hızla arttığı ve hemen hemen tüm gözeneklerin çöktüğü durumda malzemenin kuvvete maruz kaldığı bölgedir. Gerilim-gerinim eğrilerinin birinci, yani doğrusal bölgesinde % 2-4 deformasyon aralığındaki eğim değerinden Young modül (*E*) hesaplanmıştır. Gözeneklerin parçalanmaya başladığı gerilim değeri, yani plato gerilimi (σ_{plato}), gerilim-gerinim eğrileri plato bölgesinin başlangıç noktasından hesaplanmıştır (Şekil 3.4). Ayrıca, % 3'deki gerinim değerine karşılık gelen basınç dayanım değeri belirlenmiştir.



Şekil 3.4 : Gerilim-gerinim eğrisinde plato geriliminin ve eğri bölgelerinin örnek gösterimi.

Evrensel test cihazı ve germe-koparma-sıkıştırma test cihazında uygulanan kuvvet sonucunda oluşan gerilim değerleri nominal (σ_{nom}) ve gerçek gerilim ($\sigma_{gerçek}$) olmak üzere iki farklı türde hesaplanmıştır. Nominal gerilim, kuvvet uygulanan numunenin başlangıç kesit alanına göre hesaplanan gerilim değeridir. Gerçek gerilim ise, numunenin herhangi deformasyon anındaki birim yüzeye etki eden kuvvettir [22].

$$\sigma_{nom} = \frac{F}{A_0} \tag{3.7}$$

$$\sigma_{gerçek} = \frac{F}{A} = \sigma_{nom}\,\lambda \tag{3.8}$$

Denklemlerde F uygulanan kuvvet, A_0 ve A sırasıyla kuvvet uygulanan malzemenin başlangıç ve herhangi bir deformasyon anındaki kesit alanındır. λ ise, deformasyon oranıdır. Başlangıç kesit alanı ve deformasyon oranı aşağıdaki bağıntılar kullanılarak hesaplanmıştır.

$$A_0 = \pi(\frac{D}{2})^2 \tag{3.9}$$

$$\lambda = \frac{L}{L_0} \tag{3.10}$$

Kesit alanı hesaplanırken malzemenin başlangıç çapı (D) ölçülmüştür. Malzemenin deformasyon oranını (λ) hesaplamak için başlangıç (L_0) ve sıkıştırma anındaki uzunluğu (L) belirlenmiştir.

Sonuç olarak, gerilim-gerinim grafikleri, nominal gerilim-deformasyon oranı ve gerçek gerilim-deformasyon oranı olarak çizilmiştir.

Parçalanma gerilimini belirlemek için deformasyon oranına karşı nominal ile gerçek gerilim eğrileri çizilmiştir. Şekil 3.5' de parçalanma gerilimin belirlenmesi gösterilmektedir. Gerçek gerilim eğrisinde maksimum gerilim değerine karşılık gelen deformasyon oranındaki nominal gerilim değeri, o malzemenin parçalanma gerilim değerini vermektedir. Ayrıntılar sonuçlar bölümünde verilecektir.

3.4.3 Morfolojik özelliklerin incelenmesi

Sentezlenen jellerin morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM, Joel JSM 9335F Field Emission) yardımıyla çeşitli büyütmelerde (25, 100, 500, 1000 büyütme oranı) incelenmiştir. Su içerisinde şişme dengesine gelmiş olan jeller dondurmalı kurutucuda vakum altında kurutulduktan sonra kuru örnekler altın ile kaplanarak *SEM* ölçümleri alınmıştır.



Şekil 3.5 : Deformasyon oranına karşı çizilen nominal (mavi) ve gerçek gerilim eğrilerinde (kırmızı) parçalanma geriliminin belirlenmesi.

3.4.4 ATR-FTIR ölçümleri

Fibroin ağ yapısında meydana gelen konformasyonel değişimleri belirlemek amacıyla Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektrometresi cihazı (ATR-FTIR, Nicolet Nexus 6700) yardımıyla ölçümler alınmıştır. Amid I bölgesindeki spektrumlar (1580-1720 cm^{-1}) *Peak Fit* (Version 4.12 SeaSolve Software) yazılımıyla doğrusal düzeltme uygulanıp, Gauss fonksiyonu kullanılarak analiz edilmiştir. Sırasıyla β-tabaka, rastgele yumak, α-sarmal ve β-döngü konformasyonlarına karşılık gelen 1620, 1640, 1660 ve 1698 cm^{-1} piklerinden faydalanılarak konformasyonel değişimler sayısal olarak belirlenmiştir [53].

4. BULGULAR ve DEĞERLENDİRMELER

Yapılan çalışmalarda ipek fibroin konsantrasyonu değiştirilerek fonksiyonel, mekanik dayanımı yüksek ve gözenek boyutu ayarlanabilir kriyojeller üretilmiştir. -18^{o}C'de kriyojelleşme tekniği ile bağlantılı makrogözenekli ağ yapıya sahip kriyojeller elde edilmiştir. İpek fibroin kriyojelleri kemik-doku mühendisliğinde yapı isketleri olarak kullanılmaktadır.

BDDE çapraz bağlayıcı varlığında fibroin konsantrasyonun değişmesiyle beraber kriyojellerin mekanik, morfolojik ve şişme özelliklerinin de değiştiği ortaya konulmuştur.

Ayrıca, fibroin miktarı % 4,2' de sabit tutulup farklı miktarlarda SDS sürfaktanı kullanılarak ipek fibroin kriyojelleri elde edilmiş, jel kesri ve şişme davranışları ile Young modülleri incelenmiştir. Ayrıntılar aşağıdaki bölümlerde verilmektedir.

4.1 Çapraz Bağlayıcı Varlığında Hazırlanan Kriyojellerin Özellikleri

Ağırlıkça % 1 ile % 61,4 arasında değişen ipek fibroin konsantrasyonlarında ve BDDE çapraz baglayıcısı varlığında kriyojeller üretilmiştir. Çapraz bağlayıcı varlığında ipek fibroin konsantrasyonu değiştirilerek elde edilen kriyojellerin jel kesri ve şişme davranışları, morfolojik yapıları ve mekanik özellikleri incelenmiştir.

4.1.1 Jel kesri ve şişme özellikleri

Sentez sonrası şişme dengesine ulaşması için kriyojel örneklerinden 3'er parça kesilerek su içerisine bırakılmıştır. Gün içerisinde ağırlıkları ve elektronik kumpas ile çap ölçümleri yapılmıştır. 3 gün sonra dengeye ulaştığı saptanmıştır. Şişme dengesi sonrası gözeneklerdeki suyun uzaklaştırılması için dondurmalı kurutucu cihazında kurutulmuştur. Kuru durumdaki kriyojel örneklerinin ağırlıkları ve çapları tekrar ölçülerek ortalamaları alınarak şişme değerleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.1' de BDDE çapraz bağlayıcısı kullanılarak farklı konsantrasyonlarda sentezlenen ipek fibroin (İF) kriyojelleri için jel kesri, şişme değerleri ile % gözeneklilik verileri gösterilmektedir.

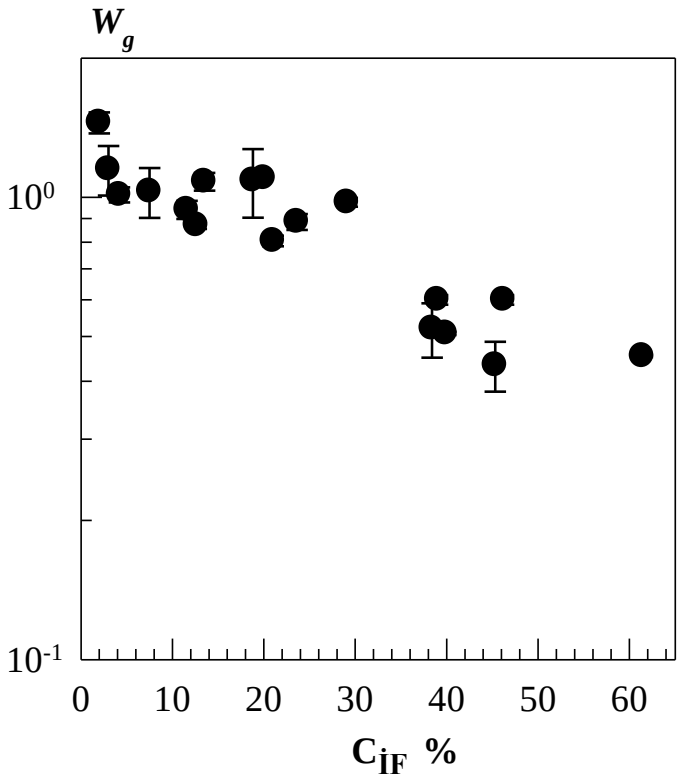
Çizelge 4.1 : Çapraz bağlayıcı kullanılarak farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında elde edilen kriyojellerin jel kesirleri, şişme oranları ve % gözeneklilik değerleri. Çizelgede ± kolonunda değerlerin standart sapmaları verilmiştir.

% İF (ağ/ağ)	W_g	±	m_{rel}	±	V_{rel}	±	q_w	±	q_v	±	% Gözeneklilik
1,0	2,1	0,0	0,7	0,0	1,6	0,0	35,0	0,0	1,3	0,0	97
2,0	1,45	0,1	0,8	0,0	0,9	0,0	27,0	0,4	1,1	0,0	97
3,0	1,15	0,1	0,7	0,0	0,75	0,0	20,0	1,8	1,4	0,0	95
4,2	1,0	0,0	0,75	0,0	0,7	0,1	18,0	0,9	1,4	0,0	94
7,5	1,0	0,1	0,6	0,0	0,8	0,0	8,2	0,8	1,4	0,0	87
11,6	1,0	0,0	0,8	0,0	0,8	0,0	7,1	0,1	1,2	0,0	87
12,6	0,9	0,0	0,9	0,0	0,9	0,0	7,85	0,1	1,1	0,1	89
13,5	1,1	0,0	0,9	0,0	0,9	0,0	6,1	0,1	1,2	0,0	85
18,8	1,1	0,2	0,9	0,0	0,85	0,1	5,1	0,2	1,2	0,0	81
20,0	1,1	0,0	0,9	0,0	0,8	0,0	4,1	0,1	1,3	0,0	76
21,0	0,8	0,2	0,9	0,0	0,9	0,0	5,8	0,1	1,6	0,0	79
23,6	0,9	0,0	0,8	0,0	0,9	0,0	3,75	0,2	1,3	0,0	72
29,1	1	0,0	1,0	0,0	0,9	0,0	3,4	0,0	1,2	0,0	73
38,4	0,5	0,1	1,0	0,0	1,00	0,0	5,1	0,1	1,2	0,0	82
39,0	0,60	0,0	0,9	0,0	0,9	0,0	4,0	0,0	1,25	0,0	75
39,9	0,5	0,0	0,9	0,0	0,9	0,0	4,5	0,1	1,1	0,0	81
45,3	0,4	0,0	0,9	0,1	0,9	0,1	4,75	0,2	1,2	0,0	80
46,2	0,6	0,0	1,0	0,0	0,9	0,0	3,6	0,0	1,1	0,0	75
61,4	0,45	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	3,0	0,0	1,2	0,0	69

Şekil 4.1'de ipek fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak jel kesri değişimi görülmektedir. Jel kesri, % 30 fibroin konsantrasyonuna kadar 1 civarındadır. Bu değerin 1'e eşit oluşu, başlangıçtaki fibroin miktarının tamamının ağ yapıya katıldığını göstermektedir.

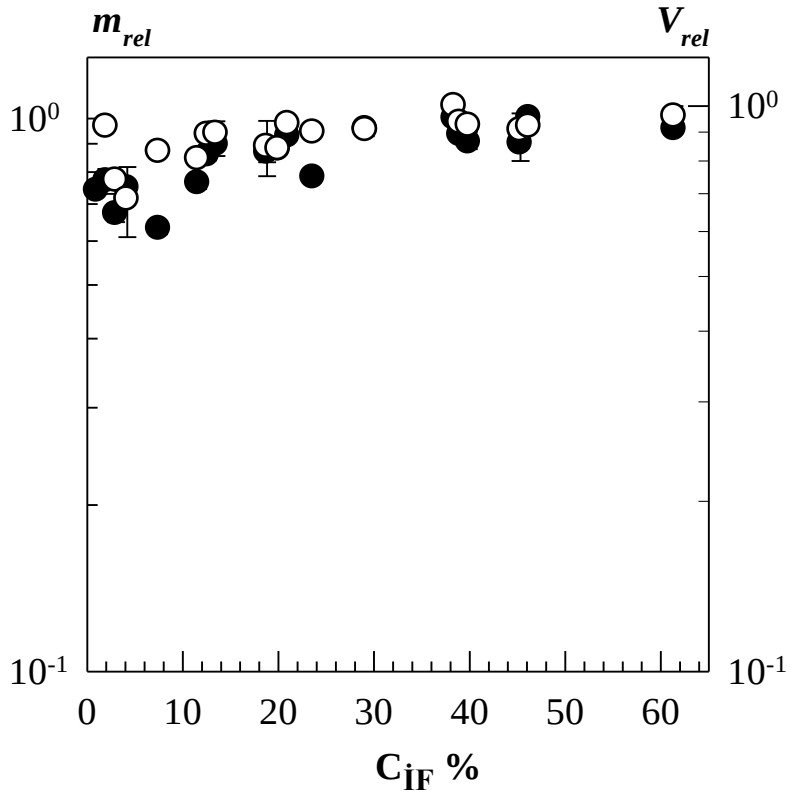
Diğer yandan, düşük fibroin konsantrasyonlarında (< % 4,2) jel kesrinin 1'den büyük oluşu ise, bir miktar suyun sadece gözeneklerde bulunmayıp fibroin ağ yapısına bağlı kaldığını ve şişmiş durumdaki fibroin kriyojellerinin tam olarak kurumadığını göstermektedir (Şekil 4.1).

% 30'dan daha yüksek fibroin konsantrasyonlarında elde edilen kriyojellerde ise jel kesri yarıya düşmekte, yani 0,5 civarında olduğu görülmektedir. %30' dan daha yüksek ipek fibroin konsantrasyonunda elde edilen kriyojellerde fibroin miktarının tamamının çapraz bağlanamadığını göstermektedir.



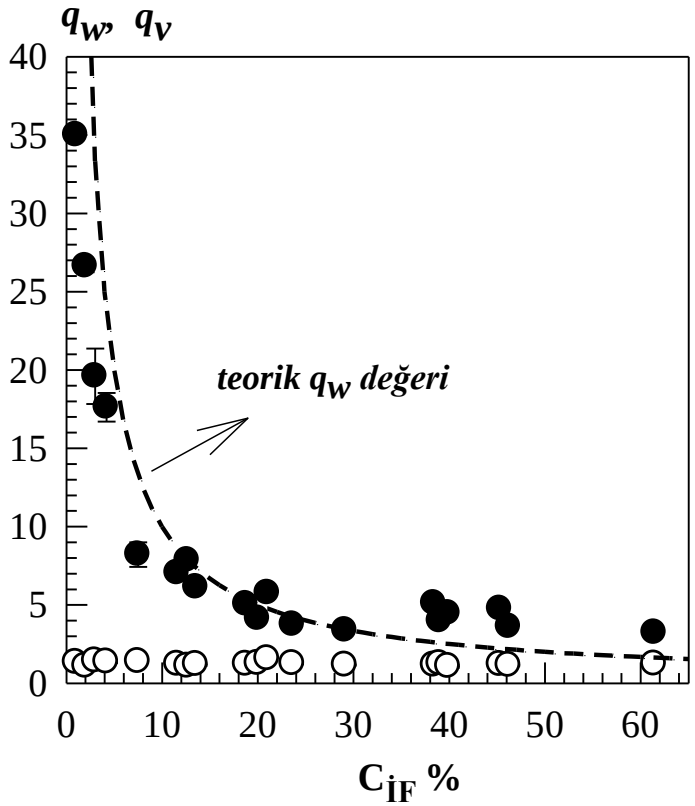
Şekil 4.1 : Farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında (C_{iF}) elde edilen kriyojellerin jel kesri sonuçları.

Sentez sonrası duruma göre ölçülen ağırlıkça bağıl şişme (m_{rel}) ve hacimce bağıl şişme (V_{rel}) sonuçları ise Şekil 4.2' de verilmiştir. m_{rel} ve V_{rel} değerlerinin yaklaşık 1 olduğu görülmektedir. Başlangıç fibroin konsantrasyonundan bağımsız olarak kriyojellerin su içerisinde ağırlıkça ve hacimce ilave bir şişme göstermediği ortaya konulmuştur.



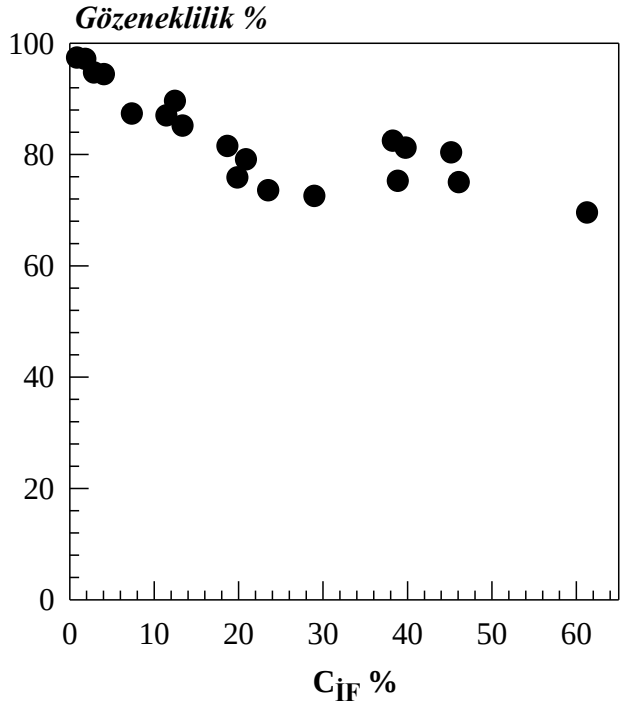
Şekil 4.2 : Farklı ipek fibroin konsantrasyonlarındaki ($C_{İF}$) kriyojellerin m_{rel} (●) ve V_{rel} (○) değerleri.

Farklı konsantrasyonlarda elde edilen her bir kriyojel için kuru duruma göre hesaplanan ağırlıkça (q_w) ve hacimce (q_v) şişme değerleri Şekil 4.3' de görülmektedir. % 1'den % 61,4'e kadar artan İF konsantrasyonu ile q_w değerinin 35'den 3'e düştüğü, q_v değerinin ise hemen hemen değişmediği ve 1 civarında kaldığı görülmektedir. Diğer bir ifade ile, kurutulmuş durumdaki ipek fibroin kriyojelleri su içerisine bırakıldığında hacimleri değişmemekte, buna karşılık ağırlıkları artmakta ve bu artış azalan fibroin konsantrasyonu ile daha fazla gerçekleşmektedir. Sonuçlar, şişme prosesi sırasında suyun kriyojel gözeneklerini doldurduğunu, buna karşılık fibroin ağ yapı hacminde bir değişime yol açmadığını gösteriyor. Dolayısıyla, jellerin ağırlıkça şişme oranları (q_w), sentez sırasındaki ipek fibroin konsantrasyonuna ($C_{İF}$) bağlı olduğu düşünülerek $1/C_{İF}$ olarak hesaplanabilir. Şekil 4.3'de kesikli eğri ile teorik q_w 'nin ($=1/C_{İF}$) fibroin konsantrasyonu ile değişimi gösterilmiştir. Teorik eğrinin deneysel ölçüm sonuçları ile uyum içinde olduğu görülüyor. Yüksek ipek fibroin konsantrasyonlarda ortaya çıkan sapma, jel kesrinin 1'den küçük olması ile açıklanabilir.



Şekil 4.3 : Farklı İF konsantrasyonlarında sentezlenen kriyojellerin q_w(●), q_v (○) değerleri ve teorik q_w eğrisinin (=1/$C_{İF}$, kesikli eğri) gösterimi.

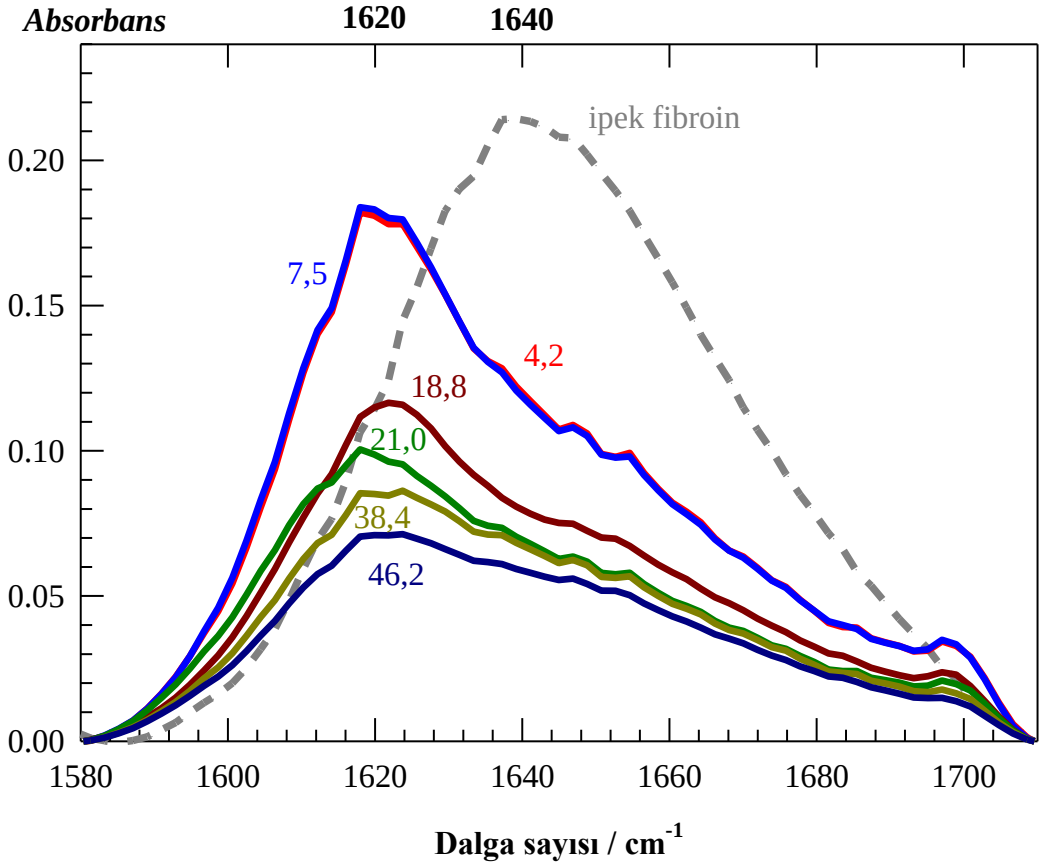
3.5 denkleminden görüleceği üzere, q_v ile q_w arasındaki fark malzemenin toplam gözenekliliği hakkında bilgi vermektedir. q_w ile q_v arasındaki fark ne kadar fazla ise toplam gözenek hacmi de o kadar fazla olacaktır. Bunun nedeni, kriyojelleşme sırasındaki suyun donarak kalıp etkisi göstermesidir. q_w ile q_v arasındaki fark fibroin ağ yapısındaki makro gözeneklerin varlığını belli etmektedir. Şekil 4.4' de fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak kriyojel toplam gözenekliliğinin değişimi görülmektedir. Kriyojellerin toplam gözenekliliğinin yüzde oranı, fibroin konsantrasyonunu % 1'den % 61,4'e çıkarıldığında, % 97'den % 69'a kadar değişmektedir. % 30'dan yüksek konsantrasyonlarında görülen sapmalar, donmamış mikro bölgelerde fibroin konsantrasyonun oldukça fazla artacak olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.4 : Fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak değişen gözeneklilik yüzdesi.

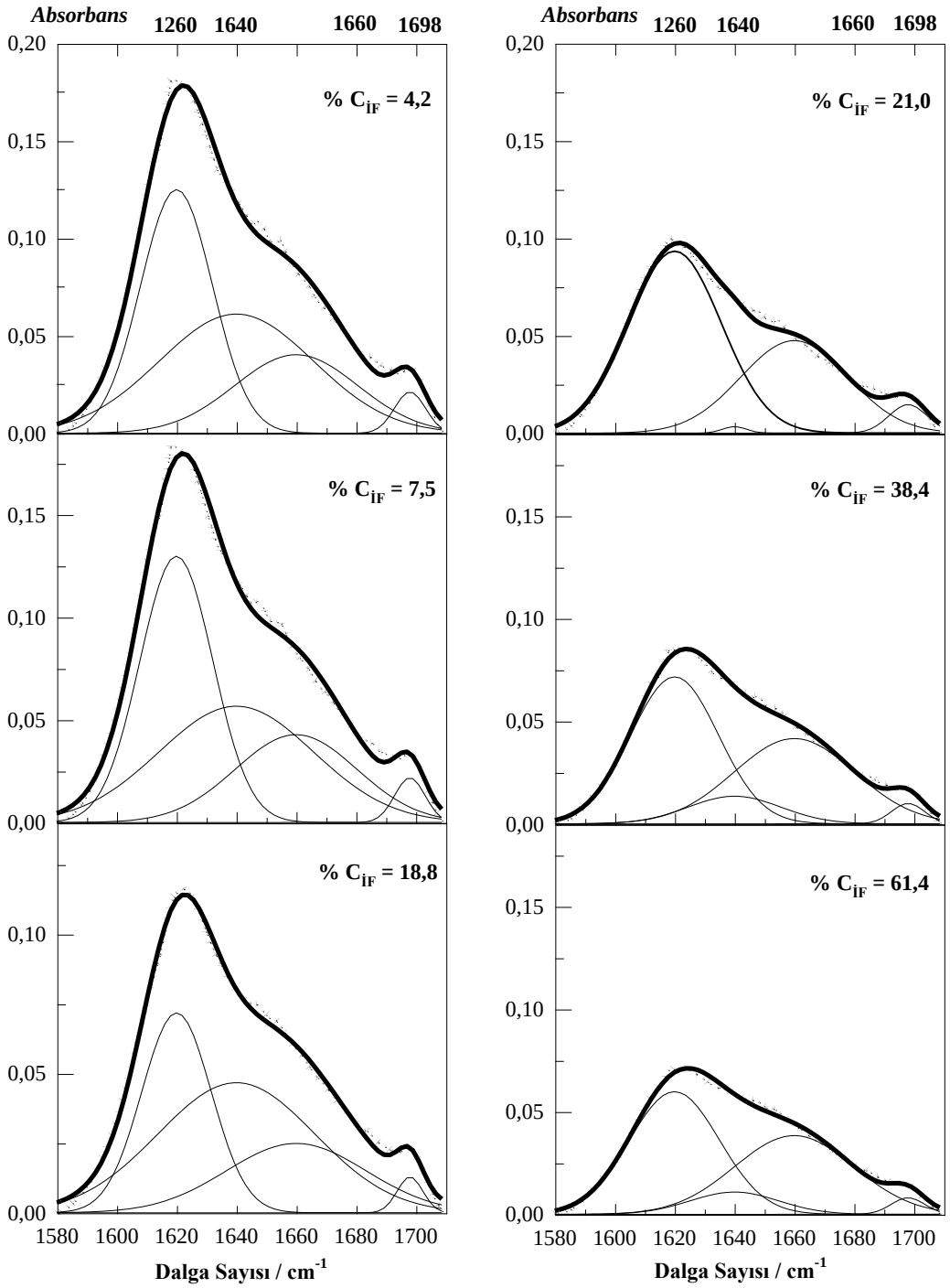
4.1.2 Kriyojel ağyapı zincirlerinin konformasyonu

İpek fibroin çözeltilerinin kriyojelleşme yöntemi ile çapraz bağlayıcı olmadan 24 saatte jelleşemediği görülmüştür. BDDE çapraz bağlayıcısı varlığında ise kriyojelleşme yöntemi ile hidrofilik kısımların çapraz bağlanması sonucu, hidrofobik etkileşimlerin arttığı, jelleşme hızlı bir şekilde 24 saat sonunda gerçekleştiği görülmüştür. Şekil 4.5' de fibroinin kriyojelleşme öncesi ve kriyojelleşme sonrası Amid I bölgesindeki spektrumları gösterilmiştir. Kesikli eğri, dondurmalı kurutucuda kurutulan % 5 konsantrasyonundaki ipek fibroin çözeltisinin spektrumudur. Kalın kesiksiz eğriler ise üzerinde belirtilen fibroin konsantrasyonlarında (% olarak), çapraz bağlayıcı varlığında elde edilen kurutulmuş kriyojellerin spektrumlarıdır. Jelleşme öncesi ipek fibroin spektrumunda 1640 cm^{-1} dalga sayısında görülen ve rastgele yumak konformasyonuna karşılık gelen pik, jelleşme sonrası tüm farklı konsantrasyonlarda sentezlenen kriyojel örnekleri için 1620 cm^{-1}' de görülmektedir. Bu durum, çapraz bağlayıcı varlığında jelleşmenin gerçekleştiğini ve ipek fibroinin rastgele yumaktan β-tabaka konformasyonuna geçtiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.5 : İpek fibroinin jelleşme öncesi (kesikli eğri) ve BDDE varlığında jelleşme sonrası (kalın eğriler) ATR- FTIR spektrumları. Kriyojelleşme sırasındaki fibroin konsantrasyonları (%) şekilde verilmiştir.

İpek fibroin ağ yapısının konformasyon değerlerini belirlemek için Amid I bölgesi pikleri, *Peak Fit* yazılımı kullanılarak, doğrusal düzeltme ve Gaus modeli uygulandıktan sonra 1620, 1640, 1660 ve 1698 cm^{-1} dalga sayıları değerlerinde sabitlenmiştir. Sırasıyla bu dalga sayılarına karşılık gelen β-tabaka, rastgele yumak, α-heliks ve β-döngü konformasyonlarının değerleri eğrilerin altındaki alanlar hesaplanarak belirlenmiştir [39]. Farklı konsantrasyonlarda elde edilen ipek fibroin kriyojellerinin *ATR-FTIR* eğrileri Şekil 4.6' da görülmektedir. Noktasal eğriler orijinal spektrumları, kalın eğriler *Peak Fit* yazılımı ile elde edilen spektrumları ve ince eğriler ise, orijinal eğri altındaki gizli pikleri göstermektedir.



Şekil 4.6 : Farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında (C_{iF}) elde edilen kriyojellerinin Amid I bölgesi ATR-FTIR spektrumları. *Peak Fit* yazılımı ile elde edilen spektrum (kalın eğri), orijinal ATR-FTIR spektrumu (noktasal eğri) ve orijinal spektrum altında kalan gizli pikler (ince eğri).

Farklı konsantrasyonlardaki ipek fibroin kriyojellerinin konformasyon oranları Çizelge 4.1' de gösterilmiştir. Kriyojelleşme öncesi ipek fibroin yapısındaki β-tabaka oranı % 12,5 ± 2,1 olarak belirlenmiştir. % 4,2 konsantrasyonundaki ipek fibroinin kriyojelleşmesi sonunda β-tabaka oranı ise % 35,5 ± 2,1' dir.

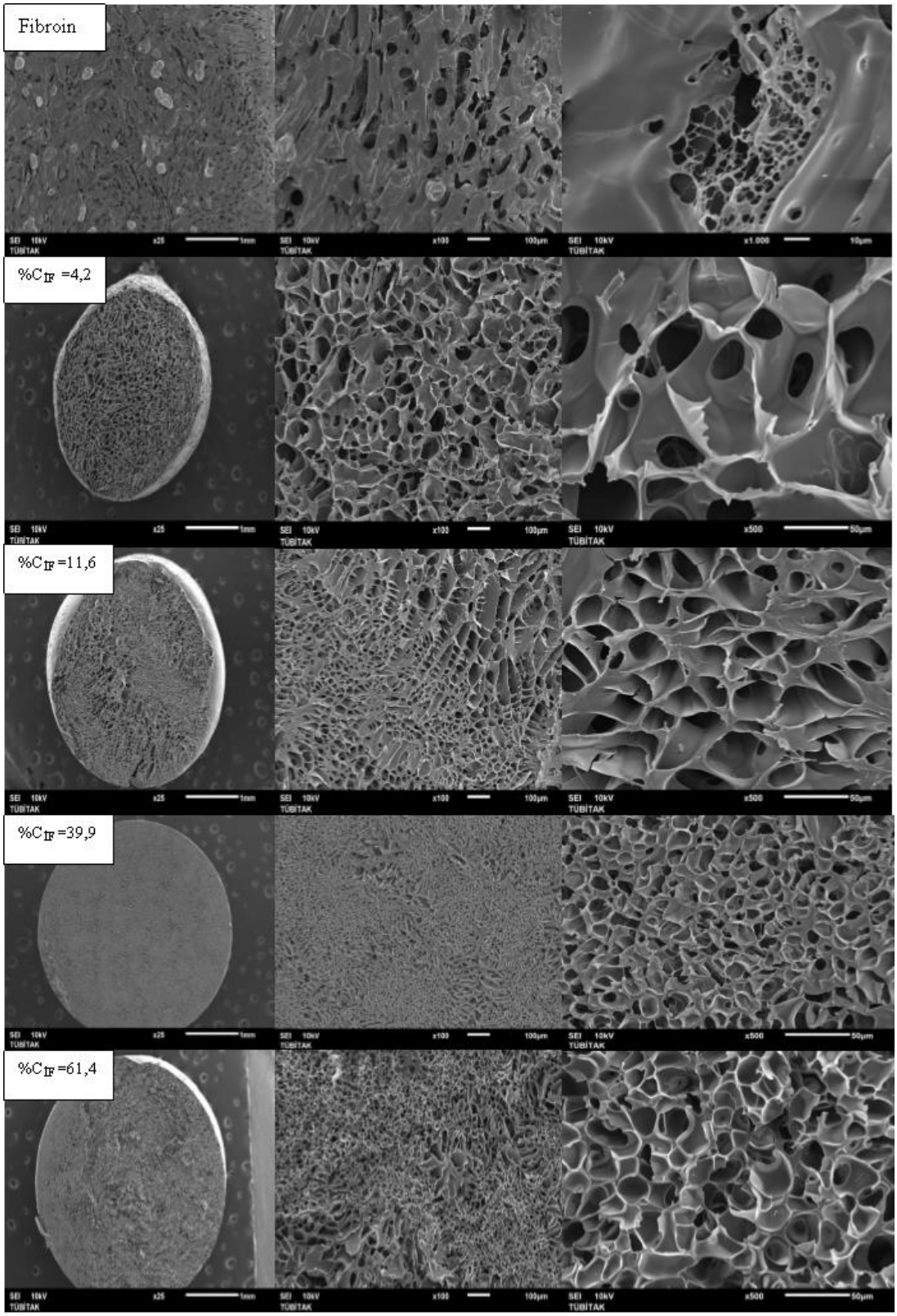
BDDE yardımıyla fibroin zincirleri üzerindeki hidrofilik kısımların çapraz bağlanıp hidrofobik kısımların hareketliliği de azalmakta ve sonucunda hidrofobik etkileşimler artmaktadır. Bunun sonucunda fibroin zincirleri arasında β-tabaka konformasyonları ortaya çıkmaktadır. İpek fibroin konsantrasyonu % 21' e çıkarıldığında β-tabaka oranının % 58,5 ± 2,1 değerine kadar arttığı görülmektedir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 : Farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında ($C_{İF}$) elde edilen kriyojellerin yüzde konformasyon oranları.

% $C_{İF}$	% β-tabaka	±	% β-döngü	±	% rastgele yumak	±	% α-heliks	±
4,2	35,5	2,1	2,4	0,5	41,0	2,8	20,5	0,7
7,5	37,0	2,8	2,4	0,5	38,0	2,8	21,5	0,7
18,8	31,0	0,0	2,0	0,0	45,0	0,0	21,0	0,0
21,0	58,5	2,1	3,6	0,8	1,3	1,1	36,0	1,4
38,4	48,0	1,4	2,7	0,2	9,0	11,3	35,5	5,0
46,2	48,5	0,7	2,5	0,7	8,5	0,7	40,5	0,7
61,4	36,0	0,0	1,1	0,0	47,0	0,0	16,0	0,0

4.1.3 Morfolojik Özellikler

İpek fibroin iskeletlerinin morfolojik yapılarının ve ipek fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak gözenek boyutlarının nasıl değiştiğini inceleyebilmek amacıyla kuru durumdaki kriyojellerin taramalı elektron mikroskop (*SEM*) yardımıyla görüntüleri çekilmiştir. Şekil 4.7' de % 5 fibroin konsantrasyonunda dondurulup kurutulan fibroin çözeltisi ile farklı fibroin konsantrasyonunda sentezlenen kriyojellerin 3 farklı büyütmede SEM görüntüleri (soldan sağa) verilmiştir.



Şekil 4.7 : İpek fibroin ve BDDE çapraz bağlayısı ile farklı fibroin konsantrasyonlarında sentezlenen fibroin ağ yapılarının SEM görüntüleri. Skala (soldan sağa) = 1 mm, 50 µm, 10 µm, Büyütme oranı (soldan sağa) = x25, x100, x1000.

Kriyojellesmeye tabi tutulmadan kurutulan ipek fibroinin düzenli bir gözenekli yapısının olmadığı, dondurarak kurutma prosesi sonucu düzensiz ve bölgesel gözeneklerin ortaya çıktığı görülüyor. Buna karşılık kriyojelleşme sonucu ise düzenli gözeneklerin oluştuğu açıkça görülmektedir. Jelleşme sırasında donmamış bölgelerdeki yüksek fibroin konsantrasyonu nedeniyle gözenek duvarları kalınlaşmaktadır, sonucunda gözenek boyutları küçülmektedir.

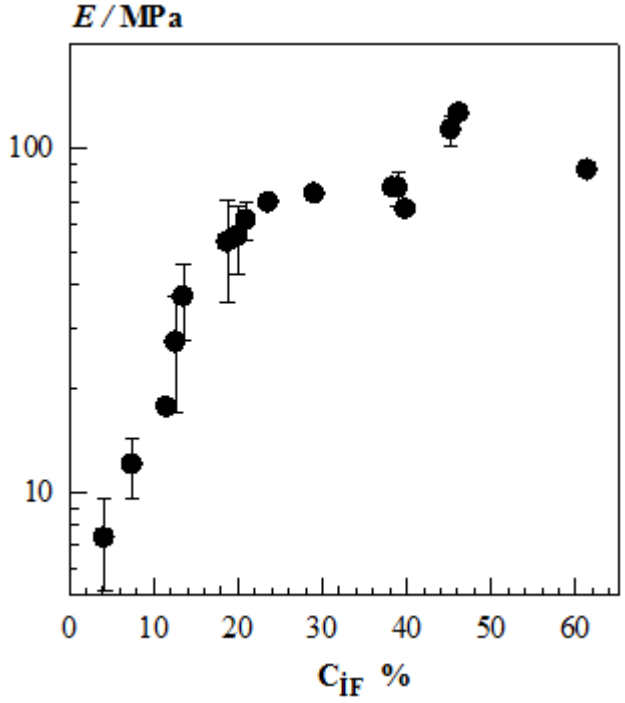
Gözenek boyutundaki değişimleri matematiksel değerlendirmek için, her bir görüntünün beş farklı bölgesinden gözenek çapları ölçülerek kriyojellerin ortalama gözenek boyutu belirlenmiştir. % 4,2 İF konsantrasyonunda sentezlenen kriyojellerde belirlenen gözenek çapı 28 ± 7 μm iken % 61,4 İF konsantrasyonunda gözenek çapı 9 ± 4 μm olmaktadır. Fibroin konsantrasyonuna bağlı ortaya çıkan bu değişim, jelleşme çözeltisindeki su miktarı ile açıklanabilir. Artan fibroin konsantrasyonu ile çözeltideki su miktarı azalmakta, dolayısıyla kriyojelleşme şartlarında kalıp (*template*) etkisi yapan buz miktarı da azalmaktadır. Bunun sonucu olarak toplam gözeneklilik azalmakta ve gözenekler küçülmektedir. Ayrıca, artan fibroin konsantrasyonu ile donmamış bölgelerdeki fibroin konsantrasyonu da artmaktadır, dolayısıyla daha kalın gözenek duvarları oluşmaktadır. Bu durumun mekanik özelliklere nasıl bir katkıda bulunucağı aşağıda ayrıntılı bir şekilde açıklanmaktadır.

4.1.4 Mekanik özellikler

Farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında sentezlenen kriyojeller tek eksenli sıkıştırma testlerine tabi tutularak Young modülleri, plato gerilimleri, basınç dayanımları ve parçalanma gerilimleri belirlenmiştir. Aşağıdaki paragraflarda önce kuru durumdaki fibroin kriyojel iskeletlerinin mekanik özellikleri tartışılacak daha sonra ise suda şişmiş durumda elde edilen sonuçlarla karşılaştırılacaktır.

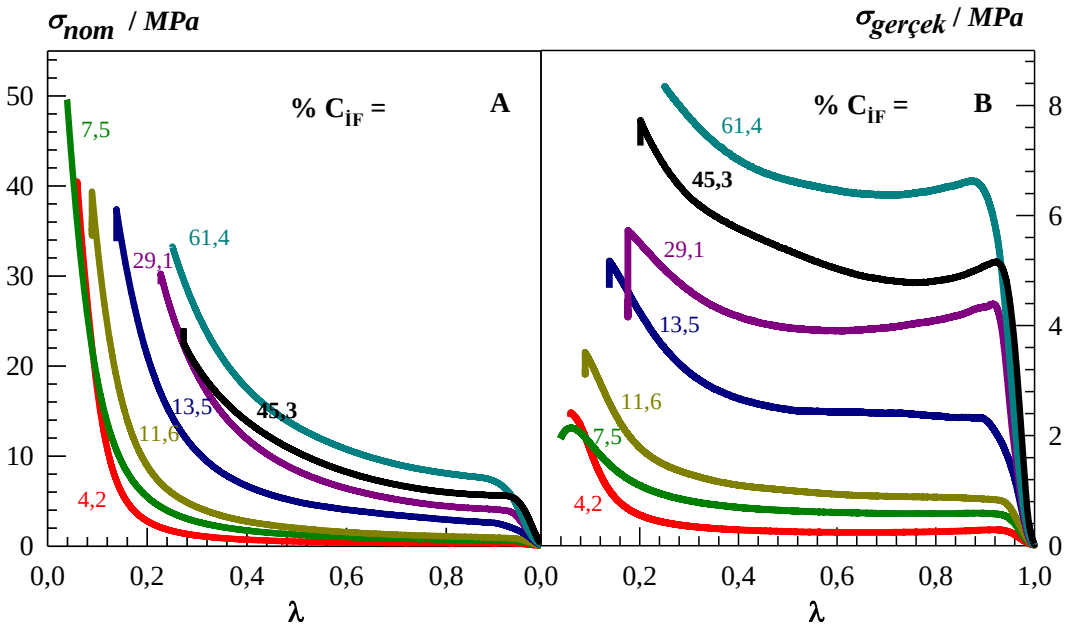
Kurutulmuş kriyojellerin Young modüllerinin (*E*) fibroin konsantrasyonu ile değişimi Şekil 4.8'de verilmiştir. Artan fibroin konsantrasyonu ile Young modül de artmaktadır. İpek fibroin konsantrasyonu % 4,2' den % 46,2'ye arttırıldığında modül 7,3 ± 2,2 MPa'dan 126 ± 2 MPa' a kadar çıkmaktadır. % 20 İF konsantrasyonuna kadar modül daha belirgin artmaktadır. Gözenek boyutlarının küçülmesi limit değere yaklaştığından % 20 İF konsantrasyonundan sonra modül değeri çok fazla artmamaktadır. *SEM* görüntüleri ile mekanik özellikler yorumlandığında, kriyojelleşme tekniği ile elde edilen ipek fibroin konsantrasyon artışına bağlı olarak

ağ yapı duvarlarının kalınlaşması ile kriyojellerinin gözenek çaplarının küçülmektedir. Fibroin iskelelerinin mekanik dayanımının arttığı ve dolayısıyla Young modülünün yükseldiği açıkça görülmektedir.



Şekil 4.8 : İpek fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak Young modülün (*E*) değişimi.

Şekil 4.9' da ise farklı fibroin konsantrasyonlarında sentezlenen kuru kriyojellerin nominal gerilim (σ_{nom}) – deformasyon (λ) (solda) ve gerçek gerilim ($\sigma_{gerçek}$) – deformasyon (λ) (sağda) grafikleri verilmiştir. ipek fibroin konsantrasyonları grafiklerde yüzde olarak belirtilmiştir. Nominal ve gerçek gerilim kullanılarak çizilen grafiklerin mukayesesinden, gerçek gerilim - deformasyon oranı eğrilerinde plato bölgesinin daha belirgin ortaya çıktığı görülmektedir. İpek fibroin konsantrasyonunun artışı ile doğrusal bölgenin uzadığı ve sonucunda plato bölgesinin yükseldiği görülmektedir. Gözenek duvarlarındaki polimer yoğunluğuna bağlı olarak değiştiği *SEM* görüntüleri incelendiğinde yorumlanmıştır. Toplam gözenekliliğin azalmasıyla plato düzlüğünün kısaldığı görülmektedir. Kriyojellerin gerilim-deformasyon eğrilerinde plato bölgelerinin belirgin bir şekilde ortaya çıkmasının nedeni kriyojellerin mekanik dayanımı yüksek gözenekli ağ yapıya sahip olmalarından dolayıdır.

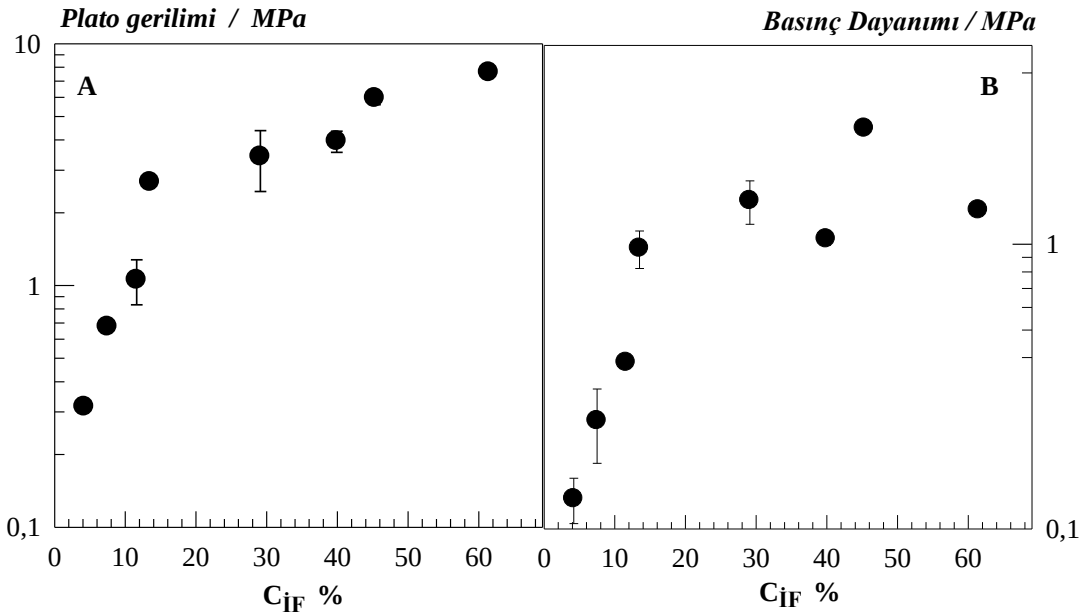


Şekil 4.9 : Farklı fibroin konsantrasyonlarında ($C_{İF}$) sentezlenen kriyojellerin nominal (A) ve gerçek (B) gerilim-deformasyon oranı eğrileri.

Şekil 4.9' da verilen gerilim-gerinim eğrilerinin plato ve basınç dayanım değerlerinin fibroin konsantrasyonu ile değişimi Şekil 4.10' da görülmektedir. % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda yaklaşık 0,3 MPa olan plato gerilimi, % 61,4 İF konsantrasyonunda 8 MPa değerine kadar çıkmaktadır. Yine aynı konsantrasyon aralığında kriyojellerin basınç dayanım değerleri de 0,1 MPa'dan 1,3 MPa değerine kadar artmaktadır.

SEM görüntüleri incelendiğinde gözenek boyutunun küçülmesiyle, başka bir ifade ile fibroin konsantrasyonunun kriyojelleşme sırasında donmamış bölgelerde artmasından dolayı daha tok bir ağ yapı meydana gelmektedir. Bu durum mekanik özelliklerin daha da iyileşmesini sağlamaktadır. Bunun sonuu olarak, Şekil 4.10' da görüldüğü gibi kriyojellerin fibroin konsantrasyonu arttıkça hem plato gerilimi hem de basınç dayanımları yükselmektedir.

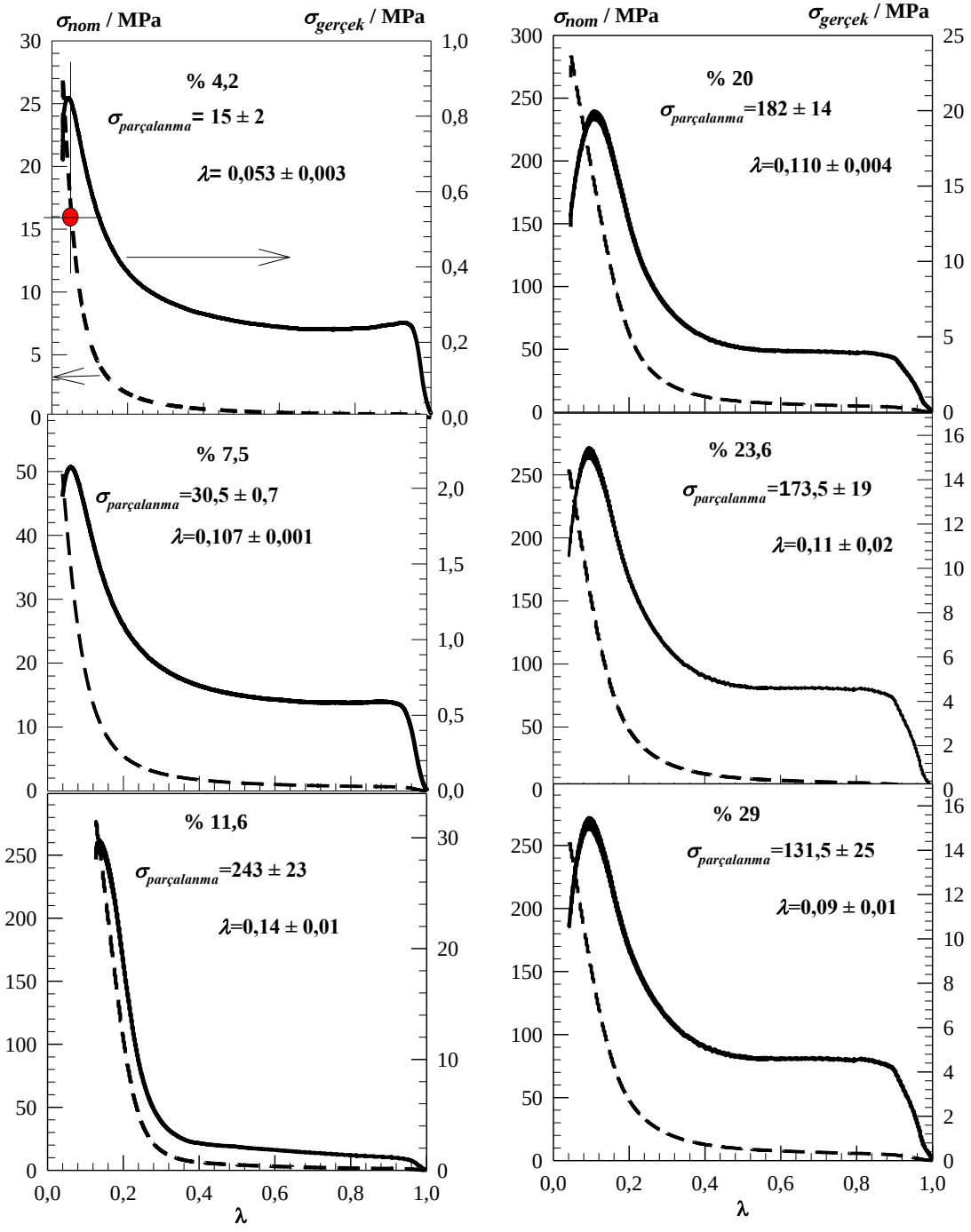
Şekil 4.11' de farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında elde edilen kuru kriyojellere ait tipik nominal gerilim (σ_{nom}) – deformasyon (λ) ve gerçek gerilim ($\sigma_{gerçek}$) – deformasyon (λ) grafikleri sırasıyla kesiksiz ve kesikli eğriler olarak çizilmiştir.



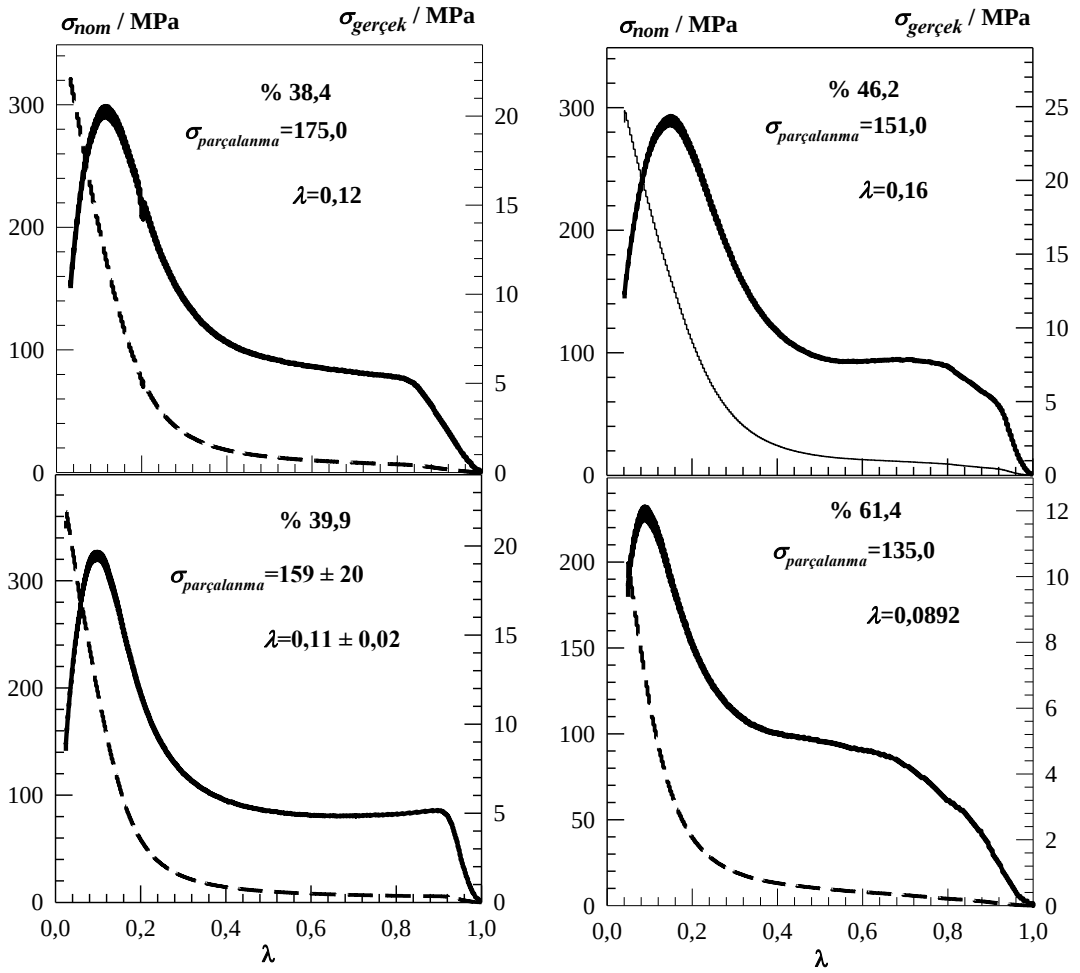
Şekil 4.10 : Kriyojellerin fibroin konsantrasyonu ile ($C_{İF}$) bağlı olarak ölçülen plato gerilimleri (A) ve basınç dayanımları (B).

Grafiklerin incelenmesinden, $\sigma_{nom} - \lambda$ eğrilerinden elde edilen parçalanma gerilimlerinin $\sigma_{gerçek} - \lambda$ eğrilerinden elde edilenlere oranla daha yüksek olduğu görülüyor. Örneğin, % 4,2 fibroin konsantrasyonunda elde edilen kriyojelin $\sigma_{nom} - \lambda$ eğrisinden jelin 27 MPa'a kadar dayanıklı olduğu görülüyor. Buna karşılık aynı mekanik ölçüm sonuçları $\sigma_{gerçek} - \lambda$ olarak çizildiğinde, eğrinin 0,8 MPa gerçek gerilimde bir maksimum verdiği ve bu değerin 15 MPa parçalanma gerilimine karşılık geldiği görülüyor. Bu sonuçlar, $\sigma_{gerçek} - \lambda$ eğrilerinde gözlenen maksimum noktasında jel içerisinde mikro kırıkların oluştuğu, $\sigma_{nom} - \lambda$ eğrisinden ise makroskopik parçalanmanın görüldüğü anlaşılıyor. Dolayısıyla, % 4,2 konsantrasyonunda sentezlenen jelde mikro kırıklar 15 MPa'da ortaya çıkmakta ve 27 MPa'da da tam parçalanma gerçekleşmektedir.

Aşağıdaki paragraflarda $\sigma_{gerçek} - \lambda$ eğrilerinden parçalanma gerilimleri belirlenmiştir ve mikro kırıkların ortaya çıktığı yorumlanmıştır. Örnek olarak, % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda sentezlenen kriyojelin parçalanma geriliminin 15 ± 2 MPa deformasyon oranının ise 0,053 ± 0,003 olarak belirlenmesi grafik üzerinde gösterilmiştir.

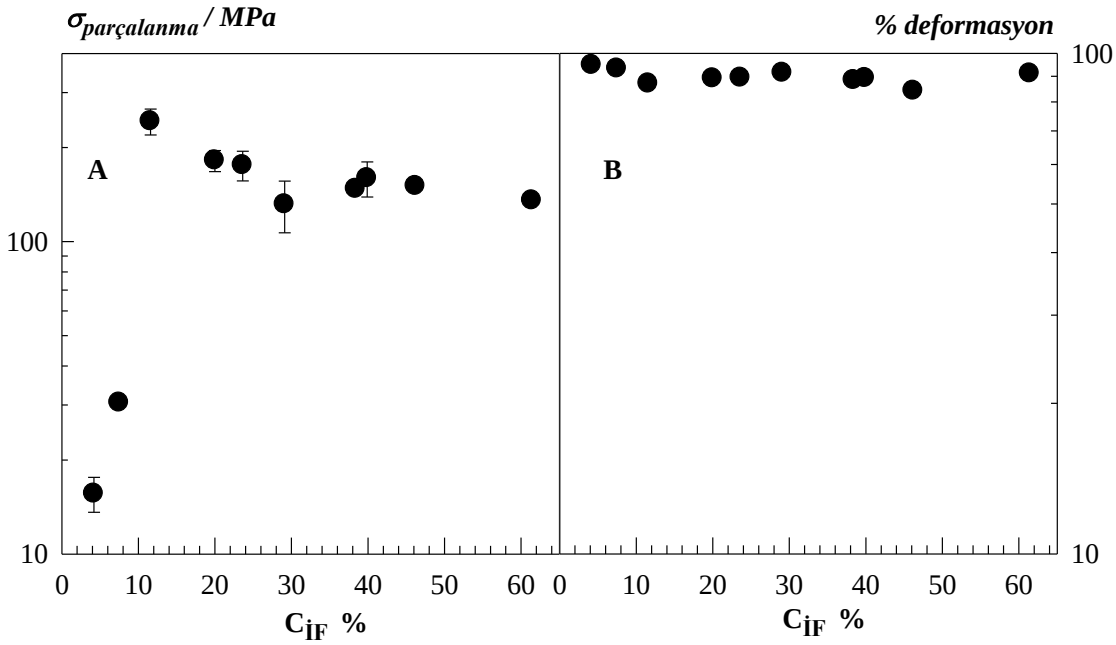


Şekil 4.11 : Farklı konsantrasyonlarda elde edilen kriyojellerin deformasyon oranına (λ) karşı çizilen nominal gerilim σ_{nom} (kesikli eğriler) ve gerçek gerilim $\sigma_{gerçek}$ (kesiksiz eğriler) eğrileri ve parçalanma gerilimi ($\sigma_{parçalanma}$) ile deformasyon oranının belirlenmesi.



Şekil 4.11 (devam) : Farklı konsantrasyonlarda elde edilen kriyojellerin deformasyon oranına karşı çizilen nominal ve gerçek gerilim eğrileri parçalanma gerilimi ile deformasyon oranının belirlenmesi.

Şekil 4.12' de kuru durumdaki ipek fibroin kriyojellerinin parçalanma gerilimi ve % deformasyonları görülmektedir. % 4,2' den % 11,6 konsantrasyonuna kadar parçalanma gerilimi artarken, % 11,6 ile % 61,4 konsantrasyonu aralığında bu değer hemen hemen değişmemektedir. Parçalanma anında % deformasyon oranları karşılaştırıldığında, ipek fibroin konsantrasyonundan bağımsız olarak her fibroin kriyojeli mekanik bütünlüğünü koruyarak % 95 - 100 deforme edilebilmektedir. Fibroin kriyojellerinin kemik-doku mühendisliği uygulamalarında yapı iskeletleri olarak kullanılması düşünüldüğünde maruz kalabileceği olası yüksek yüklere karşı gözenekli yapısını koruyabileceği düşünülmektedir.



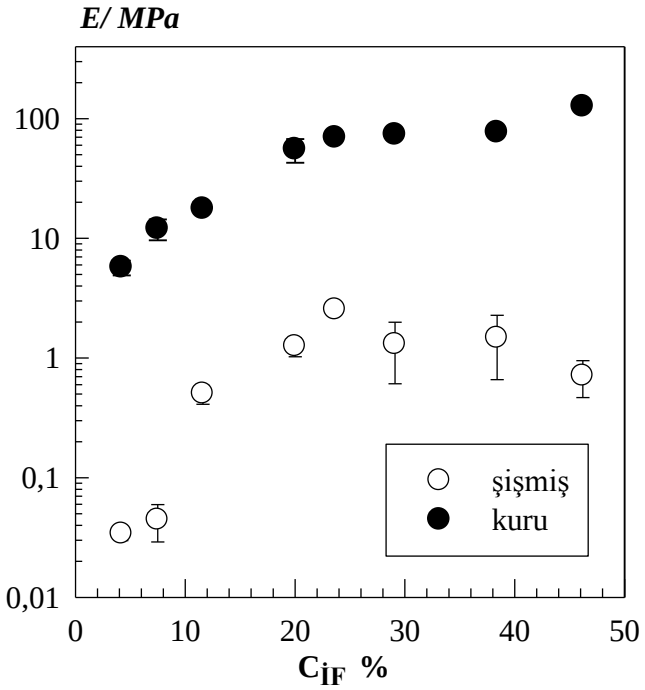
Şekil 4.12 : İpek fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak incelenen parçalanma gerilimleri (A) ve % deformasyon oranları (B).

Yukarıda özetlenen sonuçlardan, sentez sırasındaki fibroin konsantrasyonu arttırılarak kuru durumdaki fibroin kriyojellerinin Young modüllerinin 126 MPa'a kadar çıkarılabildiği görülmektedir. Diğer yandan, kriyojeller % 95-100 deformasyona ve yaklaşık 250 MPa gerilime kadar dayanabilmektedir. Dolayısıyla, mekanik dayanımı son derece yüksek fibroin iskeletleri kriyojelleşme tekniği uygulanarak % 10 ve üzeri fibroin konsantrasyonlarında elde edilebilmiştir. Gözenekli yapının mekanik dayanıklılığın ölçüsü olan plato geriliminin, yüksek fibroin konsantrasyonlarında 10 MPa civarına çıkması, fibroin iskelelerinin üç boyutlu gözenek yapılarının da dayanıklı olduğunu ortaya koymaktadır.

Özellikle kemik gibi yük taşıyan dokuların tedavisinde kullanılan doku iskelelerinin sahip olması gereken en önemli özelliği mekanik dayanımdır [77,78]. Literatürde kortikal ve kanselöz kemik için sıkıştırma dayanım aralığı, sırasıyla 100-230 MPa ve 2-12 MPa olarak verilmiştir [79]. Bu dayanım değerleri oldukça yüksektir ve ancak yoğun, gözenek boyutu küçük olan yapılarla bu mekanik özellikler sağlanabilmektedir. *SEM* görüntüleri ile mekanik test sonuçları, fibroin kriyojellerinin gerekli özellikleri karşıladığını açıkça görülmektedir.

Mekanik ölçümler, su içerisinde denge konumunda olan kriyojellerle de yapılmıştır. Şekil 4.13' de şişmiş durumdaki kriyojellerin Young modülleri (*E*) (içi boş

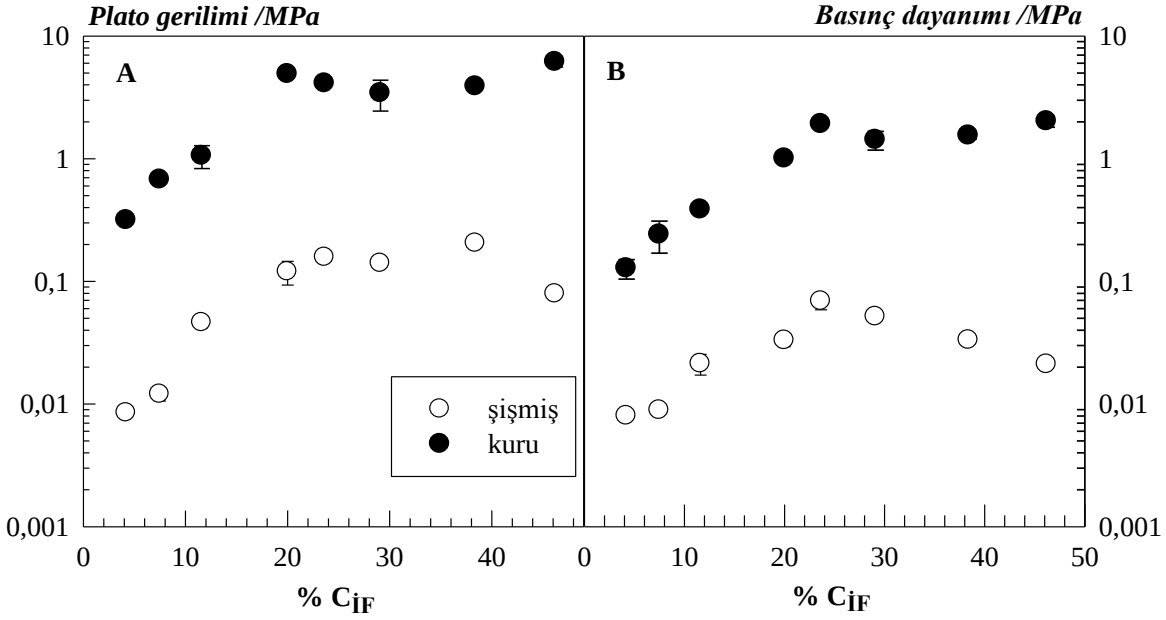
semboller) kuru durumdaki örneklerle (içi dolu semboller) karşılaştırılmıştır. Kuru durumdaki kriyojeller ile karşılaştırıldığında fibroin konsantrasyonu ile benzer değişim gösterdiği görülmektedir. Şişmiş durumdaki kriyojellerin Young modülleri % 20 ipek fibroin konsantrasyonuna kadar artmakta, daha yüksek konsantrasyonlarda ise fazla değişmediği görülmektedir. Şişmiş durumda bulunan ve % 4,2 fibroin konsantrasyonunda sentezlenen kriyojelin modülü 0,03 MPa'dan % 46,2 İF konsantrasyonunda 1 MPa değerine kadar ulaşmıştır.



Şekil 4.13 : Kuru(●) ve şişmiş(○) durumdaki kriyojellerin Young modüllerinin (*E*) karşılaştırılması.

Şekil 4.14' de şişmiş durumdaki kriyojellerin plato gerilimleri ve basınç dayanımlarının kuru durumdaki iskeletlerin verileri ile karşılaştırılmıştır. Şişmiş durumdaki kriyojellerin plato gerilimleri, kuru durumdaki örnekleri ile fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak benzer değişim göstermektedir. Fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak şişmiş durumdaki kriyojellerin plato gerilimleri % 20 ipek fibroin konsantrasyonuna kadar artmakta, bu konsantrasyon değerinden sonra artış göstermemektedir. % 4,2 fibroin konsantrasyonunda şişmiş durumdaki kriyojelin plato gerilimi 0,01 MPa iken, % 46,2 konsantrasyonundaki değer yaklaşık 0,1 MPa'a kadar çıkmaktadır.

Basınç dayanımları ise, % 4,2' den % 23,6 ipek fibroin konsantrasyonuna çıktığında 1 kPa' dan 70 kPa değerine yükselmektedir.



Şekil 4.14 : Şişmiş (○) ve kuru (●) durumdaki kriyojellerin plato gerilimleri (A) ve basınç dayanımlarının (B) karşılaştırılması.

Sonuç olarak su içerisinde bulunan kriyojellerin mekanik performansları, kuru durumdakilere oranla, önemli ölçüde düşmektedir. Şekil 4.2'de verildiği üzere, kriyojeller su içerisinde şişmemekte ($m_{rel} \cong V_{rel} \cong 1$) sadece gözenekleri su ile dolmaktadır. Gözenekleri dolduran suyun kriyojelin mekanik dayanımını düşürdüğü görülüyor. Bu durum, fibroin ağyapı zincirlerinin hidrofilik yapısı nedeniyle gözenek suyunu tutması ve kauçuksu duruma geçmesi ile açıklanabilir.

4.2 Sürfaktan Varlığında Elde Edilen İpek Fibroin Kriyojellerinin Özellikleri

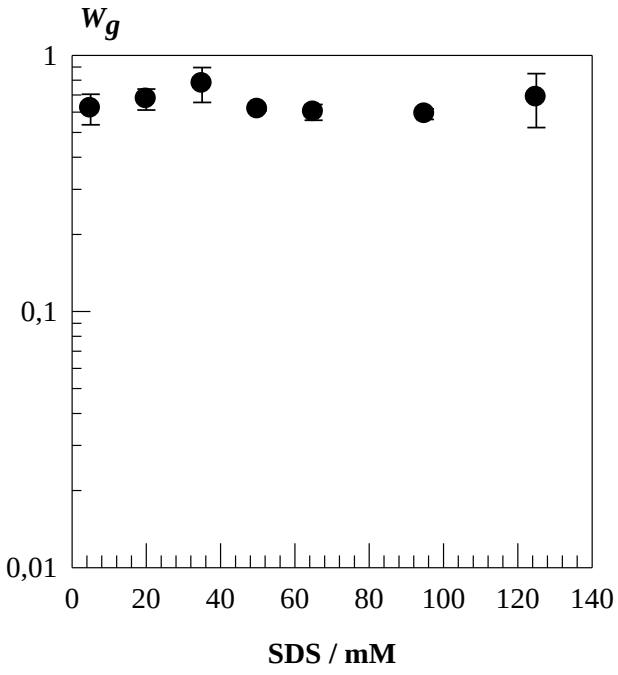
-18ºC'de yapılan kriyojelleşme denemelerinde fibroin konsantrasyonu % 4,2 olarak sabit tutulmuş, fibroin çözeltisine farklı konsantrasyonlarda SDS çözeltileri eklenerek ipek fibroin kriyojelleri hazırlanmıştır.

Jelleşme çözeltisindeki SDS konsantrasyonu 5 mM ile 125 mM arasında değiştirilmiştir.

Elde edilen ipek fibroin kriyojellerinde jel kesri ile şişme ve mekanik özellikleri ortaya konmuştur.

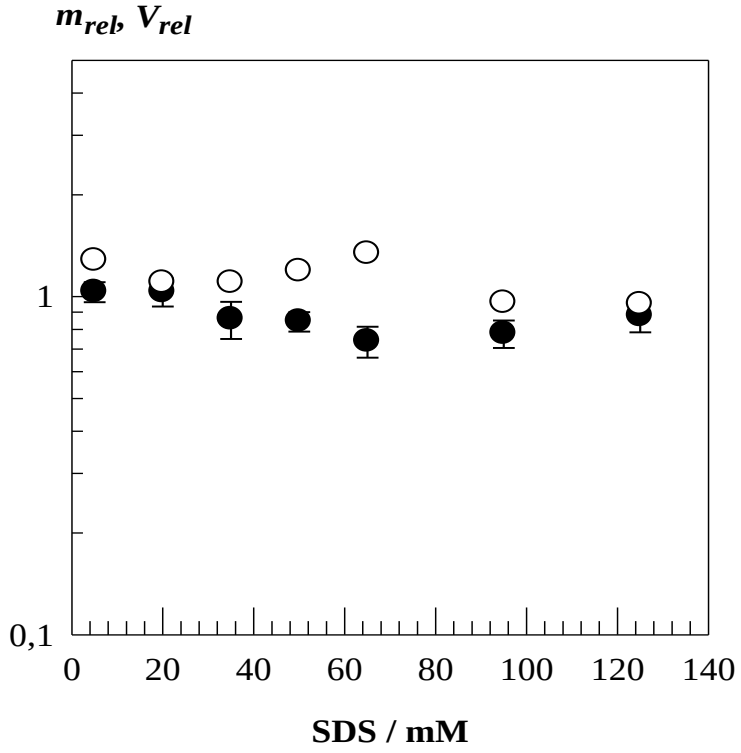
4.2.1 Jel kesri ve şişme özellikleri

Şekil 4.15' de farklı SDS konsantrasyonlarında elde edilen kriyojellerin jel kesirleri belirtilmiştir. 1 mM üzerinde SDS miktarlarında elde edilen kriyojellerin jel kesri 0,6 civarındadır. SDS miktarından bağımsız olarak jel kesri değerleri pek fazla değişmediği görülmektedir. Su içerisinde 25ºC sıcaklıkta SDS'nin kritik misel konsantrasyonunun 8,2 mM olduğu göz önüne alınırsa [80], misel oluşumunun kriyojelleşme prosesine bir etkisi olmadığı söylenebilir. Diğer yandan, kriyojelleşme şartlarında donmamış bölgelerde çözünen madde miktarlarının nominal değerlerden çok daha fazla olduğundan[11], 1 mM üzeri konsantrasyonlarda SDS'nin bu bölgelerde misel oluşturduğu da düşünülebilir. Jel kesrinin 1' den küçük olması SDS' nin kriyojelleşme sırasında ortamdaki fibroin zincirlerinin tamamını ağ yapıya bağlayamadığını göstermektedir.



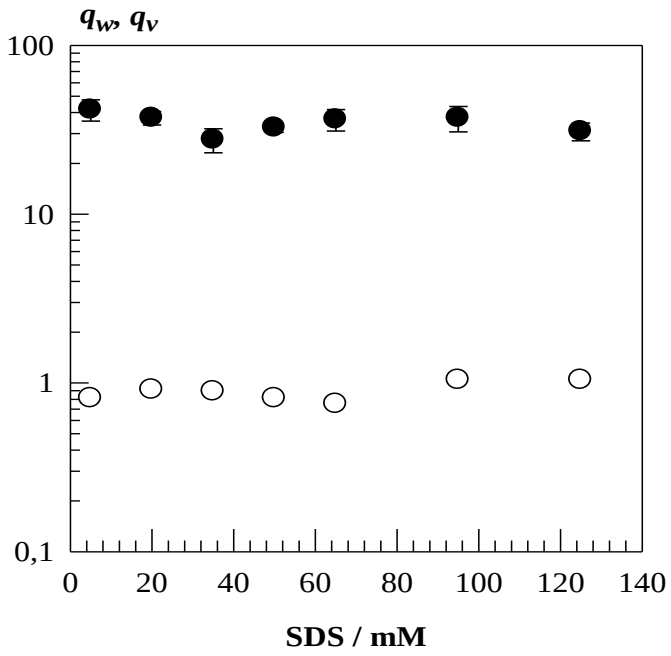
Şekil 4.15 : % 4,2 fibroin konsantrasyonunda farklı SDS miktarlarında elde edilen kriyojellerin jel kesri (W_g) sonuçları.

SDS yardımıyla elde edilen kriyojellerin sentez sonrası duruma göre ağırlıkça şişme (m_{rel}) ve hacimce şişme (V_{rel}) değerleri ise Şekil 4.16' da gösterilmiştir. Hem m_{rel} hem de V_{rel} değerlerinin 1 civarında olduğu görülmektedir. SDS miktarından bağımsız olarak m_{rel} ve V_{rel} değerleri pek değişiklik göstermemektedir.



Şekil 4.16 : Farklı SDS miktarında elde edilen kriyojellerin m_{rel} (●) ve V_{rel} (○) değerleri.

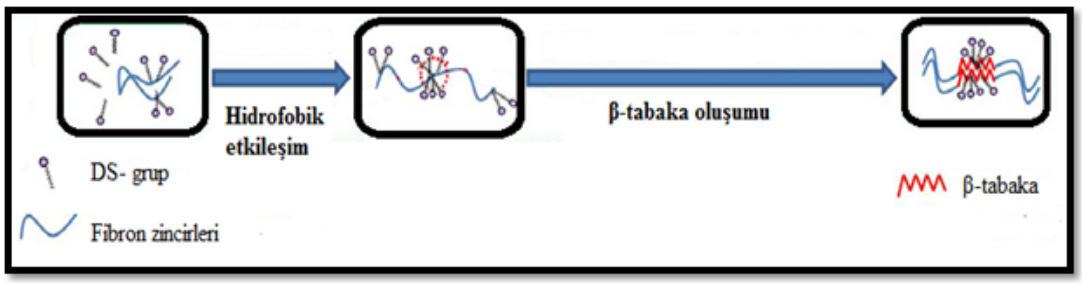
Şekil 4.17' de % 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda ve farklı SDS miktarı kullanılarak elde edilen kriyojellerin kuru duruma göre ağırlıkça şişme (q_w) ve hacimce şişme (q_v) değerleri gösterilmektedir. SDS miktarı arttırıldığında q_w değerinin değişmediği görülmektedir. SDS miktarından bağımsız olarak bu değer 35 civarında görülmektedir. SDS miktarına bağlı olarak q_v değerinin de değişmediği ve yaklaşık 1 olduğu görülüyor. Diğer yandan q_w ve q_v arasındaki ilişkiden ve 3.5 eşitliği yardımıyla gözeneklilik SDS konsantrasyonundan bağımsız % 97 ± 2 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.17 : Farklı SDS miktarında elde edilen kriyojellerin q_w (●) ve q_v (○) değerleri.

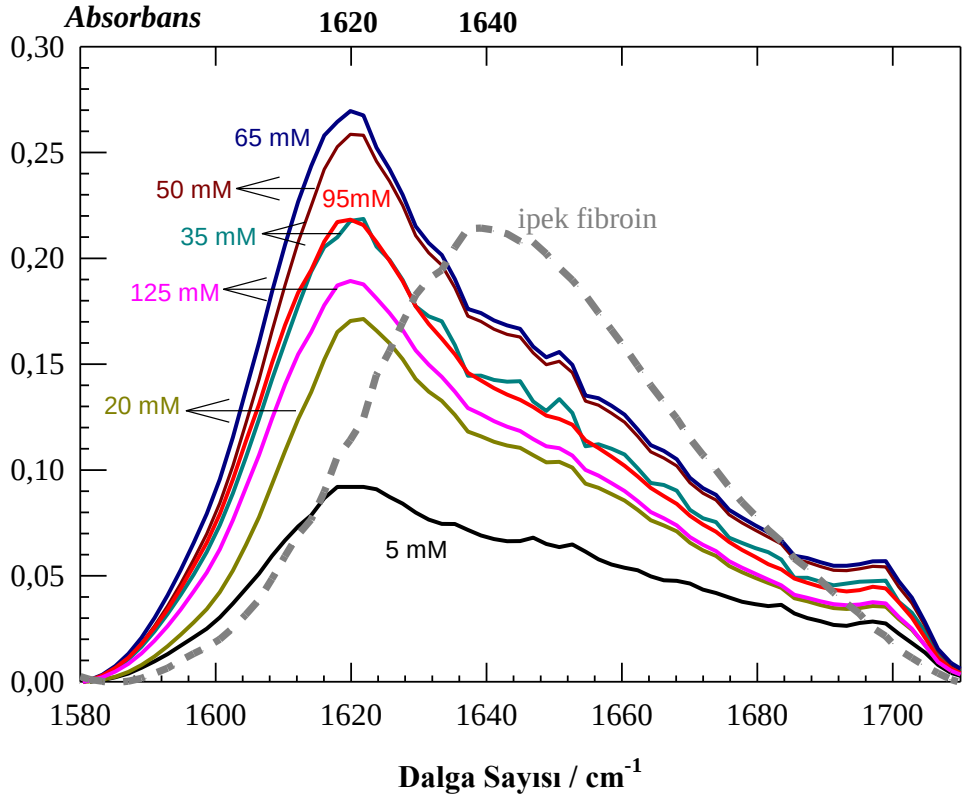
4.2.2 Kriyojel ağ yapı zincirlerinin konformasyonu

Jelleşme çözeltisine SDS eklenmediğinde veya 1 mM SDS varlığında jelleşmenin oluşmadığı gözlenmiş, buna karşılık daha yüksek SDS konsantrasyonlarında herhangi bir çapraz bağlayıcı kullanılmadan ve sadece iyonik sürfaktanın etkisi ile kısa bir sürede jel oluşumu belirlenmiştir. Sürfaktan moleküllerinin alkil gruplarının fibroin zincirlerinin hidrofobik blokları arasındaki etkileşmelerin sonucu jelleşmenin gerçekleştiği önerilebilir. Fibroin zincirlerinin hidrofobik bloklarının bir araya gelmesini tetikleyen SDS, fibroin zincirleri arasında β-tabakası oluşumunu hızlandırdığı literatürde de rapor edilmiştir (Şekil 4.18) [81].



Şekil 4.18 : SDS ile gerçekleşen fibroin zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşimler ve β-tabaka oluşumu.

Şekil 4.19' da görülen *ATR-FTIR* spektrumları yardımıyla SDS etkisi ile fibroinde β-tabaka oluşumu izlenmiştir. SDS'siz dondurulup kurutulan % 5 konsantrasyondaki ipek fibroin çözeltisinin spektrumu kesikli eğri ile gösterilmiştir. Kesiksiz eğriler ise, farklı SDS konsantrasyonlarında jelleşme sonrası elde edilen kriyojellerin spektrumlardır. Kriyojelleşme öncesi ipek fibroin 1640 cm^{-1} dalga sayısında rastgele yumak konformasyonuna karşılık gelen bir pik vermektedir. SDS ile kriyojelleşme sonrası ise karakteristik pik 1620 cm^{-1} dalga sayısında görülmekte olup bu pik β-tabaka konformasyonuna karşılık gelmektedir. Sonuç olarak, SDS sürfaktanının jelleşmeyi yani rastgele yumaktan β-tabaka yapısına konformasyonel geçişi tetiklediğini görülmektedir.

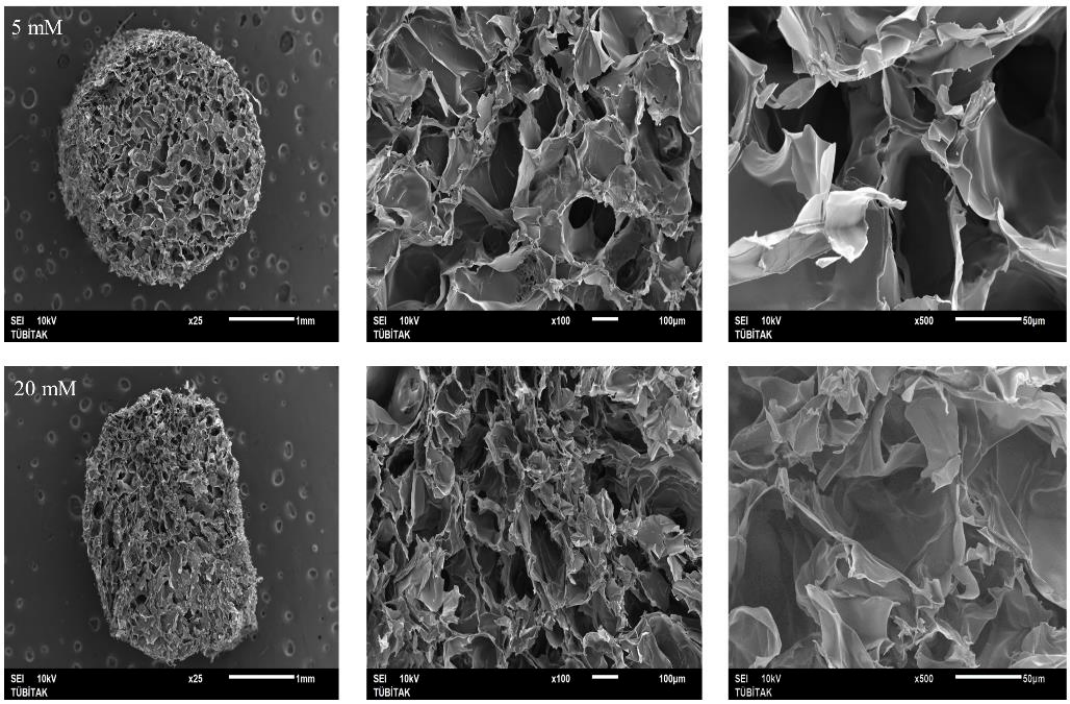


Şekil 4.19 : İpek fibroinin jelleşme öncesi (kesikli eğri) ve SDS varlığında jelleşme sonrası (kesiksiz eğriler) ATR- FTIR spektrumları.

4.2.3 Young modüllerinin belirlenmesi

% 4,2 ipek fibroin konsantrasyonunda farklı SDS miktarlarında hazırlanan kriyojellerin dondurmalı kurutma sonrası fibroin iskeletleri elde edilmiştir.

5 mM ile 125 mM arasında değişen SDS miktarlarında elde edilen fibroin iskeletlerinin sentez sırasındaki fibroin konsantrasyonlarının aynı olmasına rağmen 5 mM SDS kullanılarak elde edilen kriyojellerin dondurmalı kurutma prosesinden sonra fiziksel yapısının gözle görülür bir şekilde daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 4.20' de 5 mM ve 20 mM SDS varlığında elde edilen kriyojellerin kuru durumdaki farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri verilmiştir. Düşük sürfaktan varlığında gözeneklerin daha düzenli oluştuğu ve iskelet yapısının daha dayanıklı olduğu görülmektedir.

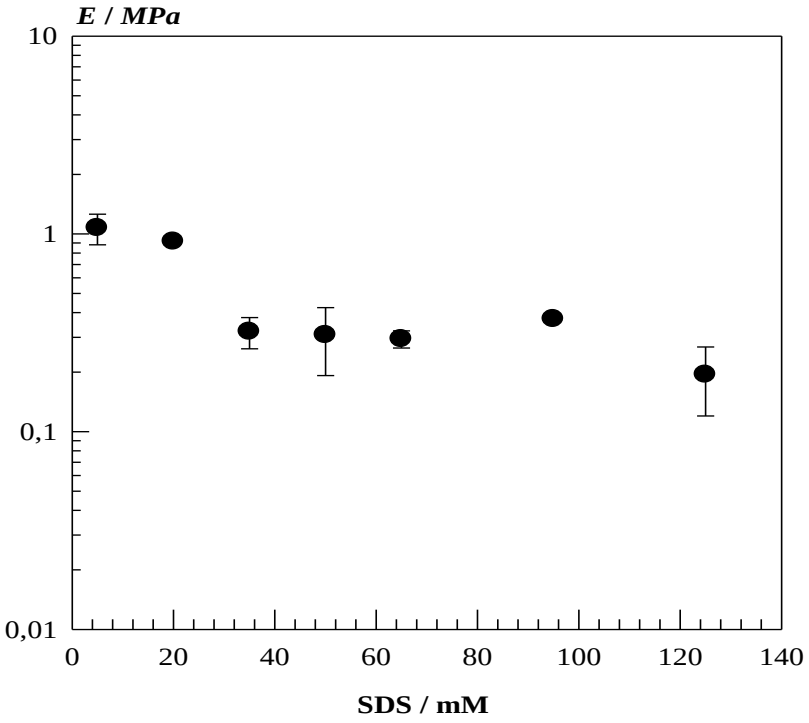


Şekil 4.20 : SDS varlığında elde edilen ipek fibroin kriyojellerinin kuru durumdaki SEM görüntüleri. SDS = 5 mM (üst sıra) ve 20 mM (alt sıra). Skala (soldan sağa) = 1 mm, 100 µm, 50 µm, Büyütme oranı (soldan sağa) = x25, x100, x500, Fibroin konsantrasyonu = % 4,2.

Malzemelerin mekanik özelliklerini belirlemek için kuru durumdaki ipek fibroin iskeletlerine tek eksenli sıkıştırma testleri yapılmıştır. Şekil 4.21' de farklı SDS miktarlarında elde edilen kriyojellerin kuru durumdaki Young modülleri verilmektedir.

Grafikte görüldüğü gibi 5 mM gibi düşük SDS konsantrasyonunda modülü 1 MPa iken, 125 mM SDS konsantrasyonunda modül değeri 0,2 MPa' a kadar düşmektedir. Yüksek SDS konsantrasyonlarında ise, fibroin zincirleri SDS tarafından yalın bir

şekilde sarmalandığı dolayısıyla hidrofobik blokların yüksek sürfaktan miktarı nedeniyle bir araya gelemediği düşünülmektedir. Bu durumun mekanik özelliklerini düşürdüğü şeklinde yorumlanmaktadır.



Şekil 4.21 : % 4,2 İF konsantrasyonunda farklı SDS miktarlarında elde edilen kriyojellerin Young modülleri (E).

5. SONUÇLAR

Yapılan çalışmalar sonucunda -18ºC'de kriyojelleşme tekniği uygulanarak, çapraz bağlayıcı varlığında 24 saatte ve sürfaktan varlığında ise 48 saatte fibroinin çapraz bağlanarak makrogözenekli iskelet yapısı oluşturmasi sağlanmiştir.

BDDE çapraz bağlayıcısı varlığında, ağırlıkça % 1 ile % 61,4 arasında değişen ipek fibroin konsantrasyonlarında ve -18ºC' de yapılan kriyojelleşme reaksiyonları sonucu fibroin yapısında konformasyonel değişimler gözlenmiştir. *ATR-FTIR* spektrumlarında kriyojelleşme öncesi 1640 cm^{-1} dalga sayısında görülen ve rastgele yumak yapısına karşılık gelen pik, kriyojelleşme sonrası kaybolmakta, β-tabaka yapısına karşılık gelen 1620 cm^{-1} dalga sayısında pik ortaya çıkmaktadır. Jelleşme öncesi β-tabaka oranı % 13 ± 2 iken kriyojelleşme sonrası % 59 ± 2'ye kadar çıkmaktadır. Dolayısıyla kriyojelleşme şartlarında fibroin moleküllerinin hidrofobik blokları arasında asosiasyonlar arttığı, sonucunda yapıya mekanik dayanım sağlayan β-tabakaların oluşumu ortaya konmuştur. β-tabaka derecesinin artması gözenekli yapınının dayanıklılığının artmasına katkıda bulunmaktadır.

İpek fibroin kriyojellerin jel kesri değerleri, şişme ve buna bağlı olarak % gözeneklilik oranları hesaplanmıştır.

Fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak 4,2 ile % 30 konsantrasyon aralığında jel kesri 1 olarak hesaplanmıştır. Bu durum başlangıçta kullanılan fibroin zincirlerinin tamamının çapraz bağlı durumda yapıya katıldığını göstermektedir. Daha yüksek konsantrasyon değerlerinde 0,5 civarında olduğu belirlenmiştir. Bu durum ise, fibroin zincirlerinin tamamının çapraz bağlanamadığını göstermektedir. Buna rağmen, özellikle % 30 İF'den yüksek konsantrasyonlarda mekanik özelliklerin oldukça iyileştiği görülmektedir.

Su içerisinde şişme davranışları incelendiğinde, sentez sonrası durumlarına oranla ağırlıkça veya hacimce şişmedikleri hesaplanmıştır. Hidrojellerin şişme davranışları

göz önüne alındığında, kriyojellerin suda aşırı şişmemesi uygulama alanlarında çok büyük avantaj sağlamaktadır.

Kuru durumdaki fibroin kriyojellerinin yapısına, su girmesine rağmen hacimce şişmediği görülmüştür. Fibroin konsantrasyonundan bağımsız olarak kuru duruma göre hacimce şişme oranının q_v = 1 olduğu, kuru duruma göre ağırlıkça şişme oranının q_w ise artan fibroin konsantrasyonuna karşılık 35' den 3' e kadar azaldığı belirlenmiştir. Gözenek boyutlarının artan fibroin konsantrasyonuna karşılık küçülmesi yapıya giren su miktarını azaltmaktadır. Kuru durumdayken suya bırakıldığında, hacimsel bir değişime uğramadan yapısında su barındırabilmesi gözenekli ağ yapıda olduğunu açıkça kanıtlamaktadır.

q_w ve q_v arasındaki bağıntıdan toplam gözeneklilik teorik olarak hesaplanmıştır ve fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak % 97 ile % 69 aralığında değişmektedir. Ağ yapının hemen hemen tamamına yayılan iç gözeneklilik kriyojelleri kemik doku iskeleti olarak kullanımını sağlamaktadır.

Üretilen kriyojellerin kuru durumda morfolojik yapıları incelenip taramalı elektron mikroskobu (*SEM*) yardımıyla görüntüleri çekilmiştir. Fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen kriyojellerin gözenek boyutlarının 28 ± 2 μm ile 9 ± 4 aralığında ayarlanabileceği görülmüştür. BDDE varlığında fibroin zincirlerinin çapraz bağlanması sonucu, artan fibroin konsantrasyonuna karşılık gözenek duvarlarının kalınlaştığı ve çaplarının küçüldüğü belirlenmiştir. Gözenek çaplarının jelleşme sırasında donmakta olan çözücünün miktarına göre değiştiği anlaşılmıştır. Makro gözenekli bir ağ yapı oluşturulurken ekstra bir gözenek oluşturucu kullanılmaması kriyojelleşme tekniği ile mümkün olmaktadır. Kemik yapısında kullanılması mümkün iskeletlerinin mekanik dayanımlarının yüksek olması gözenek boyutlarının küçülmesi ile sağlanmıştır.

Farklı ipek fibroin konsantrasyonlarında sentezlenen ve ardından kurutulan fibroin iskeletleri tek eksenli sıkıştırma testlerine tabi tutularak mekanik özellikleri incelenmiştir. Artan fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak iskeletlerin mekanik dayanımlarının arttığı gözlenmiştir. % 46,2 ipek fibroin konsantrasyonunda sentezlenen kriyojel iskeletlerinin Young modülü (E) 126 ± 2 MPa olarak ölçülmüştür. Bu değer, şimdiye kadar fibroin iskeletlerinde ulaşılabilen en yüksek değerdir. Ayrıca Young modül ile orantılı olarak plato gerilimleri (σ_{plato}) ve basınç

dayanımları da artış göstermektedir. İpek fibroin konsantrasyonu % 4,2' den 61,4'e arttırıldığında plato gerilimi 0,3' den 8 MPa'a, basınç dayanım değeri ise 0,1' den 1,3 MPa'a kadar yükselmektedir. Mekanik özelliklerin gözenek boyutu ile orantılı bir şekilde değiştiği *SEM* görüntüleri ile ortaya çıkmaktadır. Gözenek duvarlarının kriyojelleşme süresinde donmamış mikro bölgelerde fibroin konsantrasyonunun artışana bağlı olarak kalınlaşması, mekanik dayanımı arttırmaktadır.

Ek olarak, elde edilen kriyojellerin parçalanma gerilimleri ($\sigma_{parçalanma}$) belirlenmiştir. Üretilen ipek fibroin iskelelerinin gözenekli yapısının 250 MPa değerine kadar koruduğu ve fibroin kriyojellerin % 95 - 100 deforme olabilirliliği ortaya konmuştur. Kemik-doku iskeleti olarak kullanılması düşünüldüğünde yük bindirici kuvvetlere karşı mekanik bütünlüğünü koruyacak özelliklere sahip olabileceği düşünülmektedir.

Kuru durumdaki kriyojeller ile şişmiş durumdaki kriyojellerin Young modülleri, plato gerilimleri ve basınç dayanımları karşılaştırılmıştır. Gözeneklerin su ile dolması olması ile kauçuksu yapının oluşması sebebiyle mekanik özelliklerin kuru durumdakilere oranla önemli derecede düştüğü görülmektedir. Buna rağmen şişmiş kriyojellerin mekanik sonuçları hidrojellere nazaran dikkat çekici değerlerdedir.

Benzer bir şekilde -18^{o}C' de kriyojelleşme tekniği uygulanarak fibroin konsantrasyonu ağırlıkça % 4,2' de sabitlenip, farklı konsantrasyonlarda SDS sürfaktanı kullanılarak kriyojeller üretilmiştir.

1 mM SDS konsantrasyonunda kriyojelleşme gerçekleşmemiştir. 5 mM ile 125 mM arasında değişen SDS konsantrasyonlarında jelleşmenin hızlı gerçekleştiği, fibroinin konformasyon yapısının rastgele yumaktan β-tabakaya geçişi *ATR-FTIR* ölçümleri ile belirlenmiştir.

Kriyojellerin jel kesirleri SDS konsantrasyonundan bağımsız olarak 0,6 civarında olduğu saptanmıştır. Tüm SDS konsantrasyonlarında m_{rel} ve V_{rel} 1, q_w ve q_v ise 35 ve 1 değerlerinde hesaplanmıştır. SDS sürfaktanın, fibroin zincirleri arasında etkin ve kalıcı hidrofobik etkileşimleri sağlaması sonucu oluşan ağ yapı kriyojellerin su içerisinde hacimce şişmemesini sağlamaktadır.

q_w ve q_v sonuçlarından yola çıkarak gözeneklilik % 97 ± 2 olarak belirlenmiş olup, ağ yapının gözenekliliği sadece fibroin miktarına bağlı olduğu ortaya çıkmıştır.

Sentezlenen kriyojellerin kurutma prosesi sonrası fiziksel yapılarının düşük SDS miktarlarında daha iyi olduğu görülmüştür. Mekanik testlerin uygulanması sonucu 5

mM SDS konsantrasyonundaki modül yaklaşık 1 MPa iken, 125 mM SDS konsantrasyonunda 0,2 MPa' a düşmesi bu durumu desteklemektedir. *SEM* görüntüleri incelendiğinde 5 mM SDS konsantrasyonunda gözlenen daha homojen gözenekli yapı bu durumu desteklemektedir.

Biyobozunur ve biyouyumlu özelliği ile ipeğin, kriyojelleşme ile birbiri ile bağlantılı, yüksek gözeneklilik oranına sahip ve üstün mekanik özellikler sergileyen bir yapı oluşturabilmesi bu tez çalışması sonunda sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

[1] **Vepari, C., Kaplan, D.L.** (2007). Silk as a biomaterial. *Prog. Polym. Sci.* ***32,*** 991-1007.

[2] **Omenatto, F.G., Kaplan, D., L.** (2008). A new route for silk. *Nature Photonics*, ***2*****(11),** 641-643.

[3] **Kundu, B., Kurland, N. E., Bano, S., Patra, C., Engel, F. B., Yadavalli, V. K., Kundu, S. C.** (2014). Silk proteins for biomedical applications: bioengineering perspectives. *Progress in Polymer Science*, ***39*****(2),** 251-267..

[4] **Tamada, Y.** (2005). New Process to Form a Silk Fibroin Porous 3-D Structure. *Biomacromecules.* ***6,*** 3100-3106.

[5] **Murphy, A.R., Kaplan, D.L.** (2009). Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin *J.Mater.Chem.****19****,* 6443-6450

[6] **Karageorgiou, V., Kaplan, D.L.** (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, ***26*****(27),** 5474-5491.

[7] **Vacanti, J. P., Morse, M. A., Saltzman, W. M., Domb, A. J., Perez-Atayde, A., Langer, R.** (1988). Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *Journal of pediatric surgery*, ***23*****(1),** 3-9.

[8] **Hutmacher, D. W.** (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, ***21*****(24),** 2529-2543.

[9] **Lozinsky V., I., Galaev I., Y., Plieva F., M.** (2003). Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology* ***21,*** 445–451

[10] **Mikhalovsky S., V., Savina, I., N., Dainiak M., Ivanov, A., E., Galaev, I., Y.** (2011). Biomaterials/Cryogels

[11] **Okay, O., Lozinsky, V., I.** (2014). Synthesis and Structre-Property Relationship of Cryogels, *Adv Polym. Sci*. ***263,*** (103-157).

[12] **Karakütük İ., Ak, F., Okay O.** (2012). Diepoxide-Triggered Conformational Transition of Silk Fibroin: Formation of Hydrogels, *Biomacromolecules.* ***13****,* 1122-1128.

[13] **Tanaka, T.** (1992). Phase Transition of Gels, ACS Symposiom

[14] **Gong, J-J, Osada Y.** (1988). Soft and Wet Materials: Polymer Gels. *Adv. Mater.* ***10,*** 11

[15] **Peppas, N. A., Slaughter, B. V., Kanzelberger, M. A.** (2012). 9.20–Hydrogels. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (pp. 385-395). Elsevier Amsterdam.

[16] **Chaterji, S., Kwon, K., Park, K.** (2007). Smart Polymeric Gels: Redefining the Limits of Biomedical Devices. *Prog. Polym. Sci.* ***32,*** 1083-1122

[17] **Saul, J. M., Williams, D. F.** (2013). Hydrogels in Regenerative Medicine. *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices, **279.***

[18] **Tuncaboylu, D.C., Sarı, M., Oppermann, W., Okay, O.** (2011). Tough and self-healing hydrogels formed via hydrophobic interactions. *Macromolecules, **44,*** 4997-5005.

[19]**Hennink, W.E., van Nostrum, C.F.** (2002). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews, **54,*** 13–36

[20] **Hermanson, G.** (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, California, Sayfa: 112-113.

[21] **Hassan, C., M., Peppas N., A.** (2000). PVA Hydrogels Anionic Polymerisation Nanocomposites. *Adv. in Poly Sci. **153,*** 37-65

[22] **Argun, A., Can, V., Altun, U., Okay, O.** (2014). Nonionic Double and Triple Network Hydrogels of High Mechanical Strength. *Macromolecules, **47*(18),** 6430-6440.

[23] **Sun, J. Y., Zhao, X., Illeperuma, W. R., Chaudhuri, O., Oh, K. H., Mooney D. J., Vlassak, J. J., Suo, Z.** (2012). Highly Stretchable and Tough Hydrogels. *Nature. **489*(7414),** 133-136.

[24] **Lake, G. J., Thomas, A. G.** (1967). The Strength of Highly Elastic Materials. *Proc. R. Soc. **A300,*** 108–119

[25] **Abdurrahmanoglu, S., Can V., Okay O.** (2009). Design of high-toughness polyacrylamide hydrogels by hydrophobic modification. *Polymer. **50,*** 5449–5455

[26] **Lozinsky V. I.** (2002a). Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: Preparation, properties and application. *Russ. Chem. Rev. **71,*** 489-511.

[27] **Kumar, A., Srivastava A., Galaev, I. Y., Mattiasson B.** (2007). Smart Polymers: Physical Forms and Bioengineering Applications. *Prog. Polym. Sci. **32,*** 1205-1237

[28] **Topuz, F., Okay, O.** (2009). Macroporous hydrogel beads of high toughness and superfast responsivity. *Reactive and Functional Polymers, **69*(5),** 273-280.

[29] **Abrams, I. M.** (1956). High porosity polystyrene cation exchange resins. *Industrial & Engineering Chemistry, **48*(9),** 1469-1472.

[30] **Dušek, K.** (1967). The formation of a three-dimensional network in the copolymerization of styrene and divinylbenzene. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications, **32(3),*** 1182-1190.

[31] **Aroca, A. S., Pradas, M. M., Ribelles, J. G.** (2008). Effect of crosslinking on porous poly (methyl methacrylate) produced by phase separation. *Colloid and Polymer Science, **286*(2),** 209-216.

[32] **Aroca, A. S., Ribelles, J. G., Pradas, M. M., Garayo, A. V., Antón, J. S.** (2007). Characterisation of macroporous poly (methyl methacrylate) coated with plasma-polymerised poly (2-hydroxyethyl acrylate). *European Polymer Journal,**43*(10),** 4552-4564.

[33] **Okay, O.** (2007). Macroporous hydrogels from smart polymers. *Smart Polymers: Applications in Biotechnology and Biomedicine*, 269-293.

[34] **Zhang, H., Edgar, D., Murray, P., Rak-Raszewska, A., Glennon-Alty, L., Cooper, A.** I. (2008). Synthesis of porous microparticles with aligned porosity.*Advanced Functional Materials*, ***18*****(2),** 222-228.

[35] **Zhang, H., Cooper, A. I.** (2007). Aligned porous structures by directional freezing. *Advanced materials*, ***19*****(11),** 1529-1533.

[36] **Lewis, R. V., Fallon, A., Stein, S., Gibson, K. D., Udenfriend, S.** (1980). Supports for reverse-phase high-performance liquid chromatography of large proteins. *Analytical Biochemistry*, ***104*****(1),** 153-159.

[37] **Lloyd, L. L., Millichip, M. I., Watkins, J. M.** (2002). Reversed-phase poly (styrene–divinylbenzene) materials optimised for large scale preparative and process purification of synthetic peptides and recombinant proteins. *Journal of Chromatography A*, ***944*****(1),** 169-177.

[38] **Costa, A. M. S., Mano, J. F. (2015).** Extremely strong and tough hydrogels as prospective candidates for tissue repair–A review. *European Polymer Journal*, ***72*****,** 344-364.

[39] **Okay, O.** (2000). Macroporous copolymer networks. *Prog. Polym. Sci.****25***,711-779.

[40] **Dusek, K.,** (1982). Network formation in chain crosslinking (co)polymerization. İçinde: Developments in Polymerization 3, Haward, R.N., Ed., London, Applied Science, Sayfa: 143.

[41] **Omidian, H., Rocca, J. G., Park, K.** (2005). Advances in superporous hydrogels. *Journal of Controlled Release*, ***102*****(1),** 3-12.

[42] **Hentze, H. P., Antonietti, M.** (2001). Template synthesis of porous organic polymers. *Current Opinion in Solid State and Materials Science****, 5*****(4),** 343-353.

[43] **Kato, N., Sakai, Y., Shibata, S.** (2003). Wide-range control of deswelling time for thermosensitive poly (N-isopropylacrylamide) gel treated by freeze-drying.*Macromolecules*, ***36*****(4),** 961-963.

[44] **Mukai, S. R., Nishihara, H., Tamon, H.** (2006). Porous microfibers and microhoneycombs synthesized by ice templating. *Catalysis surveys from Asia*, ***10*****(3-4),** 161-171.

[45] **Nishihara, H., Mukai, S. R., Yamashita, D., Tamon, H.** (2005). Ordered macroporous silica by ice templating. *Chemistry of materials*, ***17*****(3),** 683-689.

[46] **Zheng, S., Wnag, T., Liu, D., Liu, X., Wang, C., Tong, Z.** (2013). Fast deswelling and highly extensible poly (N-isopropylacrylamide)-hectorite clay nanocomposite cryogels prepared by freezing polymerization. *Polymer*. ***54,*** 1846-1852

[47] **Sun, X. L., He, W. D., Pan, T. T., Ding, Z. L., Zhang, Y. J.** (2010). RAFT cryopolymerizations of acrylamides and acrylates in dioxane at− 5° C.*Polymer*, ***51*****(1),** 110-114.

[48] **Lozinsky, V. I., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B.** (2001). The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation*, ***10*****(4-5),** 163-188.

[49] **Ceylan, D., Doğu, S., Karacık, B., Yakan, S., Okay, O. S., Okay O.** (2009), Evaluation of butyl rubber as sorbent material for the removal of oil and polycyclic aromatic hydrocarbons from seawater, *Environ. Sci. Technol.* ***43*****(10),** 3846-3852.

[50] **Ivanov, R. V., Babushkina, T. A., Lozinsky**, **V. I.,** (2005). Specific of acrylamide cryopolymerisation at temperatures above and below the eutectic point of the frozen reaction system. *Polym. Sci. Ser.* ***47A,*** 791-799.

[51] **Ivanov, R. V., Lozinsky, V. I., Noh, S. K., Han, S. S., Lyoo, W. S.,** (2007). Preparation and characterization of polyacrylamide cryogels produced from a high-molecular weight precursor I. Influence of the reaction temperature and concentration of the cross-linking agent. *J. Appl. Polym. Sci.* ***106,*** 1470-1475

[52] **Mikhalovsky, S. V., Savina, I. N., Dainiak, M., Ivanov, A. E., Galaev, I. Y.,** (2011). Biomaterials/Cryogels. *Elsevier,* 11-22.

[53] **Ak, F., Öztoprak, Z., Karakütük, İ., Okay, O.** (2013). Macroporous silk fibroin cryogels. *Biomacromolecules.* ***14,*** 719-727

[54] **Henderson, T. M. A., Ladewig, K., Haylock, D. N., McLean K. M., O'Connor, A. J**. (2013). .Cryogels for Biomedical Applications. *J. Mater. Chem. B.* ***1,*** 2682

[55] **Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B.** (2007). Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. *Journal of Separation Science,* ***30*****(11),** 1657-1671.

[56] **Lozinsky, V. I.** (2002). Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application. *Russian Chemical Reviews,* ***71*****(6),** 489-511.

[57] **Filippova, I. Y., Bacheva, A. V., Baibak, O. V., Plieva, F. M., Lysogorskaya, E. N., Oksenoit, E. S., Lozinsky, V. I.** (2001). Proteinases immobilized on poly (vinyl alcohol) cryogel: novel biocatalysts for peptide synthesis in organic media. *Russian chemical bulletin,* ***50*****(10),** 1896-1902.

[58] **Padol, A. R., Jayakumar, K., Mohan, K., Manochaya S.** (2012). Natural biomaterial silk and silk proteins: Applications in tissue repair. *International Journal of Materials and Biomaterials Applications.* ***2*** **(4),** 19-24

[59] **Thurber, A. E., Omenetto, F. G., Kaplan, D. L.** (2015). In vivo bioresponses to silk proteins. *Biomaterials,* ***71,*** 145-157.

[60] **Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., Kaplan, D. L.** (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials.* ***24,*** 401-416

[61] **Yücel, T., Lovett, M. L., Kaplan, D. L.,** (2014). Silk-based biomaterials for sustained drug delivery. *Journal of Controlled Release*. ***190,*** 381-397.

[62] **Ude, A. U., Eshkoor, R. A., Zulkifili, R., Ariffin, A. K., Dzuraidah, A. W., Azhari, C. H.,** (2014). Bombyx mori silk fibre and its composite: A review of contemporary developments. *Materials and Design*. **57,** 298-305

[63] **Kim, U. J., Park, J., Li, C., Jin, H. Y., Valluzzi, R., Kaplan D. L.,** (2004). Structure and Properties of Silk Hydrogels. *Biomacromolecules*. ***5,*** 786-792

[64] **Koh, L. D., Cheng, Y., Teng, C. P., Khin, Y. W., Loh, X. J., Tee, S. Y., Low, M., Ye, E., Yu, H. D., Zhang, Y. W., Han, M. Y.** (2015). Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. *Progress in Polymer Science.* ***46,*** 86-110

[65**] Zhou C. Z., Confalonieri F., Jacquet M., Perasso R., Li Z. G., Janin J.,** (2001) Silk ,fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Protein Struct. Funct. Genet.* ***44,*** 119–22.

[66] **Breslauer, D. N., Kaplan, D. L. (2012).** 9.04—Silks. in-Chief: Krzysztof M, Martin M, editors. *Polymer Science: A* Comprehensive Reference. Amsterdam: Elsevier, 57-69.

[67] **Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Kaplan, D. L.** (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, ***24*****(3),** 401-416.

[68] **Hearer, J. C., Dee, K. C.** Proteins and amino acid-derived polymers. In: Guelcher S.A., Hollinger, J.O., editors. An introduction to biomaterials. Boca Raton, F.L.: CRC Taylor and Francis, p. 121-138, 2006.

[69] **Hardy, J. G., Romer, L. M., Scheibel, T. R.** (2008). Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer*. ***49,*** 4309–4327

[70] **Silva, R., Fabry, B., Boccaccini A. R.,** (2014). Fibrous protein-based hydrogels for cell encapsulation. *Biomaterials.* ***35,*** 6727-6738

[71]**Murray R. K., Mayes P.A., Granner D.K., Rodwell V.W.** (1993). Plasma proteins, immunoglobulins, and blood coagulations. *Harper's Biochemistry* 677-687.

[72] **Kundu, B., Rajkhowa, R., Kundu, S., C., Wang X.,** (2013). Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Advanced Drug Delivery Reviews.* ***65,*** 457–470

[73] **Kim, U., J., Park, J., Kim, H., J., Wada, M., Kaplan, D., L.,** (2005). Three-dimensional aqueous-derived biomaterials scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials.* ***26,*** 2775-2785

[74] **Matsumoto, A., Chen, J., Collette, A., L., Kim, U-J., Altman, G., H., Cebe, P., Kaplan, D., L.,** (2006). Mechanisms of Silk Fibroin Sol-Gel Transition. *J. Phys. Chem. B.* ***110,*** 21630-21638

[75] **Bölgen, N., Yang, Y., Korkusuz, P., Güzel, E., El Haj, A. J., Pişkin, E.** (2008). Three-dimensional ingrowth of bone cells within

biodegradable cryogel scaffolds in bioreactors at different regimes. *Tissue Engineering Part A,* ***14*****(10),** 1743-1750.

[76] **Nazarov, R., Jin, H. J., Kaplan, D., L.** (2004). Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. *Biomacromolecules*, ***5*****(3),** 718-726.

[77] **Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., Boccaccini, A. R.** (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, ***27*****(18),** 3413-3431.

[78] **Choong, C., Triffitt, J. T., Cui, Z., F,.** (2004). Polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering: effects of a calcium phosphate coating layer on osteogenic cells. *Food and bioproducts processing*, ***82*****(2),** 117-125.

[79] **Lee, S. H., Shin, H.** (2007). Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, ***59*****(4),** 339-359.

[80] **Bales, B. L., Messina, L., Vidal, A., Peric M., Nascimento, O. R.,** (1998). Precision relative aggregation number determinations of SDS micelles using a spin probe. A model of micelle surface hydration. *J. Phys. Chem. B,* ***102,*** 11742-11751.

[81] **Wu, X., Hou, J., Li, M., Wang, J., Kaplan, D. L., Lu, S.** (2012). Sodium dodecyl sulfate-induced rapid gelation of silk fibroin. *Acta biomaterialia*, ***8*****(6),** 2185-2192.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad **:** Caner AKINCI

Doğum Tarihi ve Yeri **:** 02.11.1988, Üsküdar

E-posta **:** akincica@itu.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** **:** 2011, Eskişehir Osmangazi Üniversite, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya
- **Yüksek lisans** **:** 2016, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Kimya Programı