

**BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN MİKROAKIŞKAN  
SİSTEMİ KULLANARAK SODYUM ALJİNAT FİLM ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Betül MUTLU**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**AĞUSTOS 2019**



**BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN MİKROAKIŞKAN  
SİSTEMİ KULLANARAK SODYUM ALJİNAT FİLM ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Betül MUTLU  
(171083114)**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi İsrail KÜÇÜK**

**AĞUSTOS 2019**

BTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 171083114 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Betül MUTLU, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “Doku Mühendisliği Uygulamaları için Mikroakışkan Sistemi Kullanarak Sodyum Aljinat Film Üretimi” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :** **Dr. Öğr. Üyesi İsrail KÜÇÜK**

Bursa Teknik Üniversitesi



**Jüri Üyeleri :** **Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ**

Yıldız Teknik Üniversitesi



**Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER**

Bursa Teknik Üniversitesi



**Savunma Tarihi :** 06.08.2019

**FBE Müdürü :** **Doç. Dr. Murat ERTAŞ**

Bursa Teknik Üniversitesi

.....

...../...../.....

## İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Betül MUTLU

İmzası:



## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, T-şekilli bir mikroakışkan sistem kullanılarak doku mühendisliği uygulamaları için aljinat filmlerin üretimi ve çeşitli yöntemlerle karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmamın oluşmasını, planlanmasını ve yürütülmesini sağlayan danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi İsrail KÜÇÜK'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmada gerçekleştirilen, Taramalı Elektron mikroskobu analizi için Bilkent UNAM' dan Semih BOZKURT ve Mustafa GÜLER' e, X-Işınları Kırınım Analizleri için Sakarya Üniversitesi Metalürji Malzeme Mühendisliği Öğr. Gör. Fuat KAYIŞ' a, Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi için BTÜ Merlab Öğr. Gör. İbrahim ŞEN' e, çeşitli analizlerin yapılmasında bana yardımcı olan BTÜ Metalürji Malzeme ve Mühendisliği Arş. Gör. Taha Yasin EKEN ve BTÜ Kimya Mühendisliği Arş. Gör. Gözde SALKIÇ GEÇİM' e en içten dileklerle teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca ve deneysel çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde laboratuvar kullanımında yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen başta Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER olmak üzere Bursa Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım. Bu süreçte her zaman bilgi ve desteğine başvurduğum, tecrübelerini benden esirgemeyen her fırsatta akıl danıştığım değerli arkadaşım Çiğdem İNCİ AYDEMİR' e teşekkür ve minnetimi ayrıca belirtmek isterim. Bu sürecin bana kazandırdığı, her zaman desteklerini hissettiğim değerli arkadaşlarım Nalan FİLİZ ve Hurşit Safa AYDIN' a sonsuz teşekkürler. Bu zorlu süreçte yanımda olan, her zaman destekleyen ve motive eden, beni olmaktan gurur duyduğum bir şekilde yetiştiren aileme sonsuz teşekkürler.

Bu tez çalışması BTÜ-BAP tarafından 172L03 kodlu '*Doku Mühendisliği Uygulamaları için Mikroakışkan Sistem Kullanılarak Sodyum Aljinat Film Üretimi*' lisansüstü tez destekleme projesi ile finansal olarak desteklenmiştir. Ayrıca 118M219 kodlu Tübitak projesi çerçevesinde tez çalışması kısmi olarak desteklenmiştir.

Ağustos 2019

Betül MUTLU

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR .....	vii
SİMGELER.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xii
SUMMARY.....	xiii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ .....</b>	<b>4</b>
2.1 Doku Mühendisliği.....	4
2.2 Doku İskeleleri .....	6
2.2.1 Doku iskelesi gereksinimleri .....	6
2.2.1.1 Biyouyumluluk .....	6
2.2.1.2 Biyobozunurluk.....	6
2.2.1.3 Mekanik özellikler .....	7
2.2.1.4 İskele mimarisi.....	7
2.3 Doku Mühendisliği Uygulamalarında Gözenekli Biyobozunur Film ve Membran İskele Yapılarının Kullanımı .....	9
2.4 Gözenekli Film Üretim Yöntemleri .....	11
2.4.1 Film yapı üretimi için geleneksel yöntemler .....	12
2.4.1.1 Faz ayrılması.....	12
2.4.1.2 Dondurarak kurutma .....	13
2.4.1.3 Çözücü dökümü ve partikül liçi.....	13
2.4.1.4 Sol-jel tekniği.....	14
2.4.1.5 Gaz köpüklendirme .....	14
2.4.2 Film üretimi için yeni yöntemler .....	16
2.4.2.1 Elektroğirme.....	16
2.4.2.2 Üç boyutlu (3B) yazıcı ile üretim .....	17
2.4.2.3 Mikroakışkan tekniği.....	18
2.5 Mikroakışkan Tekniğin Doku İskelesi Filmlerin Üretimi İçin Kullanımı .....	19
2.6 Mikroakışkan Sistemde Mikrobaloncuk Oluşum Mekanizması .....	20
2.7 Mikroakışkan Sistemlerde Baloncuk Oluşumu Üzerindeki Faktörler .....	21
2.7.1 Mikroakışkan sistemin özelliklerinin baloncuk oluşumu üzerine etkisi .....	22
2.7.1.1 Mikroakışkan cihaz geometrisi .....	22
2.7.1.2 Mikrokanal çapı .....	24
2.7.1.3 Fazların akış hızı .....	24
2.7.2 Mikrobaloncuk oluşumunda çözelti özelliklerinin etkisi .....	24
2.7.2.1 Arayüzey gerilimi.....	25
2.7.2.2 Viskozite.....	26
2.8 Mikroakışkan Sistemde Film Üretimi İçin Aljinat Biyopolimerinin Kullanımı .....	26
2.9 Mikroakışkan Sistemde Doku İskele Film Yapılarının Üretimi.....	27
2.10 Mikroakışkan Sistemde İskele Filmlerin Üretimi ile İlgili Çalışmalar.....	29
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>31</b>
3.1 Materyal .....	31
3.2 Yöntem.....	31

3.2.1 Polimerik çözeltilerin ve çapraz bağlama çözeltisinin hazırlanması .....	31
3.2.2 Polimerik çözeltilerin karakterizasyonu .....	32
3.2.3 T-bağlantılı mikroakışkan sistemin kurulumu ve sodyum aljinat mikro baloncukların üretimi .....	32
3.2.4 Elde edilen sodyum aljinat mikrobaloncukların boyut ve boyut dağılımının belirlenmesi .....	33
3.2.5 Sodyum aljinat gözenekli film yapılarının üretimi .....	33
3.2.6 Aljinat hidrojel film yapılarının üretimi .....	34
3.2.7 Elde edilen gözenekli film yapılarının mikro yapı analizleri .....	35
3.2.8 Elde edilen hidrojel film yapıların kimyasal yapılarının analizi .....	35
3.2.9 Elde edilen hidrojel film yapıların kristal yapılarının analizi .....	35
3.2.10 Elde edilen hidrojel filmlerin termal özelliklerin analizi .....	35
3.2.11 Elde edilen hidrojel filmlerin in vitro su alım kapasitesinin belirlenmesi .....	35
3.2.12 Elde edilen hidrojel filmlerin Nötral Kırmızısı Alım (NKA) testi ile sitotoksitesinin belirlenmesi .....	36
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>38</b>
4.1 Elde Edilen Polimerik Çözeltilerin Karakterizasyonu ve Özellikleri .....	38
4.2 T-Şekilli Mikroakışkan Cihazla Mikrobaloncuk Oluşumu .....	38
4.3 Mikrobaloncuk Karakterizasyonları ve Özellikleri .....	39
4.3.1 Çözelti konsantrasyonunun mikrobaloncuk özelliklerine etkileri .....	40
4.3.1.1 Polimer konsantrasyonunun mikrobaloncuk boyutuna etkisi .....	40
4.3.1.2. Sürfaktan (PEG40S) konsantrasyonunun mikrobaloncuk boyutlarına etkisi 41	
4.3.1.3 Fosfolipit kullanımının mikrobaloncuk boyutlarına etkisi .....	43
4.3.2 T-şekilli mikroakışkan sistem işlem parametrelerinin mikrobaloncuk özelliklerine etkisi .....	45
4.3.2.1 Gaz basıncının mikrobaloncuk boyutlarına etkisi .....	45
4.3.2.2 Sıvı faz akış hızının mikrobaloncuk özelliklerine etkisi .....	46
4.4 Sodyum Aljinat Filmlerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Mikro Yapı Analizi .....	49
4.5 Hidrojel Film Yapılarının Karakterizasyonu .....	53
4.5.1 Hidrojel filmlerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizleri .....	53
4.5.1.1 Çözelti parametrelerinin hidrojel mikro yapıları üzerine etkileri .....	53
4.5.1.2 T-Şekilli mikroakışkan cihaz işlem parametrelerinin hidrojel film içyapıları üzerine etkileri .....	58
4.5.3 Hidrojel filmlerin FT-IR ile kimyasal yapı analizleri .....	60
4.5.3 Hidrojel filmlerin X-ışını kırınımı (XRD) yöntemi ile kristal yapı analizi .....	63
4.5.4 Hidrojel filmlerin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile termal özelliklerin analizi .....	64
4.5.5 Hidrojel film yapılarının şişme testleri sonuçları .....	65
4.5.6 Hidrojel filmlerin sitotoksitete testi sonuçları .....	68
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>70</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>73</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>86</b>

## KISALTMALAR

<b>2B</b>	: İki Boyutlu
<b>3B</b>	: Üç Boyutlu
<b>Al</b>	: Aljinat
<b>Beas-2b</b>	: İnsan bronş epitel hücre hattı
<b>CNC</b>	: Computer Numerical Control
<b>DTM</b>	: Damlacık Tabanlı Mikroakışkanlar
<b>DSC</b>	: Differential Scanning Calorimetry
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetraasetik asit
<b>ESM</b>	: Ekstraselüler Matriks
<b>FEP</b>	: Florloetilen polipropilen
<b>FT-IR</b>	: Fouirer Transform Infrared Spektrofotometr
<b>MG63</b>	: İnsan osteosarkom hücre hattı
<b>NKA</b>	: Nötral Kırmızı Alım
<b>PC</b>	: Polikarbon
<b>PDI</b>	: Poli dispersite ideksi
<b>PEG40S</b>	: Polietilen glikol 40 stereat
<b>PEGDA</b>	: Polietilen glikol di akrilat
<b>PLLA</b>	: Poli(L-Laktik asit)
<b>PLA</b>	: Poli Laktik Asit
<b>PLGA</b>	: Poli laktik asit-Glikolik asit
<b>PMDS</b>	: Polidimetil siloksan
<b>PMMA</b>	: Polimetil metakrilat
<b>PVA</b>	: Poli vinil alkol
<b>SEM</b>	: Scanning Electron Microscope
<b>SA</b>	: Sodyum aljinat
<b>UV</b>	: Ultra viyole
<b>XRD</b>	: X-ray Diffraction

## SİMGELER

<b>Ca</b>	: Kılcal Sayı
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum Klorür
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>N<sub>2</sub></b>	: Azot
<b>P<sub>d</sub></b>	: Disperse faz basıncı
<b>P<sub>s</sub></b>	: Sürekli faz basıncı
<b>Q<sub>d</sub></b>	: Disperse faz hacimsel akış hızı
<b>Q<sub>s</sub></b>	: Sürekli faz hacimsel akış hızı
<b>T<sub>g</sub></b>	: Camı geçiş sıcaklığı
<b>W<sub>d</sub></b>	: Hidrojel kuru ağırlık
<b>W<sub>w</sub></b>	: Hidrojel şişmiş ağırlık
<b>μ<sub>s</sub></b>	: Sürekli faz viskozitesi

## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

<b>Çizelge 3.1:</b> Mikrobaloncuk eldesi için kullanılan aljinat/PEG40S ve aljinat/lipit /PEG40S çözeltilerinin konsantrasyonu.....	<b>32</b>
<b>Çizelge 4.1:</b> Mikrobaloncuk üretimi için kullanılan aljinat/PEG40S ve aljinat/PEG40S/lipit çözeltilerinin viskozite ve yüzey gerilimleri.....	<b>38</b>
<b>Çizelge 4.2:</b> Farklı gaz basıncı ve sıvı akış hızlarında üretilen mikrobaloncukların ortalama çaplarını ve PDI' leri.....	<b>47</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

<b>Şekil 2.1:</b> Doku mühendisliği temel bileşenleri.....	<b>5</b>
<b>Şekil 2.2:</b> Gözenek boyutunun hücre davranışı üzerindeki etkisi, farklı gözenek boyutlarındaki polikarbon membran yüzeylerine tutunmuş MG63 hücreleri:(a) 0,2 µm, (b) 0,4 µm, (c)1 µm, (d) 3 µm, (e) 5 µm ve (f) 8 µm.....	<b>8</b>
<b>Şekil 2.3:</b> Faz ayrılması yöntemiyle iskele üretiminin şematik gösterimi.....	<b>12</b>
<b>Şekil 2.4:</b> Farklı üretim yöntemleriyle elde edilmiş iskelelerin mikro yapıları (a) Dondurarak kurutma ile hazırlanan aljinat iskele (b) Faz ayırma ile hazırlanan PLLA / PLA iskele .....	<b>13</b>
<b>Şekil 2.5:</b> Çözücü döküm-partikül liçi yöntemi ile iskele üretiminin şematik gösterimi.....	<b>14</b>
<b>Şekil 2.6:</b> Farklı üretim yöntemleriyle elde edilmiş iskelelerin mikro yapıları(a) Sol-jel tekniği ile hazırlanan kollajen iskele (b)Gaz köpüklendirme ile hazırlanan jelatin iskele.....	<b>15</b>
<b>Şekil 2.7:</b> Elektroegirme işleminin şematik gösterimi.....	<b>16</b>
<b>Şekil 2.8:</b> Aort kapağının 3B yazıcı ile üretimi. (a) Mikro BT görüntülerinden yeniden oluşturulan aort kapak modeli (b) yazdırılmış aort kapağı.....	<b>17</b>
<b>Şekil 2.9:</b> T-şekilli mikroakışkan cihaz içerisinde baloncuk oluşumunun şematik gösterimi (a) disperse fazın parmak ( <i>slug</i> ) oluşumu (b) baloncuk ayrılması.....	<b>21</b>
<b>Şekil 2.10:</b> Çeşitli mikroakışkan cihaz geometrileri (a) çapraz akışlı mikroakışkan cihaz (b) eş akışlı mikroakışkan cihaz (c) akış odaklı mikroakışkan cihaz.....	<b>22</b>
<b>Şekil 2.11:</b> T-şekilli geometride akış tipleri a) Çapraz akış ve b) Dik akış.....	<b>23</b>
<b>Şekil 2.12:</b> Aljinat biyopolimerinin moleküler yapısı (a) Manuronik ve glukuronik asitten oluşan kopolimer yapı (b)Yumurta kutusu modeli.....	<b>27</b>
<b>Şekil 2.13:</b> Mikrobalonculardan gözenekli iskele yapılarının oluşumunun şematik gösterimi(a) polimerik mikrobaloncuklar (b) mikrobaloncuk jelleştirme ile açık gözenekli yapı oluşumu.....	<b>28</b>
<b>Şekil 3.1:</b> (a) Deney düzeneğinin şematik gösterimi (b)T-şekilli PMMA mikroakışkan cihazı.....	<b>33</b>
<b>Şekil 3.2:</b> Cam altlık üzerinde toplanmış ve film oluşumu için kurutulmaya bırakılmış mikrobaloncukların görüntüsü.....	<b>34</b>
<b>Şekil 3.3:</b> Dondurularak kurutulmuş kuru hidrojel film görüntüsü.....	<b>34</b>
<b>Şekil 4.1:</b> Mikrobaloncuk kümesi.....	<b>39</b>
<b>Şekil 4.2:</b> Farklı aljinat konsantrasyonlarındaki çözeltilerden sabit gaz basıncında (0,5 bar) elde edilmiş mikrobaloncukların optik mikroskop görüntüleri (a) (b) (c) 50 µl dk <sup>-1</sup> (d) (e) (f) 100 µl dk <sup>-1</sup> akış hızlarında (büyütme 100X, 100 µm).....	<b>40</b>
<b>Şekil 4.3:</b> Elde edilen mikrobaloncukların ortalama çaplarının aljinat miktarına bağlı değişimi.....	<b>41</b>
<b>Şekil 4.4:</b> Farklı PEG40S konsantrasyonlarındaki çözeltilerden sabit gaz basıncında (0,8 bar) elde edilmiş mikrobaloncukların optik mikroskop görüntüleri (a) (b) (c) 50 µl dk <sup>-1</sup> (d) (e) (f) 100 µl dk <sup>-1</sup> akış hızlarında (büyütme 100X, 100 µm).....	<b>42</b>

<b>Şekil 4.5:</b> Ortalama mikrobaloncuk çaplarının PEG40S miktarına bağlı değişimi....	<b>43</b>
<b>Şekil 4.6:</b> Lipitsiz ve lipitli çözeltilerden sabit basınçta (0,8 bar) elde edilen mikro baloncukların optik mikrografları (a) (b) 50 µl dk <sup>-1</sup> , (d) (e) 100 µl dk <sup>-1</sup> akış hızları (büyütme 100X, 100 µm).....	<b>44</b>
<b>Şekil 4.7:</b> Lipit ilavesinin ortalama mikrobaloncuk boyutu üzerine etkisi.....	<b>44</b>
<b>Şekil 4.8:</b> Farklı basınçlarda oluşturulmuş mikrobaloncuklara ait optik mikrograflar.....	<b>45</b>
<b>Şekil 4.9:</b> Gaz basıncının mikrobaloncuk boyutları üzerine etkisi(a) 50 µl dk <sup>-1</sup> (b) 100 µl dk <sup>-1</sup> .....	<b>46</b>
<b>Şekil 4.10:</b> Farklı konsantrasyondaki çözeltilerden üretilmiş köpüklerin belirli zaman aralıklarında çekilmiş fotoğrafları.....	<b>48</b>
<b>Şekil 4.11:</b> % 1Al-%0,25 PEG40S içeren çözeltiden filmin SEM görüntüsü (1000X büyütmeye) .....	<b>50</b>
<b>Şekil 4.12:</b> % 1Al-%0,5PEG40S içeren filmin SEM görüntüsü (500X büyütmeye).....	<b>50</b>
<b>Şekil 4.13:</b> % 1 Al-% 0,5 PEG40S-%0,25 lipit içeren filmlerin SEM görüntüsü (1000X büyütmeye).....	<b>51</b>
<b>Şekil 4.14:</b> Aljinat konsantrasyonunun hidrojel mikro yapısı üzerine etkisi (Q <sub>s</sub> =50µl dk <sup>-1</sup> , P <sub>g</sub> = 0,5 bar) (a, c ve e 250X ; b, d ve f 1000X büyütmeye).....	<b>54</b>
<b>Şekil 4.15:</b> PEG40S konsantrasyonunun hidrojel mikro yapısı üzerine etkisi (Q <sub>s</sub> =50µl dk <sup>-1</sup> , P <sub>g</sub> = 0,8 bar) (a, c ve e 250X ; b, d ve f 1000X büyütmeye).....	<b>56</b>
<b>Şekil 4.16:</b> Lipitli ve lipitsiz mikrobaloncuklardan elde edilmiş hidrojellerin SEM görüntüsü (Q <sub>s</sub> =50µl dk <sup>-1</sup> , P <sub>g</sub> = 0,8 bar) (a ve c 100X ; b, d ve f 500X büyütmeye).....	<b>58</b>
<b>Şekil 4.17:</b> Farklı gaz basıncında üretilen mikrobaloncuklardan elde edilmiş hidrojellerin SEM görüntüleri (a ve b; Q <sub>s</sub> =50µl dk <sup>-1</sup> , c ve d; Q <sub>s</sub> =100µl dk <sup>-1</sup> , 200X büyütmeye.....	<b>59</b>
<b>Şekil 4.18:</b> Farklı sıvı faz akış hızında üretilen mikrobaloncuklardan elde edilen hidrojel filmlerin SEM görüntüsü a) Q <sub>s</sub> =25µl dk <sup>-1</sup> b) a; Q <sub>s</sub> =50µl dk <sup>-1</sup> b) c) Q <sub>s</sub> =75µl dk <sup>-1</sup> d) a; Q <sub>s</sub> =100µl dk <sup>-1</sup> (P <sub>g</sub> =0,5 bar, 300X büyütmeye).....	<b>60</b>
<b>Şekil 4.19:</b> Ticari olarak alınan sodyum aljinatın FT-IR spektrumu.....	<b>61</b>
<b>Şekil 4.20:</b> PEG40S FT-IR spektrumu.....	<b>61</b>
<b>Şekil 4.21:</b> Elde edilen % 1Al-%0,25PEG40S ve % 1Al-%0,25PEG40S-%0,25 lipit içeren hidrojellerin FT-IR spektrumu.....	<b>62</b>
<b>Şekil 4.22:</b> Sodyum aljinat ve PEG40S'in XRD ölçüm sonucu grafiği.....	<b>63</b>
<b>Şekil 4.23:</b> Sodyum aljinat, % 1Al-%0,25PEG40S ve % 1Al-%0,25PEG40S-%0,25 lipit içeren hidrojel filmlerin XRD ölçümü sonucu grafiği.....	<b>64</b>
<b>Şekil 4.24:</b> Sodyum aljinat, PEG40S, % 1Al-%0,25PEG40S ve % 1Al-%0,25PEG40S-%0,25lipit içeren hidrojel filmlerin DSC eğrileri.....	<b>65</b>
<b>Şekil 4.25:</b> Mikroakışkan sistemde hazırlanan hidrojel film yapıları a) Dondurularak kurutulmuş kuru hidrojel b) Distile suda şişmiş hidrojel.....	<b>66</b>
<b>Şekil 4.26:</b> 50 µl dk <sup>-1</sup> akış hızında farklı konsantrasyonlarda elde edilmiş hidrojellerin film yapılarının şişme eğrisi.....	<b>66</b>
<b>Şekil 4.27:</b> 100 µldk <sup>-1</sup> akış hızında farklı konsantrasyonlarda elde edilmiş hidrojellerin film yapılarının şişme eğrisi.....	<b>67</b>
<b>Şekil 4.28:</b> Hildrojel film yapılarının Nötral Red sitotoksosite testi sonuçlarına göre hücre canlılığı. ....	<b>69</b>

# DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN MİKROAKIŞKAN SİSTEMİ KULLANARAK SODYUM ALJİNAT FİLM ÜRETİMİ

## ÖZET

Son yıllarda doku mühendisliğindeki önemli gelişmeler, dokuya özgü hücre kültürü faaliyetlerini destekleyen iskelelerin üretimi için yeni yöntemlerin geliştirilmesini gerektirmiştir. Geleneksel üretim yöntemlerinin iskele mikro mimarisi üzerindeki yetersiz kontrolü, iskelelerin üretimi için yeni tekniklerin geliştirilmesine duyulan ihtiyacı arttırmıştır. Mikroakışkan teknikleri yüksek derecede düzenli ve kontrollü gözenekli doku iskelelerinin üretimi için son zamanlarda en ilgi çeken yeni tekniklerden bir tanesidir.

Bu tez çalışmasında, T-şekilli bir mikroakışkan sistem ile doku mühendisliği uygulamalarında iskele yapısı olarak kullanılacak gözenekli aljinat hidrojel filmlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada mikroakışkan cihaz vasıtasıyla üretilen mikrobaloncukların iki aşamayla gözenekli film oluşturma potansiyeli araştırılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında farklı konsantrasyonlardaki polimerik mikrobaloncuklar bir altlık üzerinde toplanmış ve baloncuk patlama işlemi ile gözenekli yapıların oluşumu sağlanmıştır. İkinci aşamada ise elde edilen mikrobaloncuklara  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi kullanılarak bir jelleşme işlemi uygulanmış ve kurutulularak gözenekli üç boyutlu yapılar elde edilmiştir. Ayrıca, polimerik çözelti konsantrasyonları, sıvı akış hızı ve gaz basıncı gibi parametrelerin elde edilen filmlerin özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Üretilen filmlerin mikro yapıları Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) vasıtasıyla incelenmiştir. Gözenekli aljinat hidrojel filmlerin kimyasal kompozisyonu Fourier Dönüşüm İnfrared Spektroskopisi (FT-IR), kristal yapıları X-Işını Kırınım Analizi (XRD) ile belirlenmiştir. Termal özelliklerinin incelenmesinde Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) kullanılmıştır. Ayrıca üretilen gözenekli aljinat hidrojel filmlerin su alım kapasitesini belirlemek için şişme testi, biyouyumluluğunun değerlendirilmesi için Nötral Kırmızısı Alım (NKA) sitotoksikite testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek, mikroakışkan sistemin doku mühendisliğinde gözenekli iskele yapılarının kontrollü bir şekilde üretilmesinde etkili bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Mikroakışkan yöntem, mikrobaloncuk, gözenekli film, kaplama, doku iskelesi, hidrojel

# SODIUM ALGINATE FILM PRODUCTION USING MICROFLUIDIC SYSTEM FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

## SUMMARY

In recent years, notable advances in tissue engineering have required the development of new methods for the production of scaffolds that support tissue-specific cell culture organizations. Inadequate control of conventional production methods over scaffold microarchitecture has increased the requirement for the development of new techniques to produce of scaffolds. Microfluidic techniques have recently become one of the most interesting new techniques for the production of highly ordered and controlled porous film scaffolds structures.

In this thesis, porous alginate films that can be used as scaffold structures in tissue engineering applications are produced with a T-junction microfluidic device. Used in the present work; in this study the two step process to the potential of porous film formation from microbubbles that produced by the microfluidic device was investigated. In the first, microbubbles of different polymeric concentrations were collected on a plate and, the formation of porous structures was achieved by bubble bursting process. In the second step, a gelling process applied on the microbubbles obtained with a use of  $\text{CaCl}_2$  solution and freeze-drying to form porous three-dimensional structures. In addition, the effects of parameters such as polymeric solution concentrations, liquid flow rate and gas pressure on the properties of the obtained films were investigated. The microstructures of the produced films were examined by Scanning Electron Microscopy (SEM). The chemical composition of the hydrogel films was determined by Fourier Transformation Infrared Spectroscopy (FT-IR) and X-ray diffraction analysis (XRD). Differential Scanning Calorimetry (DSC) was used to examine the thermal properties. In addition, the swelling test was used to determine the water uptake capacity of the hydrogel films, and the Neutral Red Intake (NKA) cytotoxicity test was used to evaluate the biocompatibility. The obtained results showed that microfluidic system is an effective method in controlled production of porous scaffold structures in tissue engineering.

**Keywords:** Microfluidic method, microbubble, porous film, scaffold, coating, hydrogel

## 1. GİRİŞ

Doku mühendisliği, tıp, biyoloji, biyomalzeme bilimi ve mühendisliği içeren disiplinlerarası bir alandır. Doku mühendisliğinin amacı, bozulmuş veya yaralı dokuların yenilenmesine yardımcı olabilecek tıbbi implantlar geliştirmektir. Son 30 yılda doku mühendisliği, özellikle kalp krizi, diyabet ve kanserler gibi önemli sağlık sorunları için alternatif bir tıbbi tedavi olarak dikkat çekmektedir. Bu araştırma alanı genetik olarak veya ekstra hücrel ortamlar vasıtasıyla manipüle edilen canlı hücrelerin kullanımını içermektedir. Doku mühendisliğinde amaç, vücuda implantasyon için biyolojik ikame edicilerin geliştirilmesi veya üç-boyutlu (3B) yapay bir matris çerçevesinde aktif bir şekilde dokuların yeniden şekillenmesini teşvik etmektir. Doku iskelesi olarak adlandırılan bu gözenekli yapılar in vitro olarak hücrelerin tutunması, büyümesi ve çoğalması için 3B bir ortam sağlamaktadır. Doku iskeleleri, hücreler için uygun yapışma yüzeyi oluşturmalarının yanı sıra, mekanik dayanım sağlamakta, hücrelerin fizyolojik ve biyolojik değişikliklere cevap vermesi için çevre doku ile etkileşimin kurulmasına yardımcı olmakta; ayrıca gerçek hücre dışı matrisin yeniden oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Gözenekli biyobozunur filmler ve membranlar doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi ve hücre ayırma matrisleri olarak kullanılan biyomalzemelerdir. Özellikle hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını destekleyen ince biyopolimerik gözenekli filmler, doku yenilenmesi için doku mühendisliğinde umut verici iskele adaylarıdır. Doku iskelesi olarak kullanılan gözenekli ince film yapıları, besin ve oksijen difüzyonunu etkili bir şekilde sağlayarak yeni doku oluşumu için vaskülarizasyonu (damarlanma) etkili bir şekilde sağlayacağı düşünülmektedir. Gözenekli filmlerin üretimi için literatürde çeşitli geleneksel teknikler kullanılmaktadır. Bu teknikler film gözenekliliğinin sağlanması noktasında basit yaklaşımlar sunmaktadır. Ancak, doku mühendisliği uygulamaları için uygun bir iskele yapısını imal etmek için mevcut film ve membran üretim teknikleri genellikle organik çözücü kullanımını ve çoklu işlem adımlarını gerektirmektedir. Bu işlemler, yapıların tasarımına bağlı değildir ve bu nedenle iskele olarak kullanılan film ve membran yapılarında gözenekliliğin, gözenek boyutlarının

ve film/membran kalınlığı gibi iskelelerin temel gereksinimlerinin kontrol edilmesi zor olmaktadır. Ayrıca geleneksel üretim tekniklerinde saflaştırma ve sterilizasyon işlemleri için gereken işlemler ve üretim süresi nedeniyle büyük ölçüde daha yüksek bir maliyete neden olmakta ve hücre kültürlenmesi devreye girdiğinde, düşük gözeneklilik, geniş gözenek boyut dağılım oranı vb. gibi bazı ciddi sınırlamalar getirmektedir. Film yapılarının gözenek büyüklüğünü kontrol etmeyi sağlayabilen yeni teknikler olsa da gözenek yapısını tek adımda kontrol etmek hala zorluklar içermektedir. Tüm bu dezavantajlar nedeniyle bu gözenekli yapıların üretimi için kullanılan üretim teknikleri iskele olarak kullanılacak film veya membran üretimi için çoğu zaman yetersiz kalmaktadır.

Son yıllarda hücre-malzeme etkileşimlerinin daha iyi anlaşılması ile arzu edilen özelliklere sahip, doku tipine özgü gözenekli film yapılarının üretimine yönelik çalışmalar hızla artmaktadır. Her biri kendi avantajları ve dezavantajları olan gözenekli iki boyutlu (2B) ve 3B film yapılarını imal etmek için çeşitli yeni teknikler geliştirilmiştir. Bu yeni teknikler sayesinde arzu edilen özelliklerdeki iskelelerin üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Mikroakışkan teknikler, geleneksel tekniklerin iskele mimarisi üzerinde getirdiği sınırlamaları aşmak için son yıllarda doku mühendisliğinde iskele üretimi için kullanılan yeni tekniklerden bir tanesidir. Mikrometre boyutlarındaki kanallarda akışkanların akışının kontrol edilmesini sağlayan mikroakışkan teknolojisi, nanopartiküllerden 3B matrislerin üretimine kadar değişen malzemelerin üretimi için bir etkili platformdur. Özellikle gaz tabanlı mikroakışkan sistemler izole edilmiş baloncuklardan organize mikro köpüklere kadar, yüksek oranlarda kontrol edilebilen boyut dağılımına sahip gözenekli doku iskelelerinin üretimi için oldukça iyi bir adaydır.

Bu çalışmada, gaz tabanlı mikroakışkan yöntemi ile elde edilen sodyum aljinat mikrobaloncuklarından, doku mühendisliğinde iskele uygulamaları için tasarlanmış ince film ve hidrojel formunda gözenekli yapılar üretilmiştir. Ayrıca sistem parametrelerinin elde edilen gözenekli film yapılar üzerine etkisi araştırılmış ve kimyasal, fiziksel ve termal karakterizasyonları yapılmıştır.

Bu tez çalışmasının asıl amacı mikroakışkan sistemin doku mühendisliğinde doku iskele uygulamaları için aljinat gözenekli filmlerin ve hidrojel film yapılarının üretim

potansiyelini incelemek ve çeşitli sistem parametrelerinin elde edilen filmlerin çeşitli özelliklerine olan etkilerini karakterize etmektir.

Bu amaçla aşağıdaki belirtilen çıktılar hedeflenmektedir.

1. Film ve hidrojel oluşumu için kullanılacak mikrobaloncukların üretimi ve karakterizasyonu
2. Farklı içerik ve polimerik konsantrasyonda üretilen mikrobaloncukların gözenekli film oluşturma potansiyelleri
3. Farklı içerik ve polimerik konsantrasyon, akış hızı ve basınç parametreleri ile üretilen mikrobaloncukların gözenekli hidrojel film üretim potansiyeli
4. Elde edilen hidrojel film yapılarının çeşitli analiz yöntemleri ile fiziksel, mikroskopik, kimyasal ve termal karakterizasyonları yapılması ve sitotoksisite testleri ile biyouyumluluğunun değerlendirilmesi

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Bu bölümde doku mühendisliği, doku iskeleleri, hidrojel ve gözenekli film yapıları ve üretim yöntemleri ile ilgili literatür özeti yapılmıştır. Ayrıca bölüm, mikroakışkan yöntemler hakkında ve mikroakışkan yöntemlerin literatürde film ve hidrojel iskele yapılarını üretimine ilişkin çalışmalar hakkında literatür bilgisini de içermektedir.

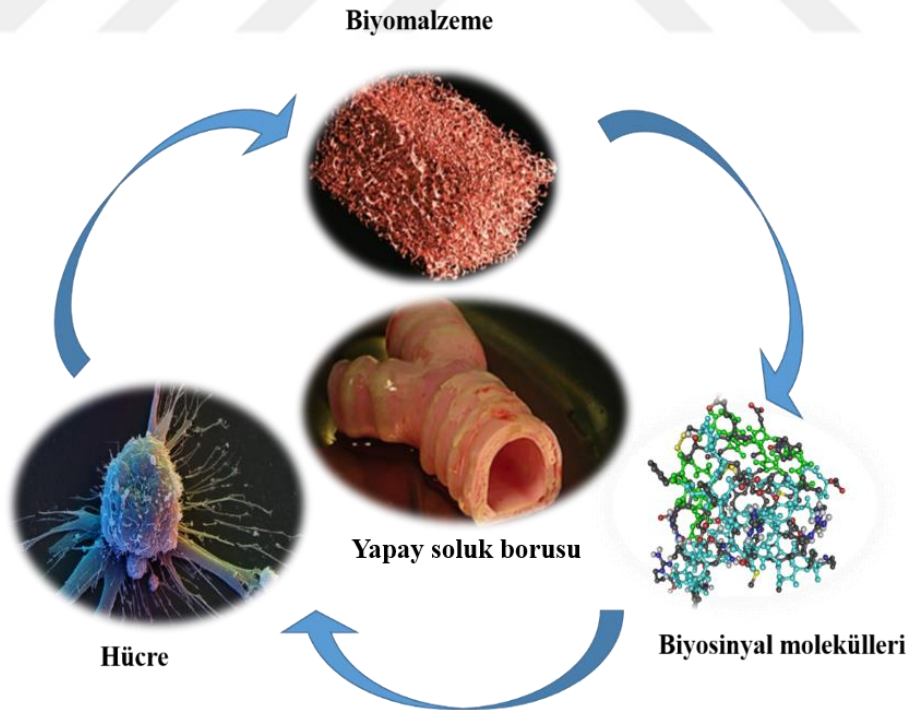
### 2.1 Doku mühendisliği

Doku Mühendisliği, fonksiyonun yitirmiş hastalıklı doku ya da organların onarılması/yenilenmesi amacıyla ilgili organların yeni biyolojik eşdeğerlerinin geliştirilmesini hedefleyen, disiplinlerarası bir alandır [1,2]. Doku mühendisliği, hasarlı doku veya organların tedavisi için, tıp, biyoloji, kimya ve malzeme biliminin temel prensiplerini kullanır [2]. Son 30 yılda doku mühendisliği, özellikle kalp hastalıkları [3], diyabet [4] ve kanserler [5] gibi yıkıcı sağlık sorunları için alternatif bir tıbbi tedavi olarak dikkat çekmektedir.

Doku mühendisliği, kök hücre ve öncülleri gibi çoğalma ve farklılaşma özelliğine sahip hücreler, bu hücrelerin farklılaşması ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri gibi biyoaktif moleküller ve hücreler için yapısal destek sağlayan iskeleler gibi temel bileşenlerden meydana gelmektedir (Şekil 2.1) [6]. Bu temel bileşenlerin tek başlarına ya da bir arada uygulanmasına bağlı olarak farklı doku mühendisliği yaklaşımları benimsenmiştir [7]. Doku mühendisliğinde kullanılan üç yaygın yaklaşım, gerekli işlevi sağlayan hücreleri değiştirmek için izole edilmiş hücrelerin veya hücre ikamelerinin kullanılması, büyüme ve farklılaşma faktörleri gibi doku indükleyici maddelerin hedeflenen yerlere gönderilmesi ve üç boyutlu yapı iskelelerinde büyüyen hücrelerin implantasyonudur [1,8]. Bu yaklaşımlar uygulamalarda, işlevini tam olarak yerine getiremeyen dokulardaki hasara bağlı olarak seçilir. Örneğin, hücre deformasyonlarına bağlı olarak azalmış fonksiyon gösteren dokularda hücre tedavileri(hücre yaklaşımı) doku onarımını sağlayabilirken, doku hasarının daha fazla olduğu durumlarda dokunun yenilenmesi için yeterli olmamaktadır [9]. Üç stratejiden,

hücre-iskele yapılarının kullanımı genellikle daha başarılı bir sonuç alınmasını sağlamıştır. Bu yaklaşımda, iskele önemli bir rol oynamaktadır.

Doku mühendisliğinde iskele kullanımının ana amacı ekstraselüler matriksi (ESM) taklit etmektir. ESM, yalnızca çok hücreli organizmaların yapısal bütünlüğünü korumak için fiziksel bir destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücre yaşamını, organizasyonu ve farklılaşmasını desteklemek için biyokimyasal ve biyofiziksel sinyaller için bir rezervuar görevi görür [10]. Farklı fonksiyonlara sahip dokulara ve organlara bölünmesi ve bütünleşmesi için hücreleri yönlendiren farklılaşma ve göç olayları, ESM' nin dokuya özgü 3B mimarilere ve kompozisyonlara sürekli ve dinamik olarak yeniden şekillenmesi ile eşlik eder [11]. Bu nedenle, her dokunun yerleşik hücreleri, hücre ve çevresi arasındaki dinamik karşılıklık veya çift yönlü çapraz karışma olarak adlandırılan bir işlemde ESM' ye karşı sorumludur ve bunlara yanıt verir. Tüm bu sebeplerden dolayı doku veya organ yenilenmesini sağlamak için ilk adım ESM' yi yeniden oluşturmaktır. İleri seviyede doku hasarlarında bozulmuş ESM yüzünden rejenerasyon azalmakta ya da tamamen durmaktadır [12,13].



**Şekil 2.1:** Doku mühendisliği temel bileşenleri [6].

## **2.2 Doku İskeleleri**

İşlevsel dokular oluşturmak için hücreleri uyaran üç boyutlu (3B), destek yapılarının veya matrislerinin geliştirilmesi, doku mühendisliğinin temel hedeflerinden biridir. 3B iskeleler, dokunun eski formunu geri kazanması sürecinde, hücrelere yapısal destek sağlayarak, hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasına yardımcı olmaktadır [1,14]. Bu iskeleler esasen doku oluşumu için ESM'yi taklit eden bir şablon görevi görür ve dokunun gelişmesi için boşluğu ve hücrelerin büyümesi için fiziksel bir desteği sağlamaktadır. Ayrıca iskele, hücrelerin fenotiplerini koruyabilecekleri ve proteinleri ve molekülleri sentezleyebilecekleri bir ortam sağlamalıdır. Bu sebeple her hücre ve doku tipine göre iskele tasarımı farklı olmaktadır [7,15].

### **2.2.1 Doku iskelesi gereksinimleri**

Çeşitli biyomalzemelerden çeşitli imalat teknikleri kullanılarak vücuttaki farklı doku tiplerine özgü sayısız iskele üretilmiştir. Bununla birlikte, doku tipinden bağımsız olarak, doku mühendisliğinde kullanım için iskelelerin sahip olması gereken temel gereksinimler bulunmaktadır [16].

#### **2.2.1.1 Biyouyumluluk**

Herhangi bir yapı iskelesinin doku mühendisliği için ilk kriteri biyolojik olarak uyumlu olması gerektiğidir. Hücreler, iskeleye yapışmalı, normal şekilde büyümeye ve yeni matris oluşmadan önce çoğalmaya devam etmelidir. İmplantasyondan sonra, iskele veya doku tasarımı yapı, iyileşmesini azaltabilecek veya vücut tarafından reddedilmeye neden olacak kadar şiddetli bir inflamasyon tepkiye yol açmamalıdır [17,18].

#### **2.2.1.2 Biyobozunurluk**

Doku mühendisliğinin amacı, vücudun kendi hücrelerinin zamanla implante edilmiş iskeleyi veya doku mühendisliği yapısı ile yer değiştirmesini sağlanmasıdır. İskeleler ve yapılar kalıcı implantlar olarak tasarlanmamıştır. Bu nedenle iskele, hücrelerin kendi hücre dışı matrislerini üretmelerine izin verecek şekilde biyolojik olarak parçalanabilir olmalıdır [19]. Bu bozulmanın yan ürünleri de toksik olmamalı ve diğer organlarla etkileşime girmeden vücuttan atılabilmelidir [20]. Bozulmanın doku

oluşumuyla birlikte gerçekleşmesine izin vermek için, makrofajlar gibi hücrelerin kontrollü infüzyonuyla birleştirilen bir inflamasyon yanıtı gereklidir [21].

### **2.2.1.3 Mekanik özellikler**

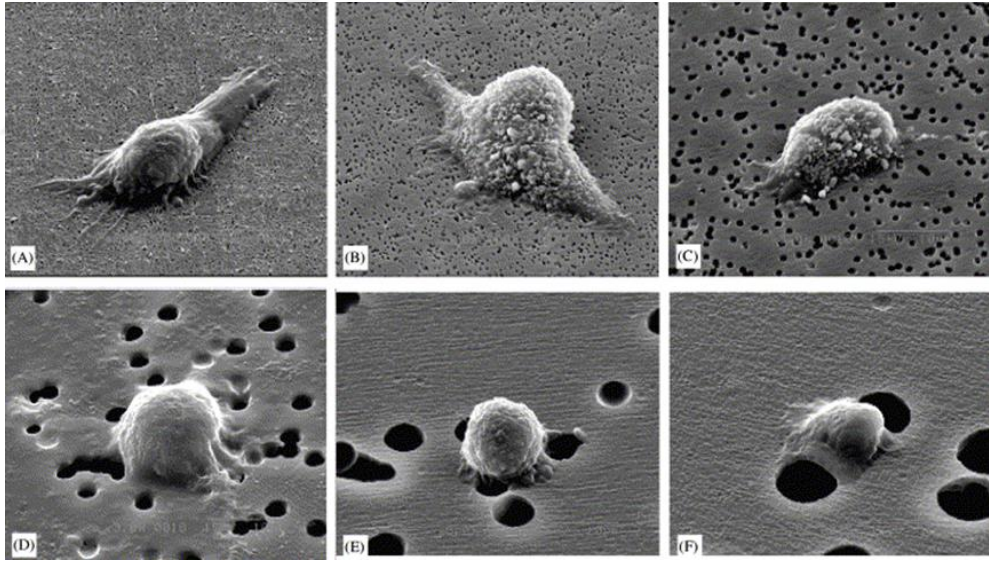
İdeal olarak, iskele, implante edileceği anatomik bölgeye uygun mekanik özelliklere sahip olmalı ve implantasyon zamanından yeniden yapım (*remodeling*) işleminin tamamlanmasına kadar gerekli mekanik bütünlüğünü korumalıdır [15]. İnsan vücudunun fizyolojik çevre sistemi içinde mevcut olan sıkıştırma veya çekme kuvvetlerine karşı gerekli mekanik destek, iskelenin tasarlandığı dokuya bağlı olarak sağlanmalıdır. Bu durum tüm dokularda önemli olmasına rağmen, özellikle kardiyovasküler ve ortopedik uygulamalar için bazı zorluklara neden olur. Yeterli mekanik özelliklere sahip iskeleler üretmek, kemik ve kırık dokular doku mühendisliğinde karşılaşılan en büyük zorluklardan biridir [22, 23]. İyi mekanik özelliklere sahip birçok malzeme üretilmesine rağmen, yüksek gözeneklilik ve vaskülarizasyon için yetersiz kapasite nedeniyle *in vivo* olarak implante edildiğinde başarısız olabilmektedir [24]. Hücre infiltrasyonuna ve vaskülarizasyona izin vermek için yeterli mekanik özellikler ile gözenekli mimari arasındaki dengenin herhangi bir iskelenin başarısının anahtarı olduğu kabul edilmektedir [25].

### **2.2.1.4 İskele mimarisi**

Doku mühendisliği için kullanılan yapı iskelelerinin mimarisi kritik öneme sahiptir. İskelelerin farklı yapısal özelliklerinin, kültür ortamındaki hücrelerin kaderini belirlemede esasen üç önemli etkisi vardır: gözenekler, ara bağlantılar ve iskele gözenekliliği (*porosity*) [26].

İskeleler, hücrel penetrasyonu ve yapı içerisindeki hücrelere ve bu hücrelerin oluşturduğu hücreler arası matrise yeterli miktarda besin yayılmasını sağlamak için birbirine bağlı bir gözenek yapısına ve yüksek gözenekliliğe sahip olmalıdır. Ayrıca, atık ürünlerin iskeleden dışarı çıkmasının sağlamak için gözenekli, birbirine bağlı bir yapıya ihtiyaç duyulmaktadır ve iskele bozunma ürünleri de diğer organlar ve çevre dokularla karışmadan vücuttan çıkabilmelidir [27]. İskelenin morfolojisi, gözenek büyüklüğü, şekli ve vaskülarizasyonu bakımından yeni dokunun oluşumuna rehberlik edebilecek şekilde tasarlanmalıdır. İskelelerin merkezindeki vaskülarizasyon eksikliği ve atıkların giderilmesinden kaynaklanan çekirdek bozulma sorunu, doku mühendisliği alanında önemli bir konudur [28,29].

İskele mimarisi için başka bir kilit bileşen, iskelenin ortalama gözenek büyüklüğüdür. Ortalama gözenek ve ara bağlantı boyutları, iskelelerin 3B yapısındaki hücrelerin büyümesini ve penetrasyonunu büyük ölçüde etkiler [30]. Hücreler öncelikle, malzeme yüzeyindeki kimyasal gruplar (ligandlar) vasıtasıyla iskelelerle etkileşime girer. Ligand yoğunluğu spesifik yüzey alanından, yani hücrelerin yapışabileceği bir gözenek içindeki mevcut yüzeyden etkilenir. Bu, iskeledeki ortalama gözenek büyüklüğüne bağlıdır. Bu nedenle gözeneklerin, hücrelerin yapıya geçmesine iskele içindeki ligandlara bağlanabilmesine izin verecek kadar büyük olmaları gerekir [31-33]. Şekil 2.2’de MG63 hücrelerinin farklı gözenek boyutlarındaki polikarbon membranlardaki hücre davranışlarının değişimi gösterilmektedir [34]. Gözenek büyüklüğü ve gözenek bağlanabilirliği, sadece hücre yaşamında değil, aynı zamanda ECM salgılanmasında da önemli bir rol oynar. ECM salgısının derecesinin gözenek büyüklüğüne bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir [35]. Bu nedenle, herhangi bir iskele için, kültürlenecek hücre tipine ve tasarlanan dokuya bağlı olarak değişebilen kritik bir gözenek boyutu aralığı mevcuttur [36].



**Şekil 2.2:** Gözenek boyutunun hücre davranışı üzerindeki etkisi, farklı gözenek boyutlarındaki polikarbon membran yüzeylerine tutunmuş MG63 hücreleri:(a)0,2 µm, (b)0,4 µm, (c)1 µm, (d)3 µm, (e)5 µm ve (f)8 µm [34].

Öngörülen uygulamalara bağlı olarak, gözenek ölçüsü dikkatlice kontrol edilmelidir. İmplant gözenek büyüklüğünün doku rejenerasyonu üzerindeki etkisi, neovaskülarizasyon için 5 µm [37], yetişkin memelilerin deri rejenerasyonu için 20–125 µm'lik [38], osteoid büyümesi için 40-100 µm [39], ve kemiğin rejenerasyonu için 100–350 µm [40] optimum gözenek büyüklüğünü gösteren deneylerle

vurgulanmaktadır. Gözeneklilik ve gözenek bağlanabilirliği ve ortalama gözenek büyüklüğü dahil olmak üzere iskelelerin gözenek mimarisi, hücre sağ kalımı, hücre dışı matrislerin çoğalması ve salgılanması için kritiktir [41].

### **2.3 Doku Mühendisliği Uygulamalarında Gözenekli Biyobozunur Film ve Membran İskele Yapılarının Kullanımı**

Doku mühendisliğinde başarılı bir doku rejenerasyonun kilit faktörü, yapı iskelelerinin hızlı ve stabil neovaskülarizasyonu (yeni kan damarı oluşumu) teşvik etme yeteneğidir. Yetersiz vaskülarizasyon, yetersiz besin maddelerine ve oksijene yol açarak hücrelerde hipoksi ve üniform olmayan doku yapılarına neden olmaktadır [42]. Vaskülarizasyon için birincil etken iskele gözenekliliği ve gözenek yapısı olsa da diğer önemli bir faktör bu gözenekli yapıların kalınlığı ile ilişkilendirilmektedir [43]. Zengin kılcal ağlara sahip in vivo dokularla karşılaştırıldığında, in vitro prekürsör doku analogları, iskele içlerinde metabolik taşınımı desteklemek için vaskülarizasyondan yoksundur. İskelenin iç kısmında bulunan hücrelerin kaderi, metabolik maddelerin iskelenin iç kısmına difüzyonuna dayanır ve besin maddelerinin dış yüzeye yakın bulunan hücreler tarafından tüketilmesiyle tehlikeye girer. İskele kalınlığının artması besin ve oksijenini iskelenin iç kısımlarına difüzyonunu zorlaştırmaktadır [44-46]. İskele kalınlığının bu etkisi, hücrelerin büyümesinin, sıvı-doku arayüzünden birkaç yüz mikronla sınırlandırıldığı birçok üç boyutlu doku mühendisliği sisteminde gözlenmiştir. Deri gibi çok ince dokular için iskele yüzeyinde yetişen hücrelerin in vitro olarak çoğalması için iskele kalınlığının az olması genellikle sorun oluşturmamaktadır [47,48]. Ancak sert doku mühendisliğinde özellikle kas ve kemik dokular için kullanılan kalın iskeleler (200 µm'den fazla) için vaskülarizasyon büyük bir sorun teşkil etmektedir [48]. Bu gözenekli üç boyutlu kalın iskelelerde, iskele dış yüzeyinde birikmiş bir hücre tabakası ve iskele içerisinde muntazam olmayan bir büyümesi ortaya çıkabilmektedir. Genel olarak literatürde yapılan çalışmalar, kalın dokuların mühendisliğinin besleyici taşınımına sınırlı olduğunu ve homojen hücre dağılımını sağlamada yeterli olmadığını göstermektedir [50,51]. Doku mühendisliğindeki bu önemli sorunu çözmek için gözenekli filmler iskele yapıları olarak kullanılmıştır. Filmler ince bir malzeme tabakası olarak tanımlanmaktadır [51]. Biyobozunur polimer filmler gıda paketlenme uygulamaları için yaygın olarak kullanılmıştır ve biyolojik olarak bozunabilirliği nedeniyle, doku mühendisliğinde

iskele yapıları olarak ve hücre ayırma membranları olarak da oldukça sık kullanılmaktadır [52]. Gözenekli biyopolimerik filmler, hücre yapışmasını ve hücrelerin yapı içine göçünü teşvik eden ince ve gözenekli özelliklerinden dolayı biyouyumlu matrisler olarak, göz, karaciğer, cilt, kas, kalp ve kemik gibi doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır [54,55]. Doku mühendisliğinde kullanılan filmler ve iskeleler için önemli olan özellikler kalınlık, gözenek boyutu, gözeneklilik ve mekanik ve optik özelliklerdir [55]. Film kalınlığı ve gözeneklilik yukarıda da bahsedildiği gibi vaskülerizasyonla direkt olarak ilişkilendirilmektedir [43]. Filmlerin mekanik ve optik özellikleri ise filmlerin doku mühendisliğinde kullanımı için önemli bir konu olmaktadır. Besin ve oksijen geçişini sağlayan film yapıları ince malzemeler oldukları için genellikle yetersiz mekanik dayanım sergilemektedir [56]. Son yıllarda mekanik dayanımı geliştirilmiş kompozit filmlerin üretimi bu sorunun üstesinden gelmek için üzerinde en çok çalışılan araştırma alanlarından biridir. Özellikle nanoparçacıklar, seramikler gibi çeşitli malzemelerin kompozit polimerik filmlerin mekanik dayanımını arttırmak için bir arada kullanılması etkili sonuçlar vermektedir [58-60]. Filmlerin diğer önemli bir özelliği olan optik özellikler doğrudan malzeme özellikleri ile ilgilidir. Özellikle, oküler doku mühendisliğinde filmlerin kullanımı, gözenekliliğin ve gözenek büyüklüğünün önemli faktörler olduğu diğer organ ve doku türlerinin aksine büyük ölçüde film kalınlığı ve şeffaflığı ile ilgili olmaktadır [60].

Doku iskeleleri olarak kullanılan film yapıları doku mühendisliği uygulamaları için çeşitli yöntemler kullanılarak çeşitli formlarda hazırlanabilmektedir. Gözenekli ince film matrisleri, lif (fiber), hidrojel ve katı köpük formunda iskele yapıları olarak üretilebilmektedir [56,62]. Ekstraselüler matrisi taklit etme potansiyeline sahip gözenekli fiber iskele yapıları mikro ve nano liflerden oluşmaktadır. Birleştirilmiş polimer lifleri, sağladıkları geniş yüzey alanları ile hücrelerin yapışma, çoğalma ve farklılaşmasının gerçekleşmesi için oldukça istenen bir niş sağlamaktadır [63,64]. Mikro ve nano lifli iskele matrisleri, sert ve yumuşak doku mühendisliği uygulamaları için yaygın olarak kullanılmaktadır [64].

Diğer bir gözenekli film formu hidrojel matrislerdir. Hidrojeller, çok miktarda su ile çeşitli fiziksel veya kimyasal çapraz bağlarla bir arada tutulan çok çeşitli doğal veya sentetik polimerik ağlardan oluşur [65]. Hidrojel matrislerin yüksek su içeriği (yaklaşık %99) dokulara fiziksel benzerlik ve hidrojellere yüksek miktarda

biyoyumluluk sağlamaktadır [66]. Hidrojel iskele yapıları içsel hücrel etkileşimlere izin veren bağlantılı gözenek yapıları sayesinde doku mühendisliğinde büyük bir öneme sahiptir. Ayrıca hidrofilik çapraz bağ ağında büyüme faktörleri ve proteinler gibi biyosinyal moleküllerinin hapsedme kabiliyeti sayesinde, kültür ortamına çeşitli biyolojik moleküllerin kontrollü bir şekilde verilmesi için bir araç olarak da işlev görmektedirler.

Son on yılda çeşitli doku ve organ türlerinde doku mühendisliği uygulamaları için biyobozunur filmlerin ve membranların iskele olarak kullanım potansiyelini araştıran çok sayıda yayın bulunmaktadır [68]. Bununla birlikte, gözenekli filmlerin, özellikle deri doku mühendisliği [68,69], kornea doku mühendisliği [69] ve kemik doku mühendisliğinde [70] kullanımı daha yaygındır. Gözenek büyüklükleri ve gözeneklilik doku büyümesini etkileyebilecek önemli faktörler olduğundan kemik doku mühendisliğinde, kemik yenilenmesi ve kemik defektlerinin onarımı için özellikle hidrojel ve fiber formda film matrisler, ticari olarak bulunmaktadır [72,73]. Gözenekli biyopolimerik filmlerin en çok kullanıldığı diğer bir doku mühendisliği alanı deri doku mühendisliği uygulamalarıdır. Deri dokusunun yenilenmesinde sentetik greftler olarak kullanılan biyopolimerik matrisler, yarayı etkili bir şekilde onararak deri dokusunun yapısını iyileştirmeye yardımcı olmaktadır [73]. Deri dokunun onarımının yanı sıra salım yapan matrisler, yara iyileşme sürecini hızlandıran büyüme faktörleri, antibiyotikler ve antiinflamatuvar ilaçlar gibi çeşitli takviyeleri de bulundurabilirler [74].

#### **2.4 Gözenekli Film Üretim Yöntemleri**

Çoğu endüstriyel uygulamada olduğu gibi doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan polimerler sıklıkla önceden oluşturulmuş ve katı toz halindedir. Bu form genellikle doku mühendisliği gereksinimlerine uyması için uygun değildir. Bu sebeple kullanılacak olan polimerin ideal bir doku iskelesinin özelliklerini sağlayacak şekilde çeşitli yöntemler kullanılarak gözenekli bir son ürün haline getirilmesi gerekir. Doku mühendisliği uygulamaları için istenen özelliklere sahip gözenekli iskelelerin imalatı, karmaşık ve zorlu bir işlem olmaya devam etmektedir [7]. İskele imalat teknikleri için temel gereklilikler, makro yapıların ve mikro yapıların kontrolünü, biyoyumluluğun korunmasını ve mekanik özelliklerin kontrolünü içerir [16]. Bununla birlikte, doğru tekniğin seçimi kritiktir, çünkü üretim yöntemi iskelenin gözeneklilik, gözenek boyut

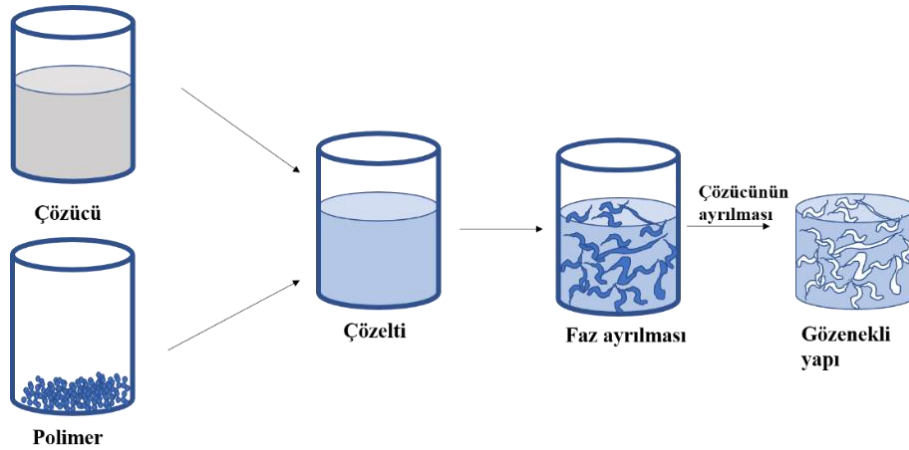
dağılımı, mekanik ve biyobozunma gibi temel özelliklerini önemli ölçüde değiştirebilir [75]. Çeşitli formlarda gözenekli yapı iskelelerinin hazırlamak için literatürde birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler geleneksel yöntemler ve yeni yöntemler olarak ele alınmaktadır [76].

#### 2.4.1 Film yapı üretimi için geleneksel yöntemler

Çeşitli formlarda gözenekli iskele yapılarının üretimi için farklı geleneksel yöntemler literatürde uzun zamandır kullanılmaktadır. Bu bölümde iskele yapılarının üretimi için kullanılan geleneksel yöntemler özetlenmiştir. Bu yöntemler, polimerik malzemelerden 3B gözenekli yapıların elde edilmesi için basit ve yaygın olmasına rağmen gözenekliliğin kontrolünde arzu edilen seviye sağlanamamaktadır.

##### 2.4.1.1 Faz ayrılması

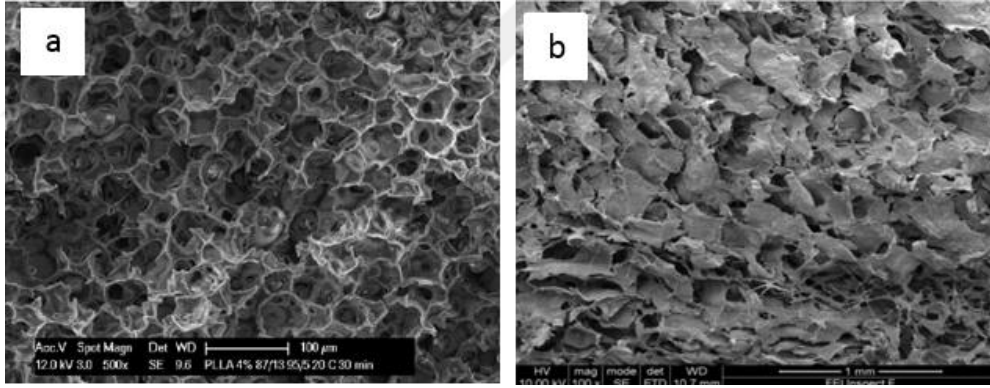
Faz ayrılması, kısaca bir polimeri uygun bir çözücü içinde eritmeyi, kalıba yerleştirmeyi, sonra kalıbı çözülene kadar hızlı bir şekilde soğutmayı içermektedir. Yöntem şematik olarak Şekil 2.3'te gösterilmiştir. Polimer düşük sıcaklıkta erimiş fenol, naftalen, veya dioksan gibi bir çözücü içinde çözülür. Sıvı-sıvı veya katı-sıvı faz ayrılması, çözelti sıcaklığı düşürülerek uyarılır. Süblimasyon yoluyla katılaştırılmış çözücü açısından zengin fazın daha sonra çıkarılması, gözenekli bir polimer iskele bırakır [78-80]. Bu yöntemin önemli bir avantajı, sert kimyasal veya termal ortamlar nedeniyle molekülün aktivitesini azaltmadan, biyoaktif moleküllerin matrislere dahil edilebilmesidir. Polimer tipleri, polimer konsantrasyonu, çözücü / çözücü olmayan oran ve en önemlisi, termal söndürme stratejisi gibi parametrelerdeki küçük bir değişiklik, sonuçtaki gözenekli iskele morfolojisini önemli ölçüde etkilemektedir [80].



Şekil 2.3: Faz ayrılması yöntemiyle iskele üretiminin şematik gösterimi [78].

### 2.4.1.2 Dondurarak Kurutma

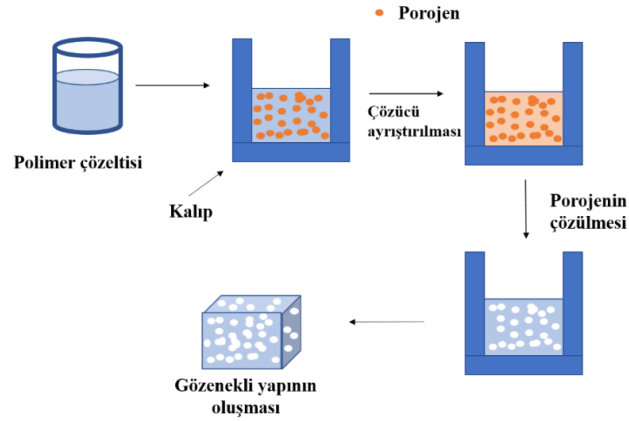
Liyofilizasyon olarak da bilinen dondurularak kurutma işlemi, uygun bir çözücü içinde çözülen bir polimerin donma noktasının altına kadar soğutulmasını ve çözücünün süblimasyon ile buharlaşarak polimerik yapıda gözenek oluşması işlemlerini içermektedir [81]. Bu teknikte, çözelti donma noktasına kadar soğutulduğunda çözelti içinde buz kristalli oluşmaktadır. Bu buz kristalleri daha sonra süblimasyona neden olmak için basıncının düşürülmesiyle uzaklaştırılmakta ve çözelti içindeki buzu çevreleyen polimerik madde ile karakterize olan gözenekli bir yapı ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.5a) [82]. Makro gözeneklilik başlangıçta buz kristallerinin işgal ettiği boş alana karşılık gelir [83]. Aynı zamanda, gözenek büyüklüğü donma yönteminin kontrol edilmesi ve değiştirilmesi ile yönetilebilir [84]. Dondurularak kurutma tekniği, iskele imalatı sırasında organik bir çözücü yerine su ve buz kristallerinin kullanılması nedeniyle biyomedikal uygulamada daha uygun bir yöntemdir; ancak, bu yöntemle vasküler sistemler gibi hiyerarşik yapıdaki yapı iskelelerinin üretimini sınırlı olmaktadır [85].



**Şekil 2.4:** Farklı üretim yöntemleriyle elde edilmiş iskelelerin mikro yapıları (a) Faz ayırma ile hazırlanan PLLA / PLA iskele [79] (b) Dondurarak kurutma ile hazırlanan aljinat iskele [82]

### 2.4.1.3 Çözücü dökümü ve partikül liçi

Bu yöntem kalibre edilmiş mineral (sodyum klorür, tartrat ve sitrat gibi) veya organik (sakaroz) parçacıkların (porojenlerin) bir polimer çözeltisi içinde dağıtılmasından oluşur (Şekil 2.4). Bu dispersiyon daha sonra çözücüye buharlaştırmak için döküm veya dondurularak kurutma yoluyla işlenir. İşlem sonunda porojen parçacıklar, gözenekli bir polimer matrisi üretmek için seçici çözülme ile ayrılır. % 93'e kadar gözenekliliğe sahip yüksek gözenekli iskele ve 500 µm'ye kadar gözenek çapları bu teknik kullanılarak hazırlanabilir [87,88].



**Şekil 2.5:** Çözücü döküm-partikül liçi yöntemi ile iskele üretiminin şematik gösterimi [87].

Bu yöntemin bir dezavantajı, yalnızca 3 mm kalınlığa kadar ince filmler veya membranlar üretmek için kullanılabilmesidir [88]. Bununla birlikte, üç boyutlu yapı, istenen şekildeki üç boyutlu bir matris oluşturmak üzere bunları birbirine lamine ederek polimer membranlar kullanılarak üretilebilir.

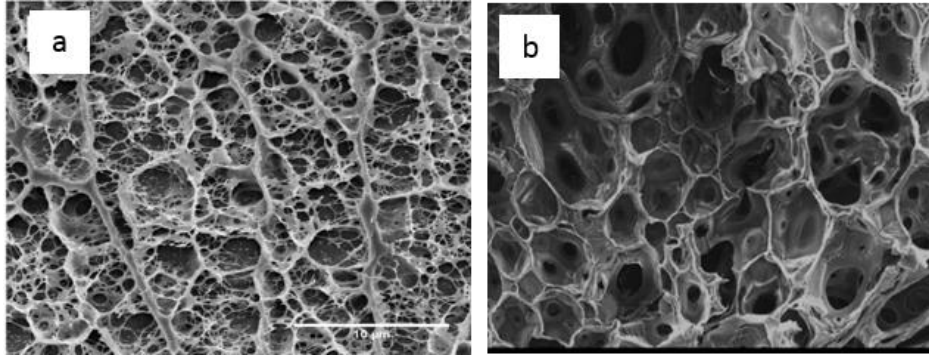
#### 2.4.1.4 Sol-Jel tekniği

Sol-jel tekniği, metal alkoksitlerin inorganik polimerleşmesine dayanmaktadır. Bir yüzey aktif cisminin ilavesiyle bir sol, ardından yoğunlaşma ve jelleşme reaksiyonları oluşur. Bu işlem, seramik veya cam malzemelerin ultra ince veya küresel şekilli tozlar, ince film kaplamalar, seramik elyaflar, mikro gözenekli inorganik membranlar, monolitik seramikler ve camlar ve yüksek gözenekli arojel materyaller şeklinde üretilmesine izin verir [89,90]. Bu yöntemin önemli bir dezavantajı, elde edilen iskelelerin yüksek mekanik dayanıma sahip olmamasıdır [91].

#### 2.4.1.5 Gaz köpüklendirme

Polimerlerin gazla köpüklenmesi, sanayide, örneğin; genişmiş polistiren, polivinil klorür köpüklerin hazırlanması uzun zamandır kullanılan bir yöntemdir. Porozite üretimi için bu tekniğin kullanımı bir polimer (sürekli faz) boyunca dağılmış gaz kabarcıklarının (iç faz) çekirdeklenmesini ve büyümesini kullanır [92]. 1996 yılında ilk kez Mooney ve ark.'ları tarafından Poli laktikasit-Glikolik asit (PLA-GA) iskelelerinin üretimi için kullanılmasıyla gaz köpüklendirme yöntemi [93], o zamandan beri doku mühendisliğinde mikro gözenekli iskelelerin üretilmesinde çekici bir teknik haline gelmiştir [94].

Gaz kabarcıkları, yerinde (*in situ*) kimyasal reaksiyon veya düşük ya da yüksek basınçta polimer fazına inert bir gaz eklenmesi yoluyla kimyasal veya fiziksel şişirme ajanları ile üretilebilir. Kimyasal reaksiyonla gaz köpüklenmesi, bir biyopolimer ve bir sürfaktanı içeren sulu çözeltinin içerisinde bir hidrofobik gazının üretilmesini sağlar. Gazın kimyasal öncüleri suda çözünür olmalıdır ve gaz, su fazında hemen hemen çözünebilecek kadar inert ve hidrofobik olarak üretilmelidir. Gaz köpürme tekniğinde, uygun asidik çözeltilerde N<sub>2</sub> veya CO<sub>2</sub> gibi bir inert gaz üretmek için polimer fazına sodyum bikarbonat gibi bir köpürtme maddesi eklenir. Polimerin gözenekli yapısı, dağılmış gaz fazı (süresiz faz) polimerin sürekli fazından çıkarıldığında oluşur [93,96,97]. Bu teknik aljinat [97], jelatin [98], poli (etilen glikol) diakrilat (PEGDA) ve poli (L-laktik) asit (PLLA) gibi polimerlerden gözenekli doku iskelelerin oluşturulması için oldukça fazla kullanılmaktadır [99]. Suda çözünür yüzey aktif cisminin işlevi köpüğün oluşumuna yardımcı olmak ve önemli bir köpük çürüğü olmadan manipülasyonunu mümkün kılmak için yeterli kinetik stabilite kazandırmaktır. Bu yöntemde, üretilen polimerik köpükler gaz ve sıvı yoğunluğu arasındaki büyük fark nedeniyle düşük kinetik stabiliteye sahiptir. Bu yüzden dondurulmuş köpük liyofilize edilir ve daha sonra polimer için çözücü olmayan bir çözelti içinde çözülmüş bir fiziksel veya kimyasal çapraz bağlayıcı içeren bir çözeltiye batırılır [100].



**Şekil 2.6:** Farklı üretim yöntemleriyle elde edilmiş iskelelerin mikro yapıları (a)Sol-jel tekniği ile üretilmiş kollejen iskele [90] (b)Gaz köpüklendirme ile üretilmiş jelatin iskele [99].

İskelelerin kimyasal şişirme ajanları ile köpüklendirilmesi, basit olmasına rağmen, birkaç dezavantajı bulunmaktadır. Bu yöntemle elde edilen iskeleler, kontrol edilemeyen ve tahmin edilemeyen gözenek boyutları ve gözenekler arası azalmış bağlantıları olan homojen olmayan yapılar sergiler; Sonuç olarak, iskelelerin morfolojisi homojen değildir. Ayrıca, reaksiyon aljinat, pektinler, gellan, vb. gibi pH

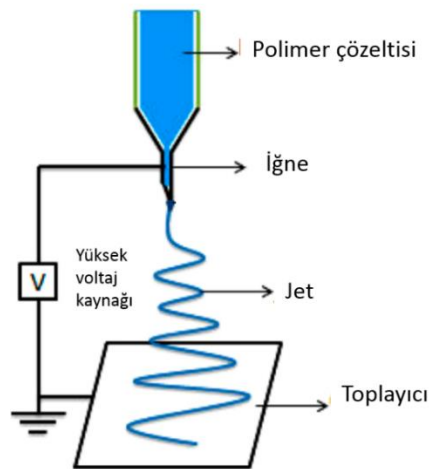
3'te jelleşmeye maruz kalan biyopolimerlerin kullanımını sınırlayan güçlü bir asidik ortamı içerir [101]. Kimyasal şişirme yaklaşımıyla ilişkili başka bir problem, köpüğün stabilitesi ve sıvı fazın viskozitesi üzerindeki tahmin edilemeyen etkisidir. Hem şişirme ajanlarının kimyasal yapısı, hem de sulu çözeltinin reolojisi ve sıvı-gaz arayüzey gerilimi üzerindeki etkileri, köpükleme işlemi sırasında sabit değildir; bu, sıvı fazı karakterize eden fiziksel parametreler ile sıvı / gaz ara yüzünü (örneğin viskozite, arayüz gerilimi) ve köpüklenme derecesinin belirlenmesini ve köpük stabilitesini zorlaştırmaktadır [103,104].

## 2.4.2 Film üretimi için yeni yöntemler

Gözenekli yapıların üretimi için kullanılan geleneksel teknikler kolay ve yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen gözeneklilik üzerine yetersiz bir kontrol sağlamaktadır. Geleneksel yöntemlerin bu dezavantajlarından dolayı son yıllarda gözenekli iskele yapılarının üretimi için yeni üretim teknikleri kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemlerden bazıları özetlenmektedir.

### 2.4.2.1 Elektroeğirme

Elektroeğirme tekniği, birkaç mikrondan nanometre aralığına kadar çapa sahip elyaflar da dahil olmak üzere gerekli morfoloji ve gözenekli iskeleleri üretmek için çok çeşitli malzemeleri işlemek için çok yönlülüğe sahiptir. Elektroeğirme, polimer liflerinin bir hedef altlık üzerine oluşumunu ve birikmesini kontrol etmek için bir elektrik alan kullanan imalat işlemidir. Şekil 2.7'de elektroeğirme işlemi şematik olarak gösterilmektedir.

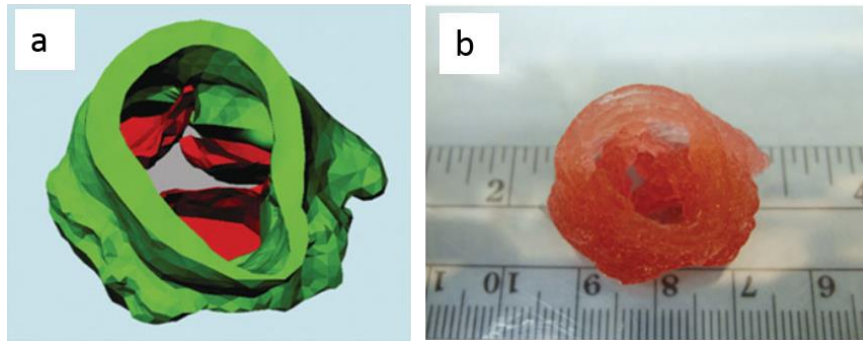


Şekil 2.7: Elektroeğirme işleminin şematik gösterimi [105].

Standart bir elektro eğirme sistemi, metalik iğneli bir eğirici, bir şırınga pompası, yüksek voltajlı bir güç kaynağı ve topraklanmış bir toplayıcıdan oluşmaktadır [105,106]. Elektroegirme işleminde, bir polimer çözeltisi veya eriyiği, bir elektrik potansiyeli ile enjekte edilir. Elektrik alan kuvveti, damlacıkların yüzey gerilimini aşar ve daha sonra topraklanmış toplayıcıya birikene kadar elektrostatik itme ile sürekli uzamış ve çırpılmış yüklü bir sıvı jeti oluşturur. Çözücü işlemden buharlaşır ve jet dokumasız bir elyafly membran oluşturmak için katılaşıır [106]. Birçok avantajı ve yoğun kullanımının yanı sıra elektroegirme tekniği, zayıf hücrenel içeri sızma [107], elde edilen liflerdeki veya işlem sonrası kimyasal kalıntılar üzerindeki olası toksisite [108], yüksek mekanik özellik gerektiren uygulamalar için yetersiz mekanik dayanım [109], yavaş üretim oranı, vb. gibi pratikte bazı kısıtlamalar içermektedir.

#### 2.4.2.2 Üç boyutlu (3B) yazıcı ile üretim

Üç boyutlu (3B) yazıcı teknolojisi, yapı iskelelerini yüksek hassasiyetle imal etmek ve karmaşık bir şekilde ayrıntılı biyomimetik 3B yapılar oluşturmak için umut verici bir araç olarak ortaya çıkmıştır. 3B baskı elde etmek için, bir tabaka (*layer-by-layer*) şeklinde üretimi gerçekleştiren; doğrudan 3B baskı, kaynaşmış biriktirme modellemesi, stereolitografi ve seçici lazer sinterleme gibi teknikler kullanılır [111,112]. Bu teknikler, milimetreden nanometre büyüklüğünde iskelelere kadar iskele üretmek için kullanılmıştır. 3B yazıcı ile doku iskelesi üretimi için ilk adım üretilmesi tasarlanmış iskelenin baskısının yapılabilmesi için bir bilgisayar modelinin oluşturulmasıdır (Şekil 2.8a) [112]. Daha sonraki adım ise baskı için kullanılacak polimerle, iskele yapısını üç boyutlu formda oluşturması için birbirini takip eden katman yaklaşımı kullanarak bilgisayar modelinin basımını içermektedir (Şekil 2.8b). Son adım ise genellikle bir katılama prosesini içermektedir [113].



**Şekil 2.8:** Aort kapağının 3B yazıcı ile üretimi. (a) Mikro bilgisayarlı tomografi görüntülerinden yeniden oluşturulan aort kapak modeli. (b) yazdırılmış aort kapağı [113].

3B baskı yönteminin kullanmanın avantajları arasında homojen hücre dağılımı yapabilen karmaşık şekillere sahip çok yönlü iskeleleri üretme yeteneği ve hücre dışı matrisi (ESM) taklit etme yeteneği bulunur. Bununla birlikte, iskelelerin 3B baskısı için stabilite ve istenen özelliklere sahip biyomalzemelerin mevcudiyeti, kullanılan baskı teknolojisine bağlı olarak sınırlandırılmaktadır [114,115]. Diğer bir dezavantaj, iskele tasarımının daha kesin ve karmaşık hale gelmesiyle önemli ölçüde artan iskele yapılarının üretilmesi için gereken üretim süresidir. Geleneksel tekniklerden gelişen, 3B baskı, doku mühendislerine ESM'nin karmaşık yapılarını taklit edebilen ve böylece fonksiyonel doku oluşturma potansiyeli ile hücre eklenmesi, çoğalması, dağıtılması ve farklılaşması için bir mikro-çevre sağlama iskeleleri tasarlanmanın yenilikçi bir yolunu sağlamaktadır [115].

#### **2.4.2.3 Mikroakışkan tekniği**

Mikroakışkan teknikler, ilaç kapsülleme, mikro ve nano parçacık üretimi, ayırma ve hücre analizinde son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır [116]. Özellikle birbiri ile karışmaz (*immiscible*) akışkanların manipülasyonu temeline dayanan damlacık veya gaz tabanlı mikroakışkanlar (DTM), akışkan ortamın minyatürleştirilmesi nedeniyle, doku iskelesi üretim süreçleri ve malzeme özellikleri üzerinde tam kontrolü sağlayan benzersiz fırsatlar getirmiştir [117]. Yöntem genel olarak, belli geometrilerdeki cihazlar (çipler) vasıtasıyla bir araya getirilmiş mikro kanallar içerisinde birbiri ile karışmayan iki fazın bir araya gelmesiyle ortaya çıkan farklı kayma gerilmeleri sonucu mikro litre hacimdeki sıvıların ayrılması temeline dayanmaktadır [118]. Akışkandan ayrılan mikrolitre hacmindeki sıvı veya gaz, diğer akışkan faz içerisine tutunur ve arayüzey kararsızlığını dengelemek için çoğu zaman küresel bir damlacık veya baloncuk halini alır. Mikroakışkan sistemdeki nispi düşük akış hızlardaki hidrodinamik akış, nadiren 20'yi aşan Reynold numarası (*Reynold number*) karakteristiği olan laminar akış oluşmasını sağlamaktadır. Bu durum daha büyük ölçekli sistemlere özgü kontrolsüz fizikomekanik ve fizikokimyasal değişkenliği ortadan kaldıran kontrollü ve tekrarlanabilir akışkan akış özelliklerine olanak sağlar. Böylelikle mikroakışkan sistemin parametrelerin değişmediği sürece neredeyse eş boyutlarda mikrodamlacıkların /mikrobaloncukların üretilmesini mümkün olmaktadır [119]. Genel olarak DTM yöntemin sağladığı bu benzersiz fırsatlar, damlacık büyüklüğü iki karışmaz fazın akış hızları ve oranlarını ayarlayarak kontrol edilir ve

damlacık büyüklüğü, kanallardan ve kanal çaplarından, akış rejimlerinden, fazların akış oranları ve viskozitelerinden etkilenir [121,122].

## 2.5 Mikroakışkan Tekniğin Doku İskelesi Filmlerin Üretimi İçin Kullanımı

Doku /organ rejenerasyonu ve tedavi süreçlerinde son yıllardaki önemli gelişmeler çeşitli doku mühendisliği uygulamaları için polimerik iskelelerin geliştirmesine, yeni teknolojilere ve yöntemlere olan ilgiyi artırmıştır. İskelelerin geleneksel üretim teknikleriyle imal edilmesi, birkaç yönden uygun olmasına rağmen, hücre kültürü devreye girdiğinde beraberinde bazı ciddi sınırlamalar getirmektedir. Bu sınırlamaların en dikkat çeken, iskele mikro morfolojisinin, homojen kolonizasyonunu bozabilecek, gözeneklerinin ve ara bağlantılarının çok dağınık olmasıyla ilgilidir. Hücrelerin, gözenekli bir iskele üzerinde perfüzyon altında ekildiği zaman, hücre süspansiyonunun, iskele boyunca akış yollarını takip ettiği gösterilmiştir [123,124]. Gözenek ve ara bağlantı boyutlarının küçük olduğu bölgelerde, hücre infiltrasyonu, iskele boyunca eşit olmayan bir hücre dağılımı ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, iskele içindeki değişken bir yerel geçirgenlik, eşit olmayan miktarda besin ve büyüme faktörleri iletimi, kan damarlarının büyümemesi ve atığın kaldırılmaması anlamına gelmektedir. Buna bağlı olarak, hücre çoğalması / ölümü oranı, metabolizma hızı, farklılaşma, göç, vb. hücresel faaliyetler bölgeye bağlı olacaktır [124]. Homojen olmayan hücre dağılımının doğrudan bir sonucu, yeni doku büyümesinin yanı sıra iskele biyolojik parçalanma oranının da bölgeye bağlı olacağı ve bunun da *in vivo* uygulamada iskelenin erken bozulmasına yol açabilecek bir koşul olacağı yönündedir [126,127]. Tüm bu nedenlerden dolayı, iskelelerde tekdüze (*uniform*) bir gözenekli yapı tercih edilmektedir. Hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimleri üzerindeki etkiyi açıklamak için, oldukça düzenli ve düzgün yapılara sahip olmak arzu edilir. Tekdüze gözenek yapısı iskele içinde yetişen bireysel hücrelerin yer kaplamak için benzer fırsatları deneyimlemelerine ve kültür içinde bir bütün olarak benzer davranışlarda bulunmalarına izin vermektedir [128,129]. Ayrıca, iskeleler genellikle büyüme faktörleri, ilaçlar veya yapışma peptidleri gibi biyoaktif moleküller ile modifiye edildiğinde, düzgün bir mekânsal yapı, kimyasal uyarıların daha homojen bir şekilde dağıtılmasını sağlamaktadır [129]. Bu yapısal şartlar, iskelelerin gözenekli mikro mimarisinin belirli hücre hatlarının kültürü için en uygun olanını bulmak için sistematik olarak değiştirilebileceği ve istenen morfolojik özelliklere sahip iskelelerin

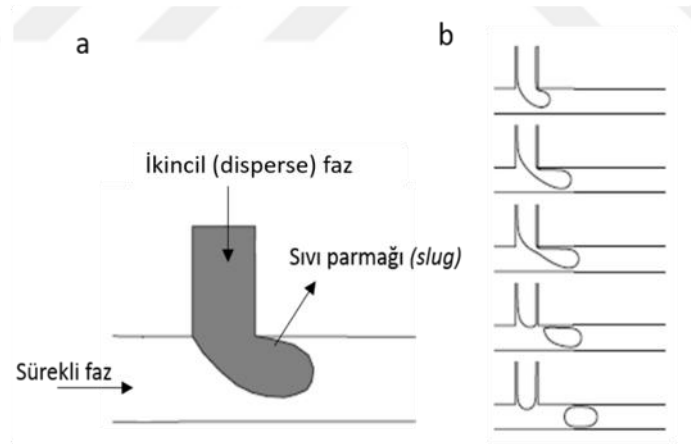
tekrarlanabilir üretimini garanti eden bir üretim teknolojisi gerekliliğini ortaya koymaktadır [130]. Tam da bu noktada mikro ölçekte akışkan veya gaz akışlarını yönlendiren mikroakışkanlar, onlarca ila yüzlerce mikron boyut aralığında tekdüze baloncukların/damlacıkların iskele şablonları olarak kullanımı için yeni bir alternatif sağlamıştır. Özellikle gaz tabanlı mikroakışkan sistemler mikrolitre hacimlerdeki akışın kontrolü sayesinde bağımsız mikrobaloncuklarından, kompleks mikro ve nano ölçekli geometrilerin imalatına kadar değişen formlarda yapıların üretilmesine izin vermektedir [131].

Doku mühendisliği açısından mikroakışkan cihazlarla doku iskelelerinin üretimi, organik çözücüler ve biyolojik sistemlere uygun olmayan sert koşulları içeren birçok geleneksel iskele üretim tekniklerine kıyasla düşük maliyet, yüksek verim daha hassas kontrol gibi pek çok önemli avantajı içermektedir [130]. Gaz tabanlı mikroakışkan tekniklerin doku mühendisliğinde son dönemlerdeki en dikkat çekici uygulamaları, istenilen morfolojide, kontrol edilebilir ve eş dağılımda yüksek oranda gözenekli iskele yapıların üretilmesidir [132]. Bu yöntemle üretilen mikro boyutlu tekdüze (*monodispers*) polimerik baloncukların, çapraz bağlama gibi bir katılaştırma işlemi ile bir araya getirilmesi, yüksek derecede düzenli ve düşük gözenek boyut dağılım oranına sahip, gelişmiş üç boyutlu doku matrislerin (film, köpük, hidrojel vb.) üretilmesine olanak sağlamaktadır [133]. Tüm bunların yanında mikroakışkan yöntemler, gaz basıncı, mikrokanal iç çapı ve sıvı çözelti akış hızı gibi koşullarının değiştirilmesiyle farklı boyutlarda mikrobaloncukların oluşumu sayesinde gözenek boyutları mikro ölçekte kontrollü bir şekilde ayarlanabilmesi potansiyeline sahiptir [135,136].

## **2.6 Mikroakışkan Sistemde Mikrobaloncuk Oluşum Mekanizması**

Genel olarak bir mikroakışkan sistemi; sıvı ve gaz akışını sağlayan bir sistem, akışkanların aktığı mikro kanallar, kanalların birleşmesini sağlayan mikroakışkan bir platformdan meydana gelmektedir. Gaz tabanlı bir mikroakışkan sistemde mikrobaloncuk oluşumu birbirleriyle karışmayan dağılan (*dispersed*) ve sürekli (*continous*) faz olarak adlandırılan gaz ve sıvı fazın farklı kesme gerilmeleri sonucu ortaya çıkmaktadır [119]. Şekil 2.9' da mikrobaloncuk oluşumunu şematik olarak gösterilmektedir [136]. Genel olarak fazlar, hacim akış oranı veya uygulanan basıncın kontrol edildiği basınçlı bir akış vasıtasıyla bir mikrokanal içine sürülmektedir. İkinci bir karışmaz sıvı, diğer fazın akışından bağımsız olarak kontrol edilen akış yoluyla

ayrı bir mikrokanal içine sürülür. Mikroakışkan sistemdeki akış, sürekli faz ( $P_s$ ) ve disperse faz ( $P_d$ ) basıncının kontrol edildiği gaz basınç regülatörü kullanarak veya sabit hacimsel akış oranlarını ( $Q_s$  ve  $Q_d$ ) sağlayan şırınga pompaları gerçekleştirilmektedir [119,121,138]. İki akış, mikroakışkan cihaz vasıtasıyla birleşen mikro kanalların bileşim noktasında, dağılan fazın bir 'parmak' (*slug*) veya 'jet' oluşturacak şekilde oluşmasıyla bir araya gelir (Şekil 2.9a). Bu sıvı parmağı (*slug*) büyüdükçe, çevresindeki sürekli faz sıvısının akışını kısıtlayarak kanalı engellemektedir. Sürekli faz sıvısının içinden akabileceği aralıktaki bu azalma, baloncüğün akış aşağısında sürekli fazdaki dinamik basıncın dramatik bir şekilde artmasına yol açar. Artırılmış basınç, arabirimi boynuna iter ve ayrı bir damlacık içine tutturur. Böylece, serbest yüzey kararsızlığına sahip her bir mikrobaloncuk ayrılarak diğer faz içinde tutunur (Şekil 2.9b) [65,81]. İki sıvının sabit akışı, sürekli bir akış halinde eşit boyutlu baloncukların periyodik olarak oluşmasını sağlar. Genel olarak baloncuk oluşumu, sıvı arayüzü deforme etmek için etki gösteren lokal akışkan stresleri ile deformasyona karşı direnç gösteren kılcak basınç arasındaki rekabet ile karakterize edilebilmektedir [138].



**Şekil 2.9:** T-şekilli mikroakışkan cihaz içerisinde baloncuk oluşumunun şematik gösterimi (a) disperse fazın parmak (*slug*) oluşumu (b) baloncuk ayrılması[136].

## 2.7 Mikroakışkan Sistemlerde Baloncuk Oluşumu Üzerine Etki Eden Faktörler

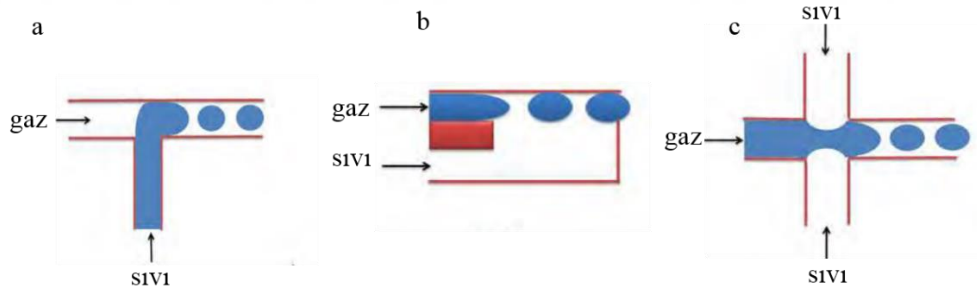
Mikroakışkan sistemde mikrobaloncuk oluşumu üzerine etki eden faktörler, mikroakışkan sistem özellikleri ve polimerik çözelti özellikleri olmak üzere iki grupta incelenmektedir.

## 2.7.1 Mikroakışkan sistemin özelliklerinin baloncuk oluşumu üzerine etkisi

Mikroakışkan sisteme ait olan cihaz geometrisi, kanal çapı ve fazlar arasındaki akış hızları baloncuk oluşumu üzerinde son derece önemli faktörlerdir. Bu faktörlerin mikrobaloncukların çeşitli özelliklerine olan etkisi bu bölümde özetlenmektedir.

### 2.7.1.1 Mikroakışkan cihaz geometrisi

Mikrokanalların birleşme noktasının geometrisi, iki sıvının hacimsel akış hızları ve iki faz arasındaki ara yüzey deformasyonu mikrobaloncukların boyut ve şekilleri üzerinde önemli etkilere sahiptir [136]. Mikro kanal bağlantısının geometrisi, ortaya çıkan sıvı parmağını deforme eden ve bir baloncuk tutan akış alanını belirler. Böylece, arayüz şekli, belirli geometriye kuvvetle bağlıdır [139]. Gaz tabanlı mikroakışkan yöntemler, akış alanının niteliği ile karakterize edilen eş akışlı, çapraz akışlı ve akış odaklı olmak üzere genel olarak üç cihaz geometrisinde olabilir. Şekil 2.10'da bazı mikroakışkan cihazlarda kullanılan geometriler gösterilmiştir [140]. Bu geometrilerin her biri, mikro litre hacimdeki sıvının eş düze ayrılmasını sağlamak için özel bir akış alanı oluşturmaktadır. Bu yöntemlerden bazıları spesifik mikroakışkan geometrilerin gelişimini tetiklemiştir [141].

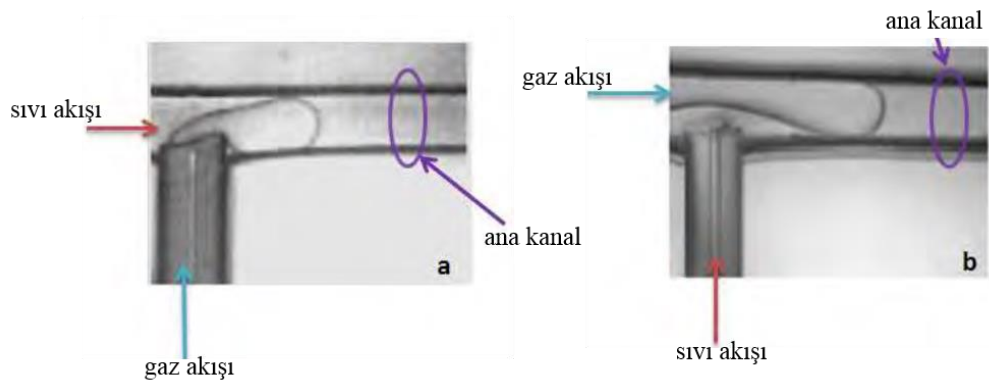


**Şekil 2.10** : Çeşitli mikroakışkan cihaz geometrileri (a) çapraz akışlı mikroakışkan cihaz (b) eş akışlı mikroakışkan cihaz (c) akış odaklı mikroakışkan cihaz [140].

Her kanal konfigürasyonunda, kararlı eş düze köpük oluşumunun mümkün olduğu belirli bir akış hızı aralığı vardır. Cihaz geometrisi bu aralık üzerinde ve dolayısıyla aynı geometri ile elde edilebilecek baloncuk oluşturma frekansları ve boyutları yoğunlukları üzerinde önemli bir etkiye sahiptir [80]. Mikroakışkan cihazlar genellikle litografi, CNC gibi işlemlerle polimetilmetakrilat (PMMA) ve polidimetilsiloksan (PDMS) gibi polimerlerden üretilebilmektedir [121,143,144].

### Çapraz akışlı (T- bileşim) cihaz geometrisi

T-şekilli cihaz geometrisi, mikrobaloncuk oluşumu için iki fazın ana akış kanalına dik olarak verildiği en yaygın cihaz geometrisidir. Bu cihazlarda mikrobaloncuk oluşumu oldukça iyi araştırılmıştır [144]. Mikrobaloncuk oluşumu için, başlangıçta dağınık faz (gaz veya sıvı) ana sıvı kanalına girer ve kanalı tıkayana kadar bir baloncuk büyümeye başlar. Kanalin tıkanması ve basınçtaki gradyan nedeniyle akışkan akışı baloncukta bozulmaya neden olur yukarı akış tarafındaki baloncuk giriş kanalının akış aşağı tarafına geçtiğinde baloncuk kırılması meydana gelir. Ayrılan baloncuk serbest yüzey kararsızlığı nedeniyle küresel bir baloncuk şeklini alır ve diğer faz içerisine tutunur. Sabit sistem koşullarında aynı sürecin tekrarlanması tekdüze mikrodamlacıkların oluşumu ile sonuçlanır [146,147]. Elde edilen mikrobaloncukların çapı, gaz basıncı, sıvı akış hızı ve fiziksel parametreler ve kanal boyutlarının oranı değiştirilerek kontrol edilebilmektedir. Genel olarak, T-bileşim geometrilerindeki akışlar, çapraz akış ya da dikey akış durumlarından birini kullanır. Şekil 2.11’de bu akış durumları gösterilmektedir [147]. Çapraz akış durumunda, dağınık faz dikey kanaldan verilir ve sürekli faz yatay kanaldan akar, bu nedenle baloncukların ayrılması çapraz akış kesme kuvvetinden etkilenir [148]. Dikey akışta ise çapraz akışın aksine, sürekli faz akışı dikey kanaldan ve dağılmış akıştan yatay kanaldan beslenmektedir. Dikey akış tekniği ile karşılaştırıldığında, çapraz akış kırılma tekniği, dar bir aralıkta kabarcıklar üretmektedir. Çapraz akan yırtılma ile üretilen ortalama damlacık boyutu, dikey kesme kuvveti tekniği ile üretilenlerden daha büyüktür [147].



Şekil 2.11 : T-şekilli geometride akış tipleri a) Çapraz akış ve b) Dik akış [147].

### **2.7.1.2 Mikrokanal çapı**

Mikroakışkan sistemlerde baloncuk oluşumu üzerindeki diğer bir etmen mikro kanal boyutudur. T-şekilli cihaz geometrilerinde, baloncuk oluşumu ve boyutu kanalların boyutundan kuvvetli bir şekilde etkilenmektedir. Garstecki ve ark. tarafından yapılan çalışmada, kabarcık büyüklüğünün, bağlantının genişliğine bağlı olduğunu göstermiştir [144]. Bu durumun sebebi, ortaya çıkan baloncukların, ayrılmanın gerçekleşmesi için kanalların birleşim yerini doldurması gerekliliğidir. Parhizkar ve ark. yaptığı bir başka çalışmada, kılcal kanal iç çapının 100, 150 ve 200 µm olarak değiştirilerek değişen mikro kanal çapının kabarcık boyutu üzerinde herhangi bir etkiye sahip olup olmadığını araştırmıştır. Kılcal çapın artırılmasıyla, kabarcık boyutunun arttığı ve daha büyük akış oranları aralığında kabarcık oluşumunun meydana geldiğini saptamışlardır. Çalışmada, mikrokanal boyutu küçüldükçe, mikro kabarcık üretmek için kararlı bir rejim bulmanın zorlaştığı ve yüksek viskoziteli akışkanlar için, daha küçük kılcal damarlardaki kabarcık oluşumu süreci de daha zor hale geldiği bulunmuştur [140]. Çalışmalar, mikrokanal büyüklüğün, yani birleşme noktasının geometrik etkilerinin, kabarcık oluşumu sürecinde göz önünde bulundurulması gereken önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.

### **2.7.1.3 Fazların akış hızı**

Mikroakışkan sistemde üretilen mikrobaloncukların boyutları fazların akış hızlarında önemli derecede etkilenmektedir. Yapılan çalışmalar genel olarak baloncuk boyutunun, belirli bir gaz akış hızı altında, sürekli faz olarak kullanılan sıvı fazın akış hızına bağlı olduğunu göstermektedir [149]. T-şekilli cihaz geometrisinde dikey akış rejiminde, mikrobaloncuk boyutunun, fazların hacimsel akış hızları oranı ( $Q_s/Q_g$ ) arttıkça sürekli faz akış hızı ile doğrusal olarak azalması beklenmektedir. Aynı şekilde sabit bir sıvı faz akış hızında gaz basıncının artması gaz fazın akış hızını arttıracığından, fazların akış hızı oranlarını ( $Q_s/Q_g$ ) azaltmaktadır. Bu durum gaz basıncının artmasının mikrobaloncuk boyutlarını artıracığını göstermektedir [119,140].

### **2.7.2 Mikrobaloncuk oluşumunda çözelti özelliklerinin etkisi**

Polimerik çözelti özelliklerinin bir sonucunu olan arayüzey gerilimi ve viskozite mikrobaloncuk oluşumu ve özellikleri üzerinde önemli bir etken olmaktadır. Bu faktörlerin etkisi özetlenmektedir.

### 2.7.2.1 Arayüzey gerilimi

Mikrometre ölçekteki geniş yüzey alanı / hacim oranı nedeniyle, yüzey etkilerinin rolü makro sistemlere göre daha belirgindir. Bu etkileri en aza indirmek için yüzey aktif maddeler (sümfaktan) düzenli baloncuk oluşumunu sağlamak için sürekli veya dağınmık faza eklenmektedir. Sümfaktanlar damlacık ve baloncuk oluşum işlemlerinde önemli bir rol oynar. Kütleçekimsel ve ataletsel etkiler, mikroakışkan cihazlardaki arayüzey ve viskoz kuvvetlere kıyasla genellikle önemsizdir. Viskoz ile arayüzey kuvvetleri arasındaki oranı tanımlayan kılcal sayının (*Capillary number*) ( $Ca = \mu V / \sigma$ ) yanı sıra, sıvı ıslanma davranışı, akış rejiminin belirlenmesinde merkezi bir rol oynar. Katı yüzeylerin yüzey aktif cisimlerinin varlığında ıslanma davranışı, gaz-sıvı arayüzlerindeki konsantrasyona ve gaz-sıvı-katı temas hattı boyunca konsantrasyona bağlıdır [150]. Temas açısı ve yüzey gerilimi, üç fazlı temas hattının hareketini etkiler ve bu nedenle baloncuk kırılma bölgesindeki kuvvet dengesinde önemli bir etkiye sahiptir ve sonuç olarak baloncuk boyutu ve oluşumu üzerinde de etkili bir faktördür [151]. Yüzey aktif madde molekülleri, arayüzlerde (gaz-sıvı veya sıvı-katı) adsorbe edildiğinde, sıvının dinamik yüzey gerilimi ile sıvı ve katı arasındaki arayüz gerilimi adsorpsiyon seviyesine bağlı olarak azaltılır. Sonuç olarak, düşük enerjili hidrofobik katı-sıvı sistemler için dinamik temas açısı azalır. Sümfaktanlar sadece denge arayüzey gerginliğini azaltmakla kalmaz, aynı zamanda dinamik arayüzey gerginliğini değiştirir, arayüzey gerginlik gradyanlarını indükleyerek ve arayüzey reolojisini değiştirerek dinamik etkiler sağlayabilirler [152].

Dinamik arayüzey gerilimi etkisi, düşük yüzey aktif madde konsantrasyonlarında daha baskın hale gelmektedir. T-şekilli cihaz geometrisinde, çözeltilerde yüzey aktif maddelerin kullanılması ile yüzey aktif madde içermeyen sistemlere kıyasla mikrobaloncuk çapını azaltmaktadır. Eşik değerin altında, sümfaktan konsantrasyonunun sürekli fazdaki rolü baloncuk boyutunda önemli bir etki meydana getirmemektedir. Eşik değerden daha yüksek olduğunda, damlacık büyüklüğü yüzey aktif madde konsantrasyonundan önemli derecede etkilenmektedir. Diğer önemli bir nokta sümfaktan türünün mikrobaloncuk oluşumunu etkilemesidir. Farklı sümfaktanlar, farklı yüzey aktif madde molekülleri özelliklerine sahip olduğundan mikrobaloncuk oluşumu ve davranışı üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Sümfaktan seçimi bu nedenle istenen mikrobaloncuk özelliklerine ulaşmak için oldukça önemlidir [152,154].

### 2.7.2.2 Viskozite

Mikrokananal geometrik özellikleriyle birlikte sürekli ve dağınık fazların viskoziteleri mikrobaloncuk boyutu üzerinde önemli etkiye sahiptir. Mikroakışkan sistemlerdeki düşük Reynold sayıları ( $Re$ ) viskoz etkilerin atalet kuvvetlerinden daha etkili olduğu anlamına gelmektedir. Dolayısıyla akışa karşı gösterilen direnç mikrokanal boyutlarının ve akışkanın viskozitesinin bir fonksiyonudur. Sıvıların küçük baloncuklar veya damlacıklar haline bölünmesi her zaman arayüz kuvvetlerine karşı yapılırlar ve genellikle akışkan hareketine eklenmiş ek bir iş gerektirir. Viskozite, mikrobaloncuk oluşumunun meydana geldiği çalışılan akış oranları aralığında önemli bir rol oynar [149]. Çözeltinin viskozitesinin, belirli bir çözelti viskozitesi için baloncuk oluşumunun meydana geldiği sıvı-gaz akış oranı bölgesini belirlemede önemli bir rol oynadığı görülmüştür [154]. Bununla birlikte, bazen aynı mikrokanalda bile akışın davranışı karmaşık olabilir. Bu yüzden farklı özellikler arasındaki karmaşık etkileşimleri basitleştirmek için çeşitli boyutsuz parametreler kullanılmaktadır. Viskozitelerin baloncuk/damlacık oluşumu üzerindeki etkisi Kılcal sayı ile temsil edilmektedir. Kılcal sayısı ( $Ca = \mu V / \sigma$ ), bir sıvı ve bir gaz arasındaki bir arayüz boyunca veya iki karışmaz sıvı arasındaki bir yüzey boyunca etkiyen viskoz çekme kuvvetlerinin nispi etkisini temsil eder. Genel olarak belirli bir sürekli faz akış hızı değeri için, sıvı faz viskozitesinde artış, kılcal kuvvet üzerindeki kesme kuvvetlerini arttırdığından mikrobaloncuk boyutlarının azalmasına yol açmaktadır [155].

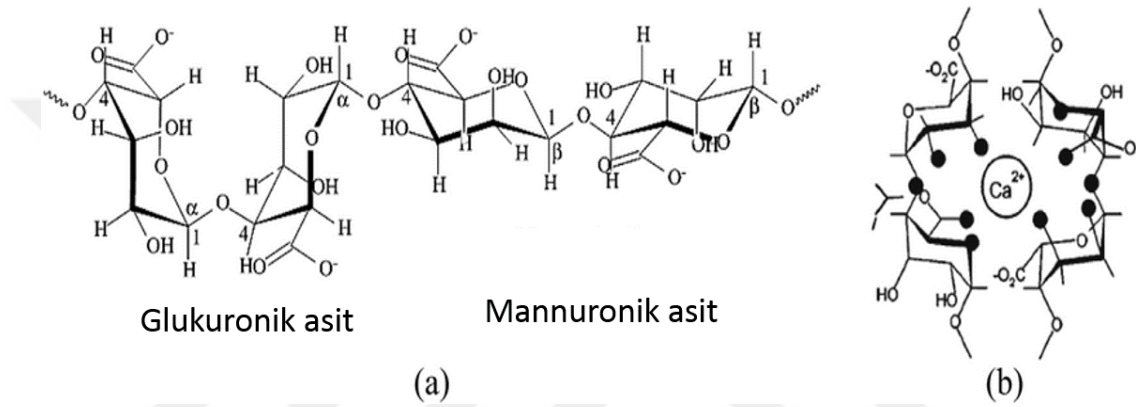
## 2.8 Mikroakışkan Sistemde Film Üretimi İçin Aljinat Biyopolimerinin

### Kullanımı

Gözenekli film üretimi için polimerin seçimi, film özelliklerinin belirlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Polimerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, film üretim yönteminin seçiminden, elde edilen ürünün fiziksel ve kimyasal özelliklerine kadar birçok faktöre etki etmektedir [130]. Mikroakışkan sistemde ise polimerik çözelti seçiminin büyük önem teşkil etmektedir. Polimerin molekül ağırlığı, hidrofilik karakteri gibi temel özellikler birçok mikroakışkan sistem parametresi ile doğrudan ilişkili olduğundan kullanılan polimerin türü diğer yöntemlere göre daha kritik bir önem taşımaktadır [135].

Aljinatlar, tipik olarak kahverengi deniz yosunundan elde edilen, 1,4 bağlı  $\beta$ -D-mannuronik(M) ve  $\alpha$ -L-gluronik(G) olmak üzere iki üronik asit grubu içeren, anyonik

bir polimerdir (Şekil 2.12a). Aljinatlar yüksek biyouyumluluk, düşük toksisite, nispeten düşük maliyet ve jelleşme kolaylığından dolayı birçok biyomedikal uygulama için kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve kullanılmıştır [156]. Aljinatların doku mühendisliği için en önemli özelliği, divalent katyonlar ile nötr koşullarda hidrojeller oluşturabilmesidir. Sulu bir aljinat çözeltisinden hidrojeller hazırlamak için en yaygın yöntem, çözeltiyi iki değerlikli katyonlar ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ) gibi iyonik çapraz bağlama maddeleriyle birleştirmektir. Özellikle  $\text{Ca}^{2+}$  iyonlarının aljinat molekülünde yer alan karboksilat gruplarına bağlanarak üç boyutlu bir ağ meydana getirdiği jel yapılar “yumurta kutusu” (*egg-box*) modeli olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.12b) [157].



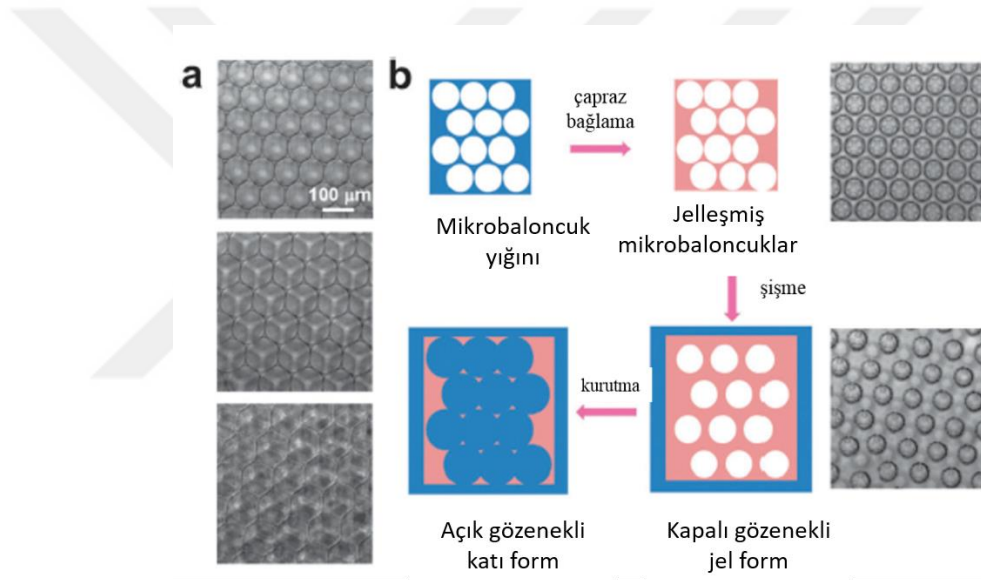
**Şekil 2.12:** Aljinat biyopolimerinin moleküler yapısı (a) Manuronik ve glukuronik asitten oluşan kopolimer yapı (b)Yumurta kutusu modeli [157].

Aljinat hidrojelleri hidrofilik fonksiyonel grupların varlığından kaynaklanan iyi şişme özellikleri gösterir ve hücre büyümesi için hücreler arası matrise benzer bir yapı oluşturur [158]. Aljinat hidrojellerin mekanik mukavemet ve gözeneklilik gibi karakteristik özellikleri G/ M oranlarına, iyonik çapraz bağlayıcının türüne (iki veya çok değerli katyonlar), başlangıç aljinat solüsyonunun konsantrasyonuna ve viskozitesine bağlıdır [157]. Tüm bu ilgi çekici özelliklerinden dolayı aljinatlar mikroakışkan sistemlerde iskele üretimi için en çok çalışma yapılan biyopolimerdir.

## 2.9 Mikroakışkan Sistemde Doku İskele Film Yapılarının Üretimi

Mikro akışkan sistemde iskele üretimi genel olarak iki aşamada gerçekleştirilir. İlk aşama, bir mikroakışkan cihaz vasıtasıyla mikrobaloncuk üretimini, ikinci aşama ise bu mikrobaloncukların bir katılma prosesiyle birleştirilerek gözenekli üç boyutlu köpük-jel benzeri yapıların oluşturulmasını içermektedir (Şekil 2.13) [88,129]. İlk aşamada üretilen mikrobaloncuklar iskelenin gözenekli yapısının özelliklerinin

belirleyen kilit faktördür. İskele gözenek boyutu ve boyut dağılımı büyük oranda mikrobaloncukların özelliklerine bağlıdır ve bunula karakterize edilmektedir [159]. Mikroakışkan sistemde mikrobaloncuk oluşumunu etkileyen tüm faktörler elde edilen iskelenin özellikleri üzerinde de etkili olmaktadır. Bu durum iskele üretimi için esnek bir yaklaşım sunmasının yanında stabil bir üretim için mikroakışkan sitem parametrelerinin çok iyi belirlenmesini gerektirir [103]. Dolayısıyla, çeşitli formlarda (film, hidrojel) iskele yapılarının üretimi için gerekli bir ön adım, mikrobaloncuklardan yüksek oranda düzenli bir köpük üretilmesinin mümkün olduğu akış rejimlerinin tanımlanmasıdır. Bunun asıl amacı sıvı-gaz hacim fraksiyonun ayarlanması ile ilgilidir. Maksimum gözeneklilik için gaz sıvı fraksiyonun oldukça iyi belirlenmesi gerekmektedir [140].



**Şekil 2.13:** Mikrobaloncuklardan gözenekli iskele yapılarının oluşumunun şematik gösterimi(a) polimerik mikrobaloncuklar (b) mikrobaloncuk jelleştirilmesi ile açık gözenekli yapı oluşumu [128].

Yüksek oranda düzenli gözenekli iskele yapılarının üretimi için ikinci aşama ise katılaştırma prosesinin önemidir. Mikrobaloncukların ömrü dakika mertebelerinde süre ile karakterize edilebilir. Mikrobaloncuk stabilizasyonun, elde edilen iskele hacmi gibi önemli sonuçları vardır. 3B hücre kültürü substratlarının üretimi gibi bazı pratik uygulamalar için, mikrobaloncuk stabilitesi önemli bir sorunu teşkil etmemektedir, çünkü gereken mikrobaloncuk miktarı az (yaklaşık 1 ml kadar) miktardadır. Bu hacim, önemli ölçüde kararsızlaşma olaylarının başlamadığı çok kısa bir sürede elde edilebilmektedir. Ancak implante edilebilir bir yapının üretimi için daha fazla miktarda baloncuğa ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte, mikrobaloncuğun sürekli

fazının hızlı bir şekilde sabitlenmesi, düzenli ve sıralı yapısının korunması için bir çapraz bağlama stratejisi gereklidir. Bu konuda farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. En çok kullanılan katılaştırma prosesi, elde edilen mikrobaloncuk yığına çapraz bağlama çözeltisi eklenerek jelleştirilmesidir. Jelleştiren mikrobaloncuklar dondurularak kurutulup gözenekli yapının oluşumu sağlanır. Ancak bu yöntem lokal fiziksel çapraz bağlanma derecesini etkilediği için gözenek boyutlarında değişimlere yol açmıştır [160]. Farklı bir yaklaşım, mikrobaloncuk bir şişenin içinde toplanmasından ve sıvı azot buharlarında dondurulmasıdır. Dondurularak kurutulmuş mikrobaloncuklar, çapraz bağlayıcı çözeltisine yerleştirildiğinde, örnek içinde çapraz bağlayıcının homojen bir şekilde dağılmasını sağlayan bir sünger görevi görmüştür [161].

## **2.10 Mikroakışkan Sistemde İskele Filmlerin Üretimi ile İlgili Çalışmalar**

Chung ve ark., gaz fazı olarak azot ve sıvı faz olarak aljinat kullandıkları eş akışlı mikropipet bazlı mikroakışkan cihazda baloncuk oluşumunu ve doku mühendisliği iskelesi olarak köpük üretimini araştırmışlardır. Elde edilen mikrobaloncukları  $Ca^{+2}$  ile çapraz bağlayıp, bir gaz giderme prosesiyle yüksek oranda tekdüze gözenekli yapının oluşmasını sağlamışlardır. Kondrosit kültüründe kullanılan iskelenin bir aydan fazla hücre canlılığı gösterdiği gözlemlenmiştir [162].

Wang ve çalışma grubu aynı yöntemle elde edilen aljinat doku iskeleleriyle toksisite, poliferasyon, şişme ve mekanik testleri içeren daha kapsamlı araştırmalar yapmıştır. Mikroakışkan iskeleler, kırıldak rejenerasyonu için platform görevi görüp görmediklerini değerlendirmek için domuz kondrositlerinin kültüründe test edilmiştir. İskeleler, köpüğün sıvı fazında kullanılan düşük aljinat konsantrasyonuna rağmen, iyi mekanik özelliklerin temeli olan çok düzenli bir bal peteği morfolojisi sunmuştur [163].

Aljinatın gözenekli yapılar oluşturmaya yönelik bir diğer çalışma ise Elsayed ve ark., tarafından yapılmıştır [164]. T-şekilli bir mikroakışkan cihaz ile ürettikleri aljinat mikrobaloncuları cam bir slayt üzerinde biriktirerek gözenekli film oluşturma potansiyelini araştırmışlardır. Gaz basıncı ve konsantrasyon gibi parametreleri değiştirerek filmlerin gözenek boyutlarına etkisini incelemişlerdir. Yüksek oranda düzenli gözenek yapısı mikrobaloncuk patlama prosesiyle sağlanmıştır. Ancak bu çalışmada yapıların karakterizasyonları kapsamlı olarak incelenmemiştir.

Colosi ve ark., mikroakışkan akış odaklı bir cihazla yöntemle ürettikleri polivinil alkol (PVA) köpük doku iskelesinin, gaz köpüklendirme yöntemiyle üretilene göre çok daha dar gözenek boyutu dağılımı olduğunu saptamışlardır [165]. Mikroakışkan yöntemle üretilen PVA doku iskelesinin gözenek boyutları 130 µm ile 200 µm arasında değişirken, gaz köpüklendirme ile elde edilen iskelenin gözenek boyutları 75 µm ile 500 µm arasında geniş bir dağılım göstermiştir.

Diğer bir çalışma mikroakışkan iskelelerin farklı hücre tiplerinde meydana getirdiği morfolojik değişimleri incelemek için yapılmıştır. Lin ve diğ. gözenek boyutunun, tek biçimli küresel gözeneklerden oluşan jelatin yapı iskelelerinde kültüre edilen üç ayrı hücre tipi (epitelyal, miyoblast, fibroblast) üzerindeki etkisini incelemiştir [128]. İskelelerde her gözenek neredeyse aynı mekanik özellikte bir mikro ortamı ve ideal bir kültür modeli sağlamış, hücreler uygun morfolojik ve fizyolojik özellikler sergilemiştir. Epitel hücreleri kist benzeri yapılar oluşturmuş ve gözeneklerin içinde polarize olmuş, miyoblastlar bir boru şeklindeki yapıyı benimsemiş ve miyotüplere kaynaşmış ve fibroblastlar çok çeşitli morfolojiler sergilemiştir.

Lo ve ark., ortalama gözenek büyüklüğünün artmasıyla karakterize edilen, jelatin iskelede stromal kök hücrelerin osteogenezine doğru farklılaşmasını izlemişlerdir [127]. İskelelerin 100 ve 150 µm gözenek çapının, hücrelerin osteojenik farklılaşmaya yönelten en büyük etken olduğunu gözlemlemişlerdir.

Literatürde gerçekleştirilen bu çalışmalarda, mikroakışkan sistemlerle gözenekli yapı iskelelerin üretimi için etkili şekilde sağlanmasına rağmen elde edilen yapıların kimyasal ve fiziksel karakterizasyonları detaylı olarak incelenmemiştir. Bu yapıların detaylı karakterizasyonların yapılması ve elde edilen iskelelerin malzeme özellikleri ile ilişkilendirilmesi gerekmektedir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde T-şekilli mikroakışkan sistem ile gözenekli film yapılarının üretiminde ve karakterizasyonlarında kullanılan materyaller ve yöntemler hakkında bilgi verilmektedir.

#### 3.1 Materyal

Film ve hidrojel doku iskelesi üretimi için çalışmada kullanılan sodyum aljinat (SA) ve hidrojene L- $\alpha$  Fosfatidilkolin, yüzey aktif madde olarak kullanılan polietilen glikol 40 stereat (PEG40S) ve hidrojel üretimi için çapraz bağlayıcı olarak kullanılan kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan tüm malzemeler Sigma-Aldrich firmasından alınmıştır. Çalışmalarda kullanılan deiyonize su Millipore-Direct-Q 3 UV cihazından temin edilmiştir.

#### 3.2 Yöntem

Çalışmada mikroakışkan sistem ile sodyum aljinatın gözenekli film ve hidrojel film iskele yapılarının oluşturulmasında kullanılan yöntemler açıklanmıştır.

##### 3.2.1 Polimerik çözeltilerin ve çapraz bağlama çözeltisinin hazırlanması

Doku iskelesi malzemesi olarak kullanılacak sodyum aljinat uygun miktarda hassas terazide (*Shimadzu/ATX224*) tartılarak üzeri belirlenen hacme kadar deiyonize saf su ile tamamlanmış ve manyetik karıştırıcı (*Stuart/UC 152*) üzerinde tamamen çözülene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra yüzey aktif madde olarak kullanılacak PEG40S, sodyum aljinat çözeltisine eklenerek ve bir süre daha (yaklaşık 1 saat) karıştırılarak tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Fosfolipitin gerekli olduğu durumlarda çözeltiye son olarak fosfolipit eklenmiş ve tamamen çözünmesi için 4 saat karıştırılmıştır. Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki polimerik çözeltiler Çizelge 3.1 'de

gösterilmiştir. Hidrojel film üretimi için kullanılan CaCl<sub>2</sub> çapraz bağlayıcı çözeltisi ise %1 (w/v) konsantrasyonunda deiyonize su ile hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.1.** Mikrobaloncuk eldesi için kullanılan aljinat/PEG40S ve aljinat/lipit/PEG40S çözeltilerinin konsantrasyonu.

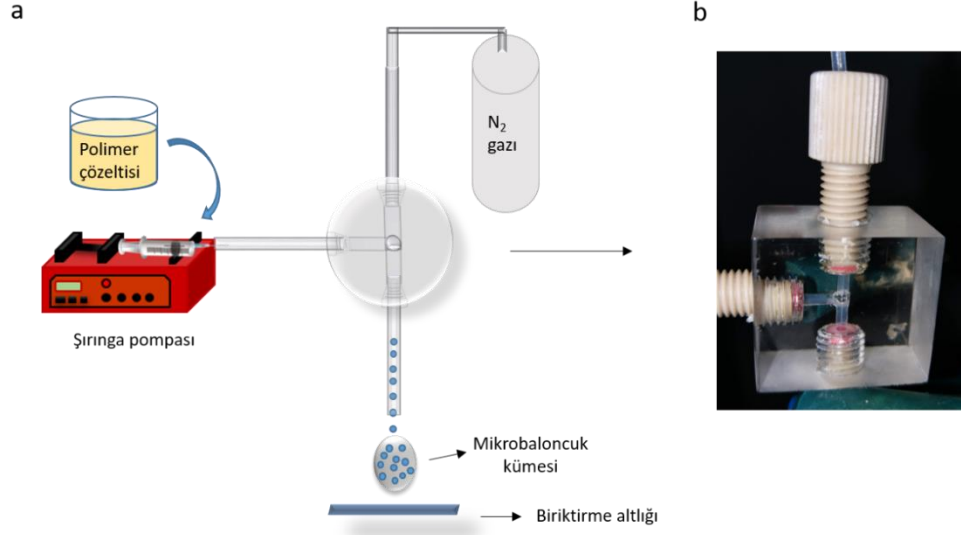
Çözelti	Aljinat Konsantrasyonu (% w/v)	PEG40S Konsantrasyonu (% w/v)	Fosfolipit Konsantrasyonu (% w/v)
1	0,5	0,25	-
2	1	0,25	-
3	1	0,5	-
4	1	0,75	-
5	1,5	0,25	-
6	1	0,25	0,25

### 3.2.2 Polimerik çözeltilerin karakterizasyonu

Polimerik çözeltilerin yüzey gerilimleri optik temas açısı yüzey gerilimi ölçüm cihazıyla (*Attension/Theta Lite*) ve viskoziteleri Reometre (*Anton Paar*) cihazı ile ölçülmüştür. Tüm analizler oda sıcaklığında (22 °C) gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.3 T-bağlantılı mikroakışkan sistemin kurulumu ve sodyum aljinat mikrobaloncukların üretimi

Çalışmada mikrobaloncuk üretimi için T-bağlantılı mikroakışkan cihazlı gaz tabanlı bir mikroakışkan sistemi kullanılmıştır. Deney düzeneği şeması Şekil 3.1'de gösterilmektedir. T-bağlantılı mikroakışkan cihazı, CNC işleme ile tasarlanmış ve polimetilmetakrilat (PMMA) polimerinden üretilmiştir. Cihazın, bir ucu polimerik çözelti beslemesinin sağlanması için yüksek hassasiyete sahip şırınga pompasına (*Pump 11 Elite, Harvard*), diğer ucu ise azot (N<sub>2</sub>) gazı girişine izin veren birbirine dik 200 µm çapında iki floro etilen polipropilen (FEP) iki mikrokanalı ve mikrobaloncuk çıkışını sağlayan yine 200 µm çapında FEP bir çıkış mikrokanalı bulunmaktadır. Sürekli faz olarak farklı konsantrasyonlarda aljinat/PEG40S/fosfolipit çözeltisi ve dağılan (*dispersed*) faz olarak N<sub>2</sub> gazı kullanılmıştır. Mikroakışkan cihaz vasıtasıyla birleştirilen mikrokanalların birleşim noktasında sıvı ve gaz fazın arayüzey gerilimleri sonucu oluşan mikron boyutlu baloncuklar film üretimi için çıkış kanalının altında bulunan bir cam slayt üzerinde tek bir tabaka olacak şekilde toplanmıştır. Aljinat-PEG40S ve aljinat-PEG40S-fosfolipit çözeltileri şırınga pompasına bağlı 10 ml' lik plastik şırıngalar (*Becton Dickinson*) kullanılarak sabit bir akış hızında, azot gazı ise bir basınç düşürücü vasıtasıyla sabit bir basınçta sisteme beslenmiştir.



**Şekil 3.1:** (a) Deney düzeneğinin şematik gösterimi (b) T-şekilli PMMA mikroakışkan cihazı.

Mikrobaloncuk boyutu üzerine akış hızının ve gaz basıncının etkisi  $50-100 \mu\text{l dk}^{-1}$  değişen hızlarda ve 0,5 ve 0,8 bar basınç değerlerinde incelenmiştir.

### 3.2.4 Elde edilen sodyum aljinat mikrobaloncukların boyut ve boyut dağılımının belirlenmesi

T-şekilli mikroakışkan cihaz vasıtasıyla üretilen mikrobaloncukların çapları ve boyut dağılımı, optik mikroskop (*Nikon-Eclipse LV 150N*) vasıtasıyla elde edilen görüntüleri ile belirlenmiştir. Mikrograflar, 100X büyütme ile elde edilmiş, mikrobaloncuk çapları ImageJ programı kullanılarak hesaplanmıştır. Mikrobaloncukların yüzde polidispersite oranı (PDI) denklem 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$PDI(\%) = \frac{\sigma}{d_{ort}} \times 100 \quad (3.1)$$

PDI: polidispersite yüzdesi

$\sigma$ : ortalama mikrobaloncuk çapının standart sapması

$d_{ort}$ : ortalama mikrobaloncuk çapı

### 3.2.5 Sodyum aljinat gözenekli film yapılarının üretimi

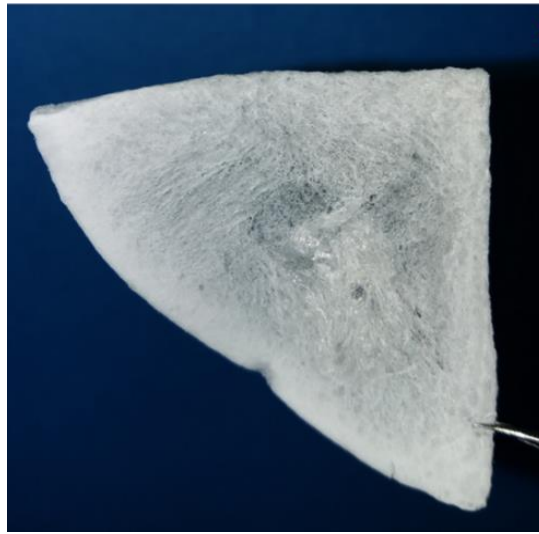
Farklı konsantrasyonlardaki aljinat, PEG40S ve lipit çözeltilerinden elde edilen mikrobaloncuklar, 76x26 mm boyutlarında bir cam altlık üzerinde toplanmış ve oda sıcaklığında ( $23 \text{ }^\circ\text{C}$ ) gözenekli film oluşumu için 24 saat boyunca kurutulmaya bırakılmıştır.



**Şekil 3.2:** Cam altlık üzerinde toplanmış ve film oluşumu için kurutulmaya bırakılmış mikrobaloncuklar.

### 3.2.6 Aljinat hidrojel film yapılarının üretimi

Aljinat hidrojellerinin üretimi için kullanılan metot film üretiminden farklı olarak mikrobaloncukların çapraz bağlayıcı olarak kullanılan  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi ile jelasyonunu içermektedir. Bunun için mikrobaloncuklar dört bölmeli petri kaplarında belli bir miktarda biriktirildikten sonra üzerine yaklaşık 3 ml %1'lik  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi bir şırınga vasıtasıyla yavaş bir şekilde eklenmiştir. Çapraz bağlamanın gerçekleşmesi için aljinat hidrojelleri 24 saat +4 °C'de  $\text{CaCl}_2$  çözeltisinde bekletilmiştir. Daha sonra hidrojeller 3 kez saf su ile yıkanmış ve 24 saat boyunca liyofilizatörde (*Toros/TRS 2/2V*) kurutulmuştur.



**Şekil 3.3:** Dondurularak kurutulmuş kuru hidrojel film görüntüsü.

### 3.2.7 Elde edilen gözenekli film yapılarının mikro yapı analizleri

Sodyum aljinat gözenekli filmlerin ve hidrojel filmlerin mikro yapıları, 24 saat liyofilizatörde kurutulup yüzeyleri altın-paladyum tabakası ile 30 saniye kaplandıktan sonra bir Taramalı Elektron mikroskobu (*The Quanta 200, FEI*) ile incelenmiştir. Örnek görüntüleri yüksek vakum altında ve 10 kV'de farklı büyütmelerde alınmıştır.

### 3.2.8 Elde edilen hidrojel film yapıların kimyasal yapılarının analizi

Film ve hidrojel yapıların kimyasal kompozisyondaki değişiklikler bir Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi cihazı (FT-IR) (*Bruker Optics Tensor37*) ile incelenmiştir.

### 3.2.9 Elde edilen hidrojel film yapıların kristal yapılarının analizi

Aljinat hidrojel filmlerin kristal yapı özellikleri X-Işını Kırınım yöntemi (XRD) (*Bruker AXS/Discovery D8*) ile incelenmiştir.

### 3.2.10 Elde edilen hidrojel filmlerin termal özelliklerin analizi

Üretilen Filmlerin termal özellikleri Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) (*TA/Discovery DSC250*) cihazı kullanılarak incelenmiştir. Analizler, kuru haldeki örnekler ile 10 °C/dakika ısıtma hızında, N<sub>2</sub> ortamında -80 den 250 °C sıcaklığına kadar ısıtılmış ve camsı geçiş sıcaklıkları (T<sub>g</sub>) belirlenmiştir.

### 3.2.11 Elde edilen hidrojel filmlerin in vitro su alım kapasitesinin belirlenmesi

Hidrojellerin su alım kapasitesini belirlemek için 23 °C oda koşullarında distile su içerisinde şişme testi yapılmıştır. Hidrojeller eşit ağırlıkta tartılarak, iskelelerin kuru ağırlığı (W<sub>D</sub>) kaydedilmiş ve 5 ml distile su içerisinde şişmeye bırakılmıştır. Belirli zaman aralıklarında hidrojeller su içerisinden çıkarılıp yüzey suyu filtre kâğıdı ile uzaklaştırılarak ıslak ağırlıkları (W<sub>w</sub>) ölçülmüştür. Şişme oranı, Denklem 3.2 kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = \frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100 \quad (3.2)$$

W<sub>D</sub>: hidrojel kuru ağırlığı

W<sub>w</sub>: hidrojinin ıslak ağırlığı

### 3.2.12 Elde edilen hidrojel filmlerin Nötral Kırmızısı Alım (NKA) testi ile sitotoksitesinin belirlenmesi

Elde edilen farklı formülasyondaki hidrojellerin hücre canlılığına ve proliferasyonuna etkileri nötral kırmızısı alım (NKA) sitotoksite testi ile değerlendirilmiştir. Çalışmada Beas-2b (insan bronş epitel hücre hattı) kültürü kullanılmıştır. Hücreler 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür kaplarında %10 fetal sıgır serumu 50 ünite ml<sup>-1</sup> (besi yeri içindeki oran) penisilin ve streptomisin içeren RPMI besi ortamı kullanılarak, 37 °C'deki %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde (*Panasonic MCO-18AL-PE*) çoğaltılmıştır. Hücreler yüzeyden %0.01 trypsin/10 mM EDTA ile kaldırılmış, santrifüjlenip hücre ekimi için tekrar süspanse edilmiştir. Süspanse edilen hücreler seyreltilerek 96 kuyucuklu plakalara çoklu pipetler kullanılarak her bir kuyucukta 200 µl hacim içerisinde 1x10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Plakalar etüve kaldırılarak 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmış, hücrelerin kuyucuklar içinde tutunarak çoğalmaları sağlanmıştır. Hidrojel numuneleri hücre kültürü için kullanılmadan önce 1 saat UV ışık ile sterilize edilmiştir. Numuneler falkon tüplerine alınarak üzerlerine 3,3 mg/ml hidrojel konsantrasyonunda olacak şekilde serum içermeyen RPMI besiyeri eklenmiştir ve 72 saat boyunca 37 °C bekletilmiştir. Bu süre hidrojel numunelerinden herhangi bir sitotoksik sızıntı (*leaching*) görülmesi için yeterli bir süredir. 72 saat sonunda hidrojel yapılar besiyerinden çıkarılmış ve hücre kültürü ile muamelesi için bekletilmiştir. 96'lı plaklardaki hücrelerin 24 saat sonra besiyerleri hidrojel numunelerinin bekletildiği besi yerleriyle değiştirilmiştir. Besi yerleri eklenmeden önce uygun miktarlarda antibiyotik ve serum eklenmiş ve hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda plak içindeki test maddesini içeren besiyerleri boşaltılmış ve önceden hazırlanmış nötral kırmızısı (*neutral red*) çözeltisinden her bir kuyucuğa 200 µl eklenerek 3 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda boya ortamdaki uzaklaştırılmış ve kuyucuklar PBS (Fosfat tamponu) ile yıkayıp, plakalar kurutulmuştur. Kuyucuklara 200 µl %50 metil alkol, % 1 glasiyel asetik asit ve % 49 distile su karışımından oluşan sabitleyici çözelti eklenmiş, 20 dakika süre ile plaka çalkalayıcı üzerine çalkalanmıştır. Son olarak 96 kuyucuklu kültür kaplarında, mikropilaka okuyucu ile 540 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmış (*Epoch*) ve çözeltilerin optik yoğunlukları (OD) belirlenmiştir. Kültür ortamında hidrojel numunelerinin bekletildiği besi yeri ilave edilmeden inkübe edilen hücreler hücre canlılığının ölçülmesinde kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Pozitif kontrol olarak yüksek derece toksik olduğu bilinen Triton maddesi kullanılmıştır. Hücre canlılığı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüzde olarak ifade edilmiştir.



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada gözenekli film ve hidrojel iskele yapılarını oluşturmak için T-şekilli bir mikroakışkan sistemde üretilen mikrobaloncuklar kullanılmıştır. Çeşitli mikroakışkan sistem parametrelerinin ve çözelti özelliklerinin mikrobaloncuk boyutlarına ve boyut dağılımlarına etkisi incelenmiş, daha sonra ise bu mikrobaloncukların hem cam bir slayt üzerinde biriktirilip oluşturduğu film yapısı hem de çapraz bağlama çözeltisi olarak kullanılan  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi ile jelleştirilmiş hidrojellerin mikro yapıları incelenmiştir.

### 4.1 Elde Edilen Polimerik Çözeltilerin Karakterizasyonu ve Özellikleri

Mikroakışkan sistemde akışkana ait özelliklerin mikrobaloncuk oluşumu üzerine etkisi bilinmektedir [141]. Akışkana ait özelliklerden en önemlileri viskozite ve yüzey gerilimidir. Çizelge 4.1 mikrobaloncukları üretmek için kullanılan çözeltilerin yüzey gerilimlerini ve viskozitelerinin göstermektedir.

**Çizelge 4.1:** Mikrobaloncuk üretimi için kullanılan aljinat/PEG40S ve aljinat/PEG40S/lipit çözeltilerinin viskozite ve yüzey gerilimleri.

Çözelti	Aljinat Konsantrasyonu (% w/v)	PEG40S Konsantrasyonu (% w/v)	Fosfolipit Konsantrasyonu (% w/v)	Yüzey Gerilimi (mN/m)	Viskozite (mPa s)
1	0,5	0,25	-	51,6±0,11	6,94±0,02
2	1	0,25	-	56,1±0,25	14,5±0,02
3	1	0,5	-	54±0,43	15 ±0,03
4	1	0,75	-	51,9±0,13	16,2±0,01
5	1,5	0,25	-	57,4±0,19	31,7±0,01
6	1	0,25	0,25	49,6±0,11	16 ±0,04

±: standart sapma

1, 2 ve 5 numaralı çözeltilerin viskozite incelendiğinde viskozitenin aljinat konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı Çizelge 4.1’de görülmektedir. 2, 3 ve 4 numaralı çözeltilerin viskoziteleri ise aynı oranda aljinat içermelerine rağmen sürfaktan olarak kullanılan PEG40S’ in konsantrasyonuna bağlı olarak az miktarda artmaktadır. 2 ve 6 numaralı çözeltiler karşılaştırıldığında, lipit eklenmesinin viskozitede bir miktar artış meydana getirdiği görülmektedir. Bu durum kullanılan polimerin çözeltide

viskozitenin asıl belirleyici unsuru olduğunu doğrulamaktadır [166]. PEG40S ve lipit ilavesinin asıl önemli etkisi polimerik çözeltilerin yüzey gerilimleri üzerindedir. Çizelge 4.1 incelendiğinde aljinat oranı sabitken PEG40S oranının artması beklenildiği gibi yüzey gerilimini azaltmıştır. Yüzey geriliminin en az olduğu durum ise lipitin kullanıldığı 6 numaralı çözeltilerdir. Çözeltiye sürfaktan ile aynı oranda lipit eklenmesinin viskozitede büyük bir artış olmadan yüzey geriliminde önemli bir azalma meydana getirdiği görülmektedir.

#### 4.2 T-Şekilli Mikroakışkan Cihazla Mikrobaloncuk Oluşumu

Karakterizasyonları tamamlanan çözeltiler şırınga pompası ile sisteme beslenmiştir. Yüksek saflıktaki azot gazı ise bir basınç düşürücü vasıtasıyla sisteme verilmiştir. Cihazın birleşme noktasında oluşan mikrobaloncuklar cihazın çıkış kanalındaki FEP kanalın ucunda kümelenmiştir. Şekil 4.1 mikroakışkan cihazı ile elde edilen mikrobaloncukların çıkış kanalında kümelenmesi gösterilmektedir. Yer çekiminin etkisiyle oluşan mikrobaloncuk kümesi altlığa düşerek biriktirilmiştir.



Şekil 4.1: Mikrobaloncuk kümesi.

#### 4.3 Mikrobaloncuk Karakterizasyonları ve Özellikleri

T-şekilli mikroakışkan vasıtasıyla çeşitli konsantrasyonlarda, sıvı faz akış hızlarında ve gaz basıncında üretilen mikrobaloncukların optik mikroskop kullanılarak boyutları

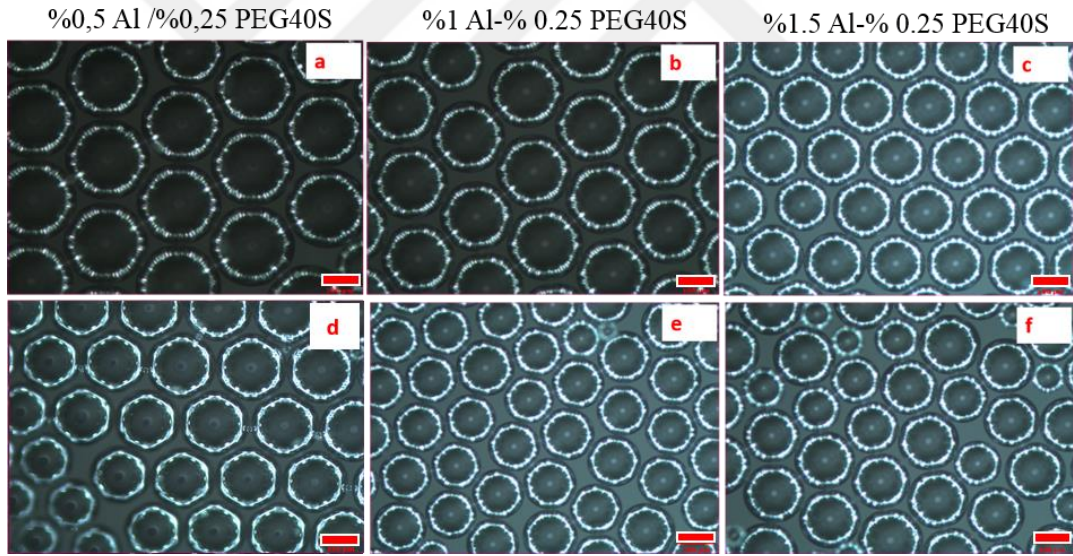
ve boyut dağılım oranları hesaplanmıştır. İşlem parametrelerin, mikrobaloncukların boyutlarına, boyut dağılım oranı ve stabilitesine etkileri incelenmiştir.

### 4.3.1 Çözelti konsantrasyonun mikrobaloncuk özelliklerine etkileri

Bu bölümde farklı konsantrasyonlarda aljinat, PEG40S ve lipit içeren çözeltiler kullanılarak mikrobaloncuklar üretilmiştir. Çözelti özelliklerinin elde edilen mikrobaloncukların özelliklerine etkisi incelenmiştir.

#### 4.3.1.1 Polimer konsantrasyonunun mikrobaloncuk boyutuna etkisi

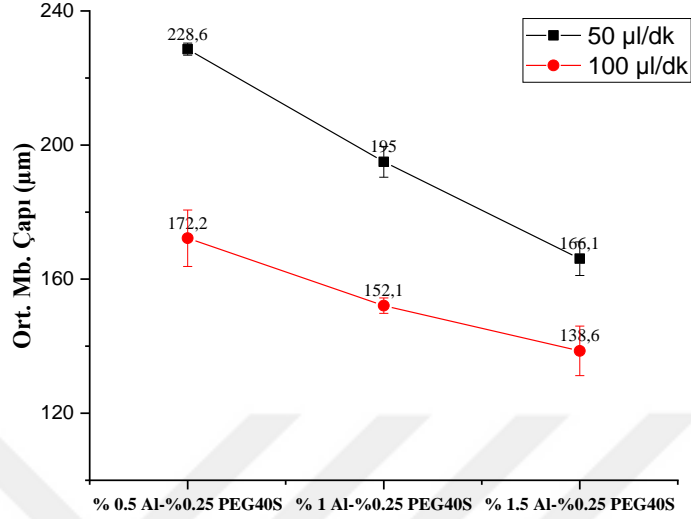
Mikrobaloncuk oluşumuna aljinat konsantrasyonunun etkisini incelemek için 1, 2 ve 5 numaralı çözeltiler kullanarak 0,5 bar sabit gaz basıncında 50 ve 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  iki farklı akış hızında çalışılmış ve her iki akış hızı için mikrobaloncukların boyutları ölçülmüş ve boyut dağılımları hesaplanmıştır. Şekil 4.2 mikrobaloncuklara ait mikrografları göstermektedir.



**Şekil 4.2:** Farklı aljinat konsantrasyonlarındaki çözeltilerden sabit gaz basıncında (0,5 bar) elde edilmiş mikrobaloncukların optik mikroskop görüntüleri (a) (b) (c) 50  $\mu\text{l dk}^{-1}$  (d) (e) (f) 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızlarında (büyütme 100X, 100  $\mu\text{m}$ ).

Şekil 4.3 ortalama mikrobaloncuk çaplarının aljinat konsantrasyonuna bağlı değişimini göstermektedir. Basınç sabitken her üç aljinat konsantrasyonu için akış hızlarının artması mikrobaloncuk boyutlarının azalmasına yol açmıştır. Sabit gaz basıncı ve sabit akış hızında sıvı fazın aljinat konsantrasyonunun artması ortalama mikrobaloncuk çapının azalmasına, polidispersitesinin ise artmasına yol açmaktadır. En büyük ortalama mikrobaloncuk çapı %0,5 aljinat içeren mikrobaloncuklarda 50  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında 0,8 PDI değeri ile yaklaşık 228,6 $\pm$ 1,8  $\mu\text{m}$  olarak bulunmuştur. Aljinat

konsantrasyonun üç kat artması  $50 \mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında ortalama mikrobaloncuk çapını %27,3,  $100 \mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında ise %19,51 azalmaya yol açmıştır.



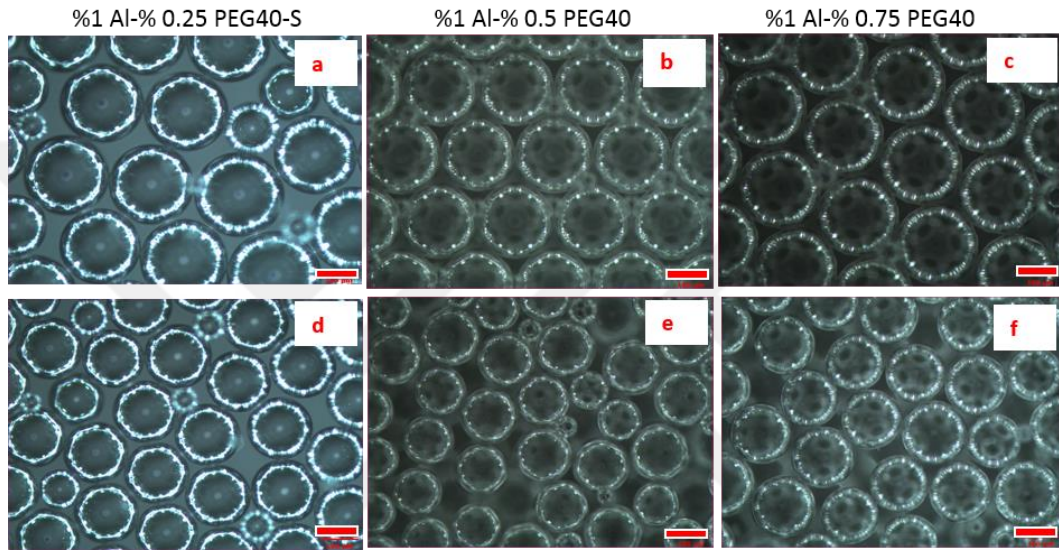
**Şekil 4.3:** Elde edilen mikrobaloncukların ortalama çaplarının aljinate miktarına bağlı değişimi.

Polimer konsantrasyonunun artmasının neden olduğu etkinin esasen artan viskozite değeri olduğu düşünülmektedir. Sürekli faz viskozitesindeki artış ( $\mu_s$  artması), fazların viskozite oranını arttırdığından mikrobaloncuk oluşumu için gereken kayma gerilimi azalmaktadır [155]. Buna bağlı olarak artan arayüzey gerilimi daha yüksek akış hızlarında mikrobaloncuk oluşumuna neden olur. Viskoziteden kaynaklı sıvı fazın artan yüzey gerilimi aşılarak mikrobaloncuk oluşumu için daha yüksek gaz faz hacimsel akış oranı dolayısıyla daha fazla gaz basıncı gerekmektedir. Sabit gaz basıncında ve sıvı faz akış hızında akışkan viskozitesindeki artış gaz-sıvı arayüzey gerilimini arttırdığından mikrobaloncuk oluşumunu zorlaştırmaktadır ve bu durum daha küçük boyutlu mikrobaloncuklarla sonuçlanmıştır [140].

#### 4.3.1.2. Sürfaktan (PEG40S) konsantrasyonunun mikrobaloncuk boyutlarına etkisi

Mikrobaloncuk oluşumuna sürfaktan konsantrasyonunun etkisini incelemek için 2, 3 ve 4 numaralı çözeltiler kullanarak 0,8 bar sabit gaz basıncında  $50$  ve  $100 \mu\text{l dk}^{-1}$  iki farklı akış hızında çalışılmış ve her iki akış hızı için mikrobaloncukların boyutları ölçülmüş ve boyut dağılımları hesaplanmıştır. Şekil 4.4 mikrobaloncuklara ait mikrografları

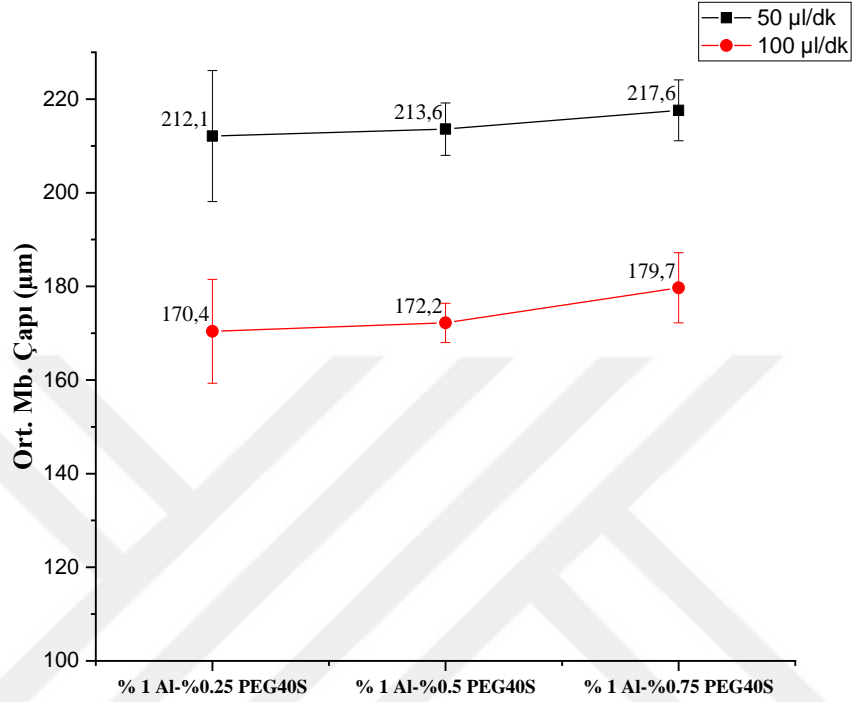
göstermektedir. Şekil 4.5'teki grafik ortalama mikrobaloncuk boyutlarının PEG40S konsantrasyonuna bağlı değişimini göstermektedir. Grafik incelendiğinde, basınç ve PEG40S konsantrasyonları sabitken sıvı fazın akış hızlarının arttırması beklenildiği gibi tüm konsantrasyonlar için mikrobaloncuk boyutlarının azalmasına yol açmıştır. En yüksek ortalama mikrobaloncuk çapı değeri  $50 \mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızı için 3,02 PDI değeri ile  $217,6 \pm 6.5 \mu\text{m}$  olarak %0,75 PEG40S içeren çözeltide elde edilmiştir. Genel olarak sabit sistem koşullarında çözelti içinde PEG40S oranının yüzdece arttırılması mikrobaloncuk boyutlarında az miktarda bir atış meydana getirmiştir.



**Şekil 4.4:** Farklı PEG40S konsantrasyonlarındaki çözeltilerden sabit gaz basıncında (0,8 bar) elde edilmiş mikrobaloncukların optik mikroskop görüntüleri (a) (b) (c)  $50 \mu\text{l dk}^{-1}$  (d) (e) (f)  $100 \mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızlarında (büyütme 100X,  $100 \mu\text{m}$ ).

Çalışmada kullanılan PEG40S iyonik olmayan yüzey aktif maddedir ve göreceli olarak büyük hidrofilik gruplara sahiptir. Bu yüzey aktif cisimlerinin konsantrasyonunun ağırlık olarak %0,25 den %0,75 e yükseltilmesi, yüzey gerilimi üzerinde küçük bir etki oluşturmuş bununla birlikte, çözeltilerin viskozitesinde artışa neden olmuştur. Bu durum kritik bir noktadan sonra çözelti içerisindeki yüzey aktif madde oranındaki artışın mikrobaloncuk boyutları üzerinde önemli değişiklikler oluşturmadığını göstermektedir. Ancak PEG40S'in önemli bir etkisi elde edilen mikrobaloncukların PDI'leri üzerinde olmuştur. %0,25 PEG40S içeren çözeltinin  $50$  ve  $100 \mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında elde edilen mikrobaloncukların PDI değerleri sırasıyla 6,63 ve 6,55 iken %0,5 PEG40S içeren çözeltiden elde edilen mikroabaloncuklar için bu değerler 2,66 ve 2,48'e düşmüştür. PEG40S oranın %0,25'den %0,5'e çıkarılması elde edilen mikrobaloncukların PDI değerini azaltarak mikrobaloncukların eş düzeliğini arttırmıştır.

göstermektedir. PEG40S konsantrasyonunun %0,75 olan çözeltilerden elde edilen mikrobaloncukların 50 ve 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızı için PDI değerleri sırasıyla 3,02 ve 4,21 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar polimerik çözeltideki yüzey aktif madde oranının PDI değerleri üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermiştir.



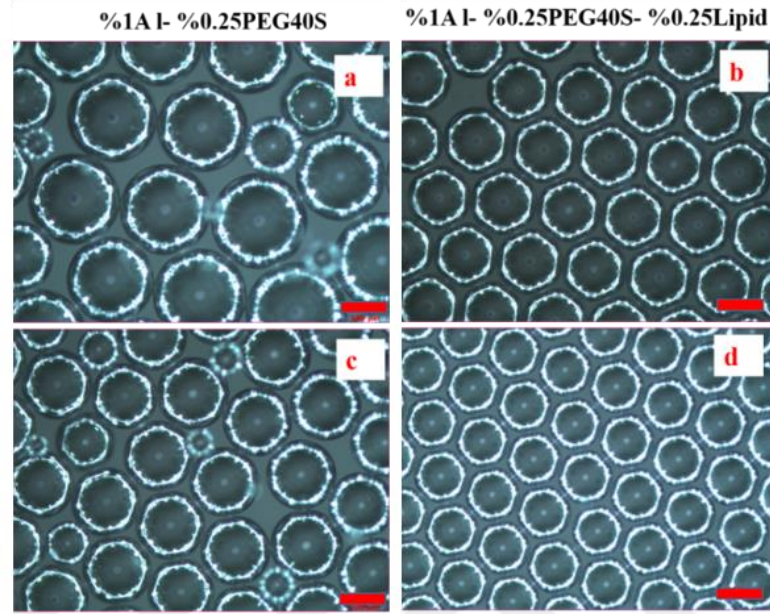
Şekil 4.5: Ortalama mikrobaloncuk çaplarının PEG40S miktarına bağlı değişimi.

#### 4.3.1.3 Fosfolipit kullanımının mikrobaloncuk boyutlarına etkisi

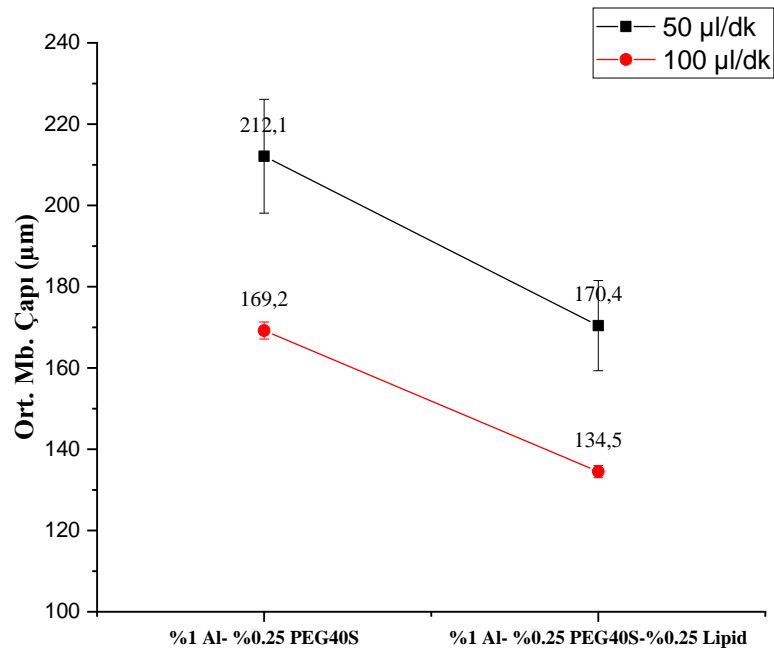
Polimer ve sürfaktan miktarının mikrobaloncuklar üzerinde meydana getirdiği etkinin yanı sıra lipit ilavesinin mikrobaloncuk boyutlarını nasıl etkilediğinin anlaşılması için % 1Al-%0,25PEG40S çözeltisi, %0,25 fosfolipit içeren şekilde hazırlanmış ve mikrobaloncuklar 0,8 bar gaz basıncında 50 ve 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  sıvı faz akış hızlarında üretilmiştir. Fosfolipit içeren ve içermeyen mikrobaloncuklara ait optik mikroskop görüntüleri Şekil 4.6' te gösterilmektedir.

Şekil 4.7' deki grafik lipit eklenmesinin ortalama mikrobaloncuk boyutları üzerine etkisini göstermektedir. Lipit içeren mikrobaloncukların ortalama çapları 50 ve 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızlarında sırasıyla  $169 \pm 2,1 \mu\text{m}$  ve  $134 \pm 1,5 \mu\text{m}$ 'dir. Lipit içermeyen mikrobaloncukların ortalama çapları ise 50 ve 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızlarında sırasıyla  $212 \pm 14 \mu\text{m}$  ve  $170 \pm 11 \mu\text{m}$ 'dir. Lipitli çözelti ile hazırlanan mikrobaloncukların lipitsiz mikrobaloncuklara göre boyutlarında azalış görülmektedir. Her iki çözelti içinde sıvı faz akış hızının artması beklenildiği gibi diğer sonuçlarla da uyumlu olarak

ortalama baloncuk çapını azalmıştır. Lipit ilavesinin mikrobaloncuk çapını azaltmasının yanı sıra diğer önemli bir etkisi polidispersite üzerine olmuştur. %0,25 lipit içeren mikrobaloncuklar  $50 \mu\text{l dk}^{-1}$  sıvı faz akış hızında 1,28 PDI değeriyle üretilmiştir.



**Şekil 4.6:** Lipitsiz ve lipitli çözeltilerden sabit basınçta (0,8 bar) elde edilen mikrobaloncukların optik mikrografları (a) (b)  $50 \mu\text{l dk}^{-1}$ , (c) (d)  $100 \mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızları (büyütme 100X,  $100 \mu\text{m}$ ).



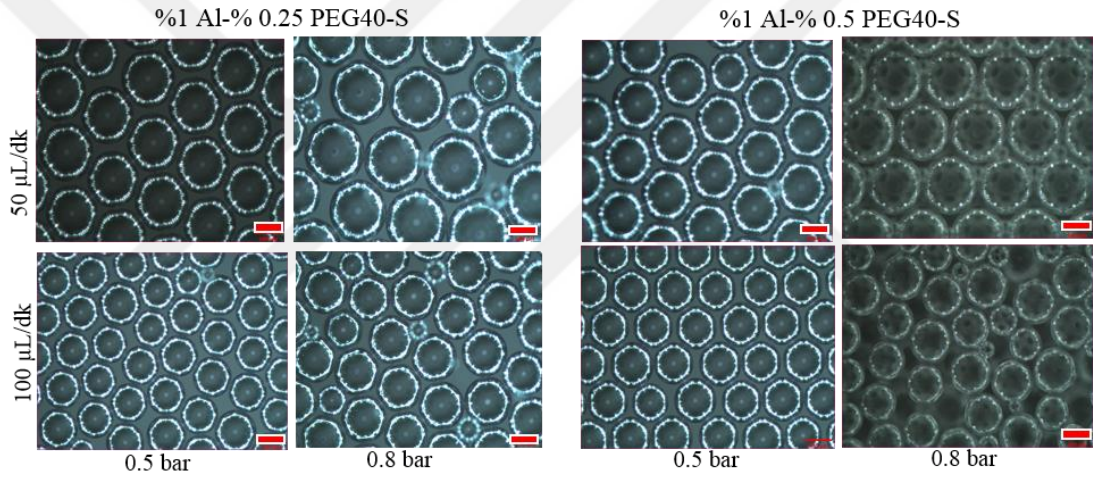
**Şekil 4.7:** Lipit ilavesinin ortalama mikrobaloncuk boyutu üzerine etkisi.

### 4.3.2 T-şekilli mikroakışkan sistem işlem parametrelerinin mikrobaloncuk özelliklerine etkisi

Bu bölümde T-şekilli sistem parametreleri olan azot gaz basıncı ve sıvı faz akış hızı parametrelerinin değişimi ile elde edilen mikrobaloncukların boy ve boyut dağılımı özellikleri incelenmiştir.

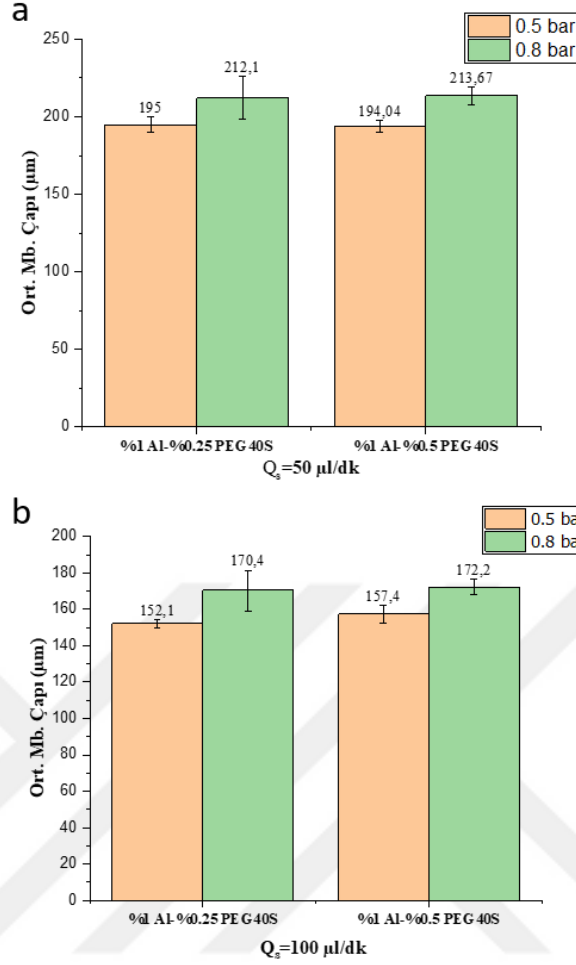
#### 4.3.2.1 Gaz basıncının mikrobaloncuk boyutlarına etkisi

Gaz basıncındaki artışın farklı oranlarda PEG40S içeren çözeltilerden elde edilen mikrobaloncuklar üzerindeki etkisini gözlemlemek için %0,25 ve %0,5 PEG40S içeren %1'lik iki farklı aljinat çözeltisi kullanılmıştır. Şekil 4.8 sabit sıvı faz akış hızları için gaz basıncının ortalama baloncuk boyutuna etkisini göstermektedir.



**Şekil 4.8:** Farklı basınçlarda oluşturulmuş mikrobaloncuklara ait optik mikrograflar.

Şekil 4.9, 50 ve 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızlarında gaz basıncı değişiminin ortalama mikrobaloncuk boyutları üzerine etkisini göstermektedir. Şekil 4.9 incelendiğinde ortalama mikrobaloncuk çapının, artan gaz debisi / gaz giriş basıncı ile beklenildiği gibi arttığı görülmektedir. Mikrobaloncuklar 2,18 PDI değeri ile en düşük polidispersitede %0,5 PEG40S içeren çözeltiden elde edilmiştir. Gaz giriş basıncının artmasındaki diğer önemli bir nokta polidispersite üzerine olmuştur. %0,25 PEG40S içeren çözeltinin basıncın artırılması mikrobaloncuk çapını arttırırken polidispersitede büyük oranda artışa sebep olmuştur. %0,5 PEG40S çözeltisinde ise basıncın 0,8 bar'a yükseltilmesi daha düşük bir polidispersite ile sonuçlanmıştır. Bu durum, artan yüzey aktif madde oranının mikro çevredeki dinamiklerin değişimini daha iyi tolere edebileceğinin göstergesidir.



**Şekil 4.9:** Gaz basıncının mikrobalonculuk boyutları üzerine etkisi(a)  $50 \mu\text{l dk}^{-1}$  (b)  $100 \mu\text{l dk}^{-1}$ .

#### 4.3.2.2 Sıvı faz akış hızının mikrobalonculuk özelliklerine etkisi

Sıvı faz akış hızı tüm konsantrasyonlar için  $50$  ile  $100 \mu\text{l dk}^{-1}$  oranlarında çalışılmıştır. Tüm çözeltiler için sıvı faz akış hızının artması ortalama mikrobalonculuk çapını azaltmıştır. Bu sonuçlar beklenildiği gibi artan sıvı faz akışının ( $Q_s$ ) dağılan (dispersed) faz akış hızına ( $Q_d$ ) oranındaki ( $Q_s/Q_d$ ) artışın sonucudur. Dikey akış rejiminin ile üretilen mikrobalonculukların çapının sıvı faz akış hızı ile doğrusal olarak azalması beklenmektedir [140]. Akış hızının diğer önemli bir etkisi üretilen mikrobalonculukların PDI' leri üzerine olmuştur. Çizelge 4.2 farklı gaz basıncı ve sıvı akış hızlarında üretilen mikrobalonculukların ortalama çaplarını ve PDI değerlerini göstermektedir. Akış hızının PDI üzerindeki en büyük etkisi %0,5 Aljinat içeren mikrobalonculuklarda görülmüştür. Akış hızının iki kat artırılması PDI değeri  $0,8$ 'den  $4,88$ 'e çıkartmıştır. Bu verilerden, düşük aljinat konsantrasyonlarında eş düze

mikrobaloncuk üretimi için çalışılabilecek akış hızı aralığının daha az olduğu ve mikrobaloncukların akış hızı oranı değişimine daha duyarlı olduğu düşünülmektedir. Akış hızına bağlı olarak PDI'deki değişimin diğer önemli etkisi 0,5 bar basıncında %1Al-%0,25PEG40S çözeltisinin kullanıldığı mikrobaloncuklarda görülmektedir. Diğer PDI değişimlerinden farklı olarak akış hızının artması PDI'de düşüşe yol açmıştır. Bu konsantrasyonlarda üretilen mikrobaloncukların PDI değerleri, 50 µl dk<sup>-1</sup>'da 2,83 iken 100 µl dk<sup>-1</sup> 1,5'e düşmüştür. Bu sonuç aynı çözeltinin 0,8 bar gaz basıncı ile üretilen mikrobaloncuklarının PDI'leri karşılaştırıldığında (50 µl dk<sup>-1</sup>'de 6,63 ve 100 µl dk<sup>-1</sup>'de 6,55) akış hızının gaz basıncını düşük hızlarda dengeleyemediği görülmektedir. 0,5 bar gaz basıncı 50 µl dk<sup>-1</sup> akış oranı için yetersiz kaldığı ve akış rejiminde düzensizlikler oluşturduğu düşünülmektedir.

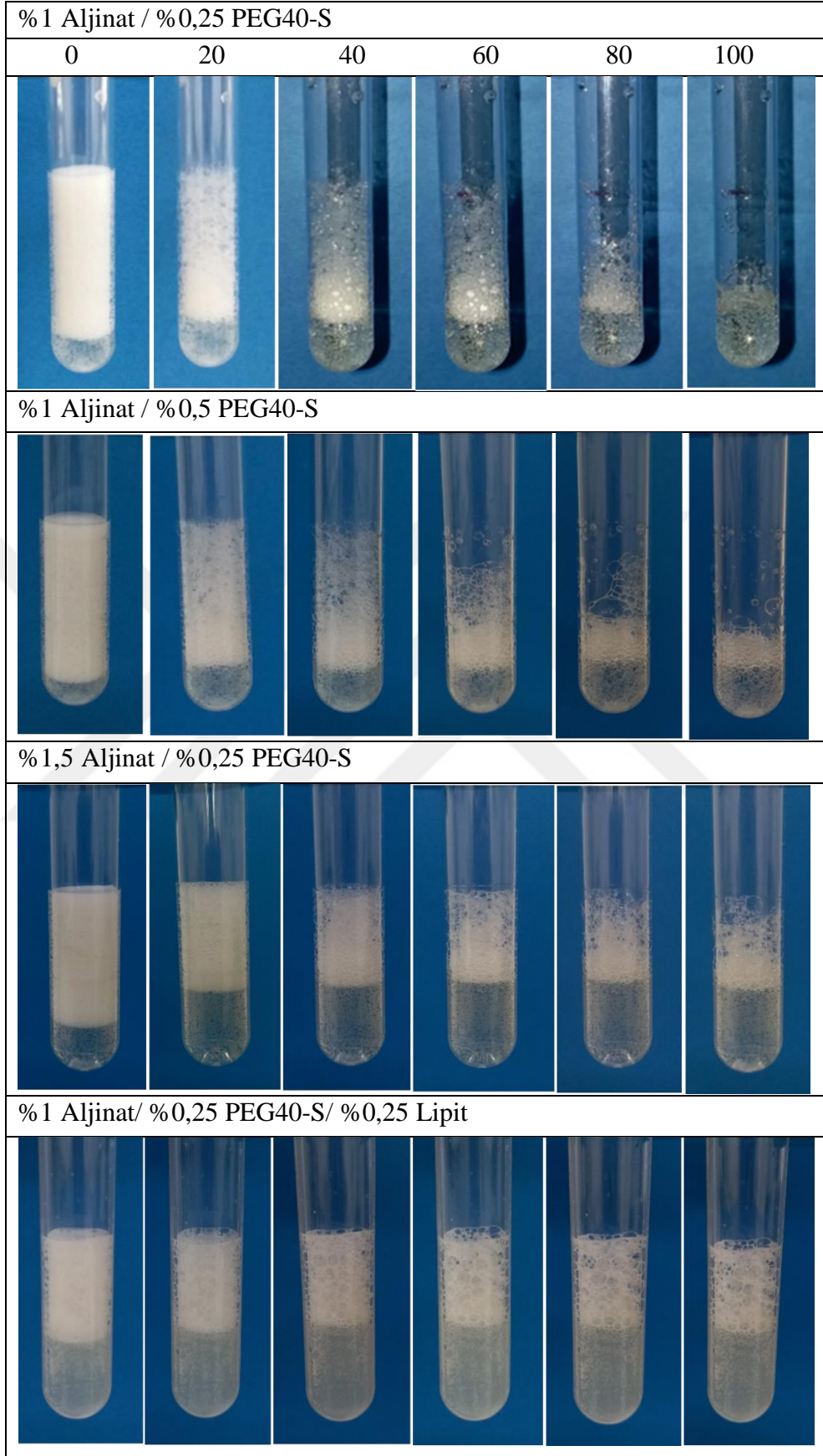
**Çizelge 4.2:** Farklı gaz basıncı ve sıvı akış hızlarında üretilen mikrobaloncukların hesaplanan ortalama çaplarının ve PDI değerleri.

Konsantrasyon	Basıncı (Bar)	Akış hızı (µl dk <sup>-1</sup> )	Ort. Mb. Çapı (µm)	PDI (%)
%0,5Al-%0,25PEG40S	0,5	50	228,6 ±1,8	0,8
		100	172,2 ±8,41	4,88
%1Al-%0,25PEG40S	0,5	50	195 ±4,6	2,83
		100	152,1 ±2,3	1,5
	0,8	50	212,1 ±14	6,63
%1,5Al-%0,25PEG40S	0,5	100	170,4 ±11,1	6,55
		50	166,1 ±5	3,23
%1Al-%0,5PEG40S	0,5	100	138,6 ±7,4	5,36
		50	194 ± 3,8	2,18
%1Al-%0,75PEG40S	0,8	50	213,6 ±5,6	2,66
		100	172,2 ±4,2	2,48
		50	217,6 ±6,5	3,02
%1Al-%0,25PEG40S-%0,25 Lipit	0,8	100	179,7 ±7,5	4,21
		50	169,2 ±2,1	1,28
		100	134 ±1,5	1,16

±: standart sapma

#### 4.3.3 Aljinat mikrobaloncukların stabilizasyonu

Konsantrasyonların mikrobaloncuk stabilizasyonunu nasıl etkilediğinin incelenmesi için mikrobaloncuklar, 50 µl dk<sup>-1</sup> sıvı faz akış hızında ve 0,8 bar sabit gaz basıncında 10 ml' lik deney tüplerinde eşit miktarlarda biriktirilmiştir. Şekil 4.10, 0. ile 100 dakika aralığında mikrobaloncuklardaki değişimi göstermektedir.



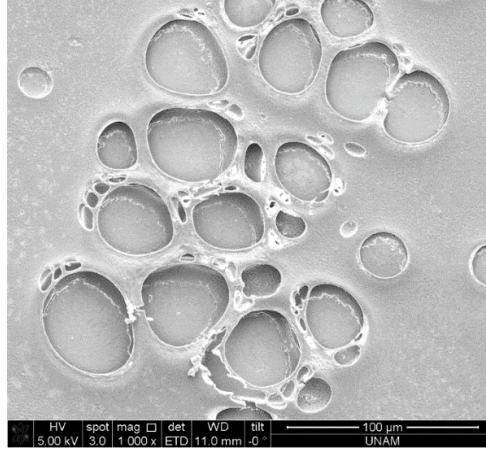
**Şekil 4.10:** Farklı konsantrasyondaki çözeltilerden üretilmiş köpüklerin belirli zaman aralıklarında çekilmiş fotoğrafları.

Biriktirilen mikrobaloncuklar 20 dakika süreler ile fotoğraflanmış ve belli bir süre sonunda görsel olarak karşılaştırma yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde baloncukların en az stabil olduğu konsantrasyonun % 1Al-%0,25PEG40S içeren 2 numaralı çözelti ve en fazla stabil durumun ise 6 numaralı % 1Al-%0,25 PEG40S-%0,25 lipit içeren çözelti ile olduğu görülmektedir. Ayrıca PEG40S oranının iki katına çıkarılmasıyla mikrobaloncukların stabilizasyonun bir miktar attığı görülmektedir. Aljinat konsantrasyonun %1,5 olduğu 5 numaralı çözeltilerden elde edilen mikrobaloncuklar 2 ve 3 numaralı çözeltilere göre daha iyi stabilite göstermiştir. Yüzey aktif madde oranının artırılması yüzey gerilimini düşürerek beklenildiği gibi baloncukların daha uzun süre stabil kalmasını sağlamıştır. Aynı şekilde aljinat miktarının artırılması aynı oranda yüzey aktif madde içeren 2 numaralı çözeltilerden elde edilmiş baloncuklara göre daha stabil kalmasını sağlamıştır. Stabilizasyondaki bu farklılık mikrobaloncuk kabuğunun viskozitesindeki artıştan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Baloncuk kabuğunun (çeperinin) viskozitesinin artırılmasının, kabuk inceltme işlemini uzattığı bilinmektedir.

#### **4.4 Sodyum aljinat filmlerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile mikro yapı analizi arakterizasyonu**

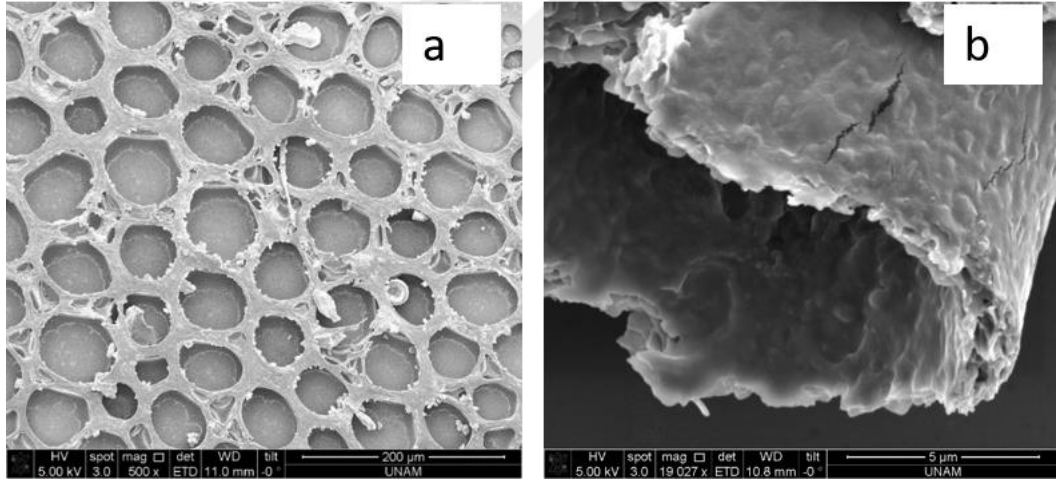
Çalışmanın ilk aşamasında, mikroakışkan sistemle elde edilen mikrobaloncukların incelenmesi yapılmış olup, biriktirilen mikrobaloncuklar 24 saat boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve film oluşumu sağlanmıştır. Bu aşamada kurutmadan sonra elde edilen gözenekli film yapılarının mikro yapıları incelenmiştir. Sürfaktan ve fosfolipit konsantrasyonundaki farklılıkların filmlerin mikro yapısına etkisi incelenmiş, elde edilen filmlerin SEM görüntüsü Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13'de gösterilmiştir.

Yüzey aktif madde ve fosfolipit ilavesinin film oluşumuna etkisini gözlemlemek için 2, 3 ve 6 numaralı çözeltiler kullanılarak elde edilen mikrobaloncuklar film oluşumu için cam bir altlık üzerinde tek sıra olacak şekilde biriktirilmiş ve oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Mikrobaloncuklar 0,8 bar sabit gaz basıncında ve  $100 \mu\text{l dk}^{-1}$  sıvı faz akış hızında üretilmiştir.



**Şekil 4.11:** %1 Al-%0,25 PEG40S içeren çözülden filmin SEM görüntüsü (1000X büyütme).

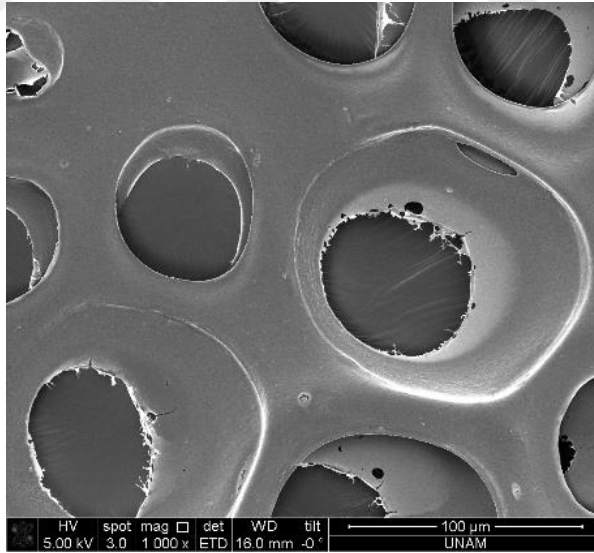
Şekil 4.11'deki SEM görüntüleri incelendiğinde %1Al-%0,25PEG40S çözeltisinden elde edilen mikrobalonculardan gözenekli film oluşumu sağlanmış olmasına rağmen düzenli bir gözenek yapısı görülmemektedir. Gözenek oluşumu aljinat filmin bazı bölgelerinde oluşmamıştır. Aljinat filmlerin ortalama gözenek boyutu 35,7 µm ve polidispersite oranı 29,84 olarak bulunmuştur.



**Şekil 4.12:** %1 Al-% 0,5 PEG40S içeren filmin SEM görüntüsü (a) Yüzey görüntüsü (b) Kesit görüntüsü.

Şekil 4.12'te %1Al-%0,5PEG40S çözeltisinde elde edilen mikrobaloncularla oluşturulan filmin SEM görüntüleri incelendiğinde yüksek oranda gözenekli düzenli bir yapının olduğu görülmektedir. Şekil 4.12b' deki filmin kesit görüntüsünden film kalınlığının yaklaşık 1,2 µm olarak ölçülmüştür. %0,5 PEG40S içeren filmlerin ortalama gözenek boyutu 55,3 µm ve polidispersite oranı 17,3 olarak hesaplanmıştır. Polimerik çözeltideki sürfaktan olarak işlev gören PEG40S oranının iki kat artması filmlerin gözenekliliğini arttırmıştır. Sürfaktan oranının gözeneklilikte oluşturduğu bu

farklılık mikrobaloncuk stabilizasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Sürfaktanlar, mikrobaloncukların patlamadan önce stabilitesini kontrol edilmesinde kullanılabilir. Kütlece yüzde 0,5 PEG40S içeren mikrobaloncukların, gözeneklilik oluşumu için patlamaya kadar geçen sürede daha stabil olması düzenli yapının korunmasını sağlamış olabilir. Mikrobaloncuk stabilite süresi, patlama noktasındaki baloncuk kabuğunun kalınlığının bir göstergesi olarak kullanılabilir [167]. Mikrobaloncuk kabuğu genellikle merkezinde minimum kalınlığa sahiptir ve daha sonra kalınlıktaki bu sürekli azalma, film drenajı devam ederken kabuğun daha geniş bir alanına ilerlemektedir. Bu nedenle, mikrobaloncukların kabuğundaki drenajının hızlandırılması veya inhibe edilmesinin ayrıca patlamadaki baloncuk çapını da etkilemesi beklenir, bu da baloncukların patladıktan sonra polimerik yapı içinde geride bıraktıkları gözenek boyutunu kontrol etmektedir [168]. Elsayed ve ark. yaptığı çalışmada düşük PEG40S konsantrasyonuna sahip mikrobaloncukların, düzenli yapılarını kısa bir süre sonra tamamen kaybettikleri için gözenekli yapılar üretmedikleri bulmuştur [165]. Elde edilen sonuçlar bu durumla paraleldir. Yüzey aktif madde konsantrasyonunun artırılması daha gözenekli ve düzenli yapının oluşmasını sağlamıştır.



**Şekil 4.13:** %1 Al-%0,5 PEG40-S-%0,25 lipit içeren filmin SEM görüntüsü (1000X büyütme).

Mikrobaloncuklara lipit ilavesinin mikrobaloncuk formasyonunu etkilediği bilinmektedir [169]. Lipit eklenmesinin mikrobaloncuk üzerine iki önemli etkisi olduğu düşünülmektedir. İlki mikro baloncuk gaz sıvı arayüzeyin girerek mikrobaloncuk kabuğuna esneklik katmaları ve buna bağlı olarak stabilite süresinin

artmasıdır. Diğeri ise farklı büzülme ve patlama mekanizmalarında etkin bir patlama sürecini indklemadaki önemli rolüdür [170]. Lipit içeren aljinat filmin ortalama gözenek boyutu 69,35  $\mu\text{m}$  ve polidispersite oranı 24,5 olarak hesaplanmıştır. %1Al-%0,25PEG40S-%0,25 lipit içeren çözeltiden elde edilen filmlerde ise gözenekli yapı oluşunu için lipit ilavesi beklenildiği kadar etkili olmadığı görülmüştür ve film üzerinde kısmı gözeneklerin oluşumunu sağlamıştır. Ancak oluşan gözeneklerin boyutlarını farklılığı görülmektir. Bu durumun sebebi lipitin mikrobaloncuk baloncuk kabuğuna etkin dağılamamasının olabileceği düşünülmektedir. PEG40S'nin yüzey aktif madde olmasının yanı sıra lipit dağılımını iyileştiren ve mikrobaloncukların birleşmesini önleyebilen bir emlsiyonlaştırıcı görevi gördüğü de bilinmektedir [171]. PEG40S konsantrasyonun lipitleri yeterince emülsifiye edememiş olması bu soruna yol açmış olabilir.

alışmandan elde edilen önemli bir sonuç mikrobaloncukların oluşturulan film yapılarının filmlerin ortalama gözenek boyutları üzerindeki etkisidir. Film eldesi için kullanılan mikrobaloncukların içeriği ve boyutları filmlerdeki ortalama gözenek boyutlarında farklı etkilere neden olmuştur. İlk olarak her üç film yapısındaki ortalama gözenekler, film oluşumu için kullanılan mikrobaloncukların boyutlarından daha küçük boyutlarda oluşmuştur. Bu durum, mikrobaloncukların patlama anındaki boyutlarının filmlerin nihai gözenek boyutlarını oluşturacağı göz önünde bulundurulduğunda, mikrobaloncukların film oluşumu sürecinde (kuruma esnasında) küçüldüğünü göstermektedir. %0,25 ve %0,5 PEG40S içeren çözeltilerden elde edilen baloncukların ortalama çapları sırasıyla 170,4  $\mu\text{m}$  (PDI 6,55) ve 172,2  $\mu\text{m}$  (PDI 2,48) iken, bu mikrobaloncuklardan elde edilen filmlerin ortalama gözenek boyutları ise sırasıyla 35,7  $\mu\text{m}$  (PDI 29,84) ve 55,3  $\mu\text{m}$  (PDI 17,3) olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç mikrobaloncuklardaki PEG40S oranının artmasının patlama mekanizmasını ve film oluşum sürecini etkileyerek daha büyük gözenek boyutlu filmlerin oluşabileceğini göstermiştir. Film gözenek boyutu üzerine diğer bir önemli etken lipit ilavesi olmuştur. Lipit içeren mikrobaloncuklar aynı koşullarda üretilen lipit ieremeyen mikrobaloncuklara göre daha küçük ortalama çapa sahip olmasına rağmen lipitli mikrobaloncuklar en büyük ortalama gözenek boyutuna sahip filmleri oluşturmuştur. Lipit ilavesi mikrobaloncukların kuruma esnasında daha az küçülerek film oluşum sürecini etkilemiştir. Elde edilen sonuçlar film oluşumu için kullanılan

mikrobaloncukların içeriğinin film oluşum sürecini ve ortalama film gözenek boyutlarını etkilediğini göstermektedir.

#### **4.5 Hidrojel Film Yapılarının Karakterizasyonu**

Çalışmanın ilk aşamasında elde edilen sodyum aljinat filmler, oda koşullarında katılaştırma işlemiyle üretilerek polimerik çözelti konsantrasyonunu mikro yapı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu kısımda ise mikroakışkan sistem ile elde edilen mikrobaloncuklar, üç boyutlu bir yapının sağlanması için başka bir katılma prosesi olan  $\text{CaCl}_2$  ile çapraz bağlanarak hidrojel film olarak üretilmiştir. Daha sonra hidrojel yapıları liyofilize edilerek gözenekli üç boyutlu film yapılarının oluşumu sağlanmıştır. Hidrojel filmlerin fiziksel, kimyasal ve termal karakterizasyonları yapılmıştır.

##### **4.5.1 Hidrojel filmlerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizleri**

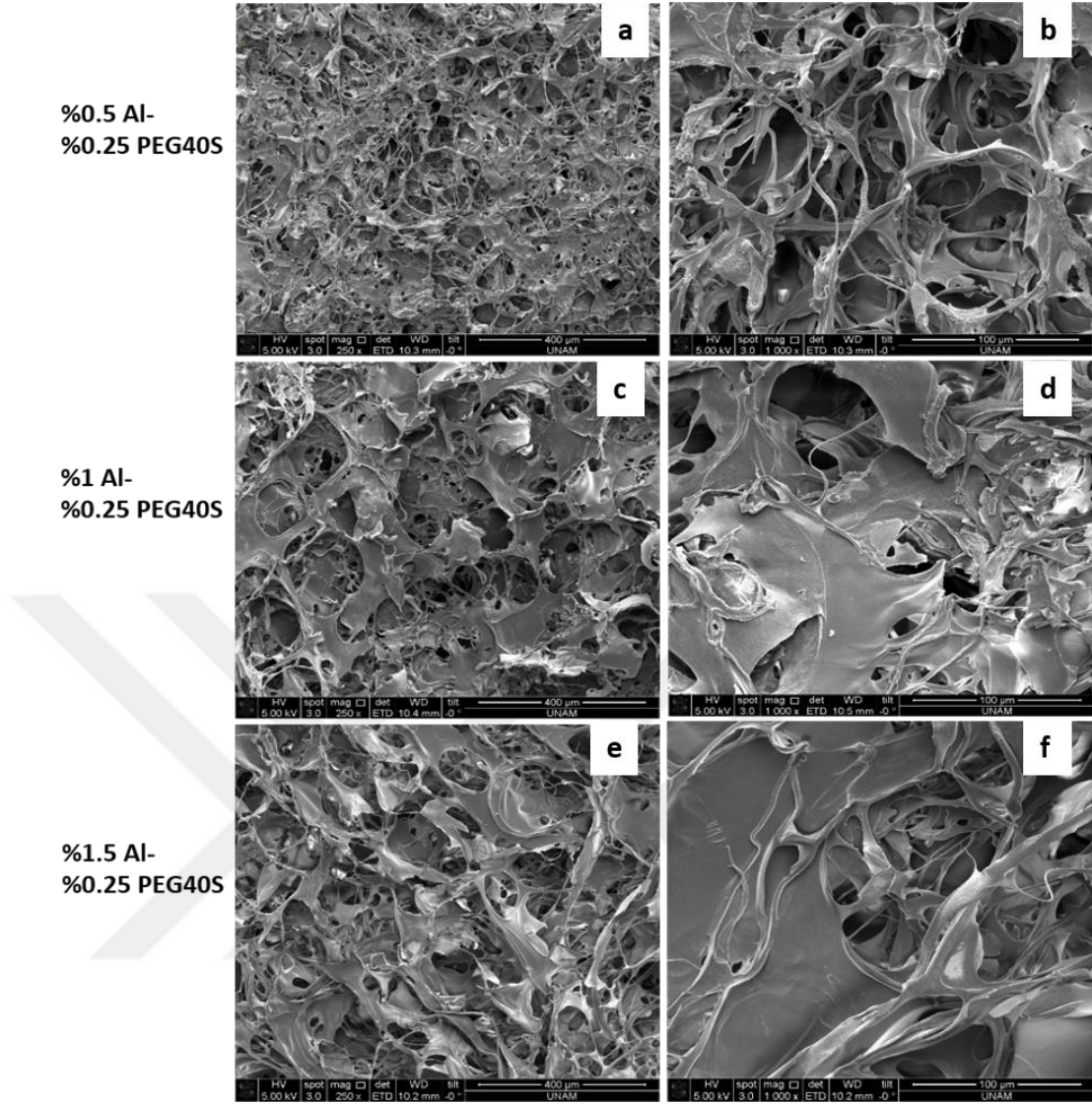
Elde edilen hidrojel filmlere çeşitli parametrelerin değişiminin, filmlerin mikro yapısı üzerinde meydana getirdiği etkiler SEM ile analiz edilmiştir.

###### **4.5.1.1 Çözelti parametrelerinin hidrojel mikro yapıları üzerine etkileri**

Bu kısımda, aljinat konsantrasyonu, PEG40S konsantrasyonu ve çözeltiye lipit eklenmesi gibi çözelti özelliklerini değiştiren etkilerin, oluşturulan filmlerin mikro yapıları üzerine etkisi incelenmiştir.

##### **Aljinat konsantrasyonunun hidrojel film yapısına etkisi**

Sıvı fazdaki polimerin kütlece miktarının artmasının mikroakışkan sistemde üretilen hidrojellerin mikro yapılarında meydana getirdiği değişimler Taramalı Elektron Mikroskobu ile incelenmiştir. Şekil 4.14 farklı derişimlerde aljinat çözeltileri kullanarak elde edilen hidrojel filmlerin SEM görüntülerini göstermektedir. Şekil 4.14' teki görüntüler incelendiğinde kütlece %0,5 Al içeren mikrobaloncuklardan elde edilen hidrojinin gözenekliliğinin %1 ve %1,5 Al içeriğine göre daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca %0,5'lik Al numunesinin gözenek yapısının daha fazla içsel bağlantılara sahip olduğu görülmektedir. Al konsantrasyonunun artırılmasının por yapısında oluşturduğu farklılık %1 Al ve %1,5 Al içeren örneklerde açıkça görülmektedir. Biyopolimerin kütlece % oranı hidrojel mikro yapısı ve gözenekliliği üzerine önemli derecede etkilemektedir [172]. Bu etki polimerik mikrobaloncuklardan elde edilen hidrojel filmlerde de görülmektedir.



**Şekil 4.14:** Aljinat konsantrasyonunun hidrojel mikro yapısı üzerine etkisi ( $Q_s=50\mu\text{l dk}^1$ ,  $P_g=0,5$  bar) (a, c ve e 250X; b, d ve f 1000X büyütme).

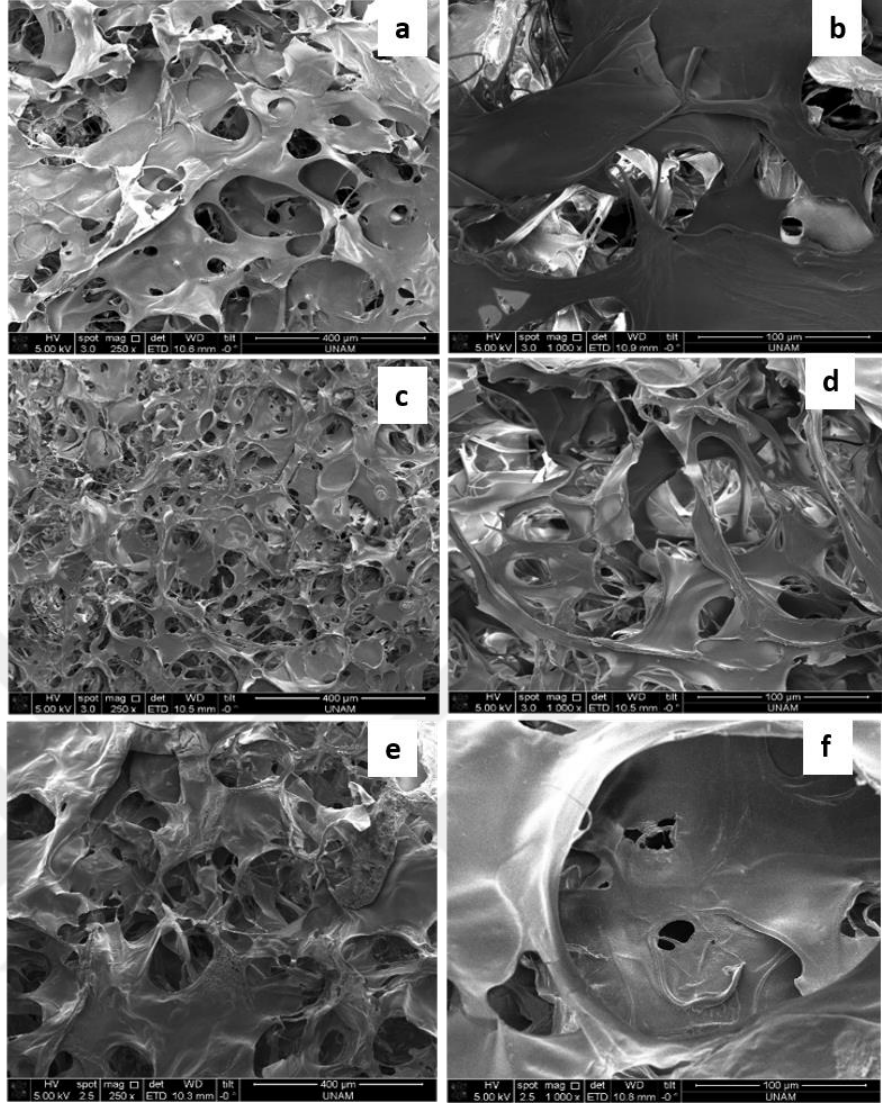
Kütlece %0,5, %1 ve %1,5 aljinat içeren hidrojel filmlerin ortalama gözenek boyutları sırasıyla, 71  $\mu\text{m}$ , 111.4  $\mu\text{m}$  ve 111.3  $\mu\text{m}$  olarak bulunmuştur. Polidispersite yüzdesi ise sırasıyla 16,9, 34,4 ve 25,02 olarak hesaplanmıştır. Aljinat konsantrasyonunun %0,5'ten %1 çıkarılması, gözenek boyutlarında artışa sebep olmuştur. %1,5 aljinat içeren hidrojel filmin gözenek boyutları ise %1 Al içeren filmle yaklaşık olarak aynı kalmaktadır. Polimerik mikrobaloncuğun polimer içeriği baloncuk kabuğunun kalınlığını etkilediği bilinmektedir. %0,5 Al ve %1 Al içeren kurutulmuş hidrojel filmlere ait SEM görüntüleri incelendiğinde filmlerin gözenek çeperlerinin kalınlığındaki belirgin artış görülmektedir. Bu durumun sebebinin aljinat oranına bağlı olarak mikrobaloncuk kabuğunun polimer içeriğinin artması olduğu düşünülmektedir. Şekil 4.14(f) incelendiğinde %1,5 Al içeren numunenin mikro yapısı da bunu destekler

niteliktedir. Gözenekli yapının iskelede oluşmasının esas etkeni olan polimerik mikrobaloncukların kurutma sırasında patlama esnasındaki boyutu por boyutunu belirlerken mikrobaloncuk kabuğu ve patlama mekanizması ise porun yapısını belirlemektedir. Dolayısıyla elde edilen hidrojel ürününün mikro yapısı büyük ölçüde jelleştirilen polimerik mikrobaloncukların boyutlarına, boyut dağılımlarına, içerdiği polimere ve kütlece miktarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Elde edilen filmlerin ortalama por boyutları ile hidrojel film üretimi için kullanılan mikrobaloncukların boyutları karşılaştırıldığında baloncuk çapları ve film gözenek boyutları arasında bir ilişki gözlemlenmemiştir. En büyük Ortalama baloncuk çapı %0,5 aljinat içeren çözeltilerden elde edilmesine rağmen (228,6 µm, PDI 0,8) en küçük ortalama gözenek boyutlu film (71 µm, PDI 16,9) yine aynı çözeltilerden elde edilmiştir. %1 ve %1,5 Al içeren çözeltilerden elde edilen baloncukların ortalama çapları (sırasıyla 195 µm, PDI 2,83 ve 166,1 µm, PDI 3,23) farklı olmasına rağmen elde edilen filmlerin ortalama gözenek boyutları büyük oranda aynı olmuştur. Bu durum mikrobaloncuklardaki aljinat oranının hidrojel film oluşum sürecinde etkili olduğunu göstermektedir. Mikrobaloncuk boyutu ve film gözenek boyutları arasındaki bu değişimin farklı bir nedeni de kurutma işlemi olabilir. Jelleşen mikrobaloncukların dondurularak kurutulması hidrojelin kurutulurken çökmesini engellemiş ve bağlantılı gözeneklerin oluşumunu sağlamıştır. Bu durum her ne kadar normal şartlarda kurutulmuş köpük hidrojelere kıyasla yüksek oranda artırılmış bir gözeneklilik sağlamış olsa da gözenek boyutlarının ve gözenek boyut dağılımının iyi seviyelerde olmadığı görülmektedir.

### **PEG40S konsantrasyonunun hidrojel film yapılarına etkisi**

Yüzey aktif maddenin kütlece yüzdesinin artmasının hidrojel üzerine olan etkilerinin değerlendirmek için kütlece %0,25, %0,5 ve %0,75 olmak üzere üç farklı PEG40S içeren çözelti kullanılmıştır. Bu çözeltilerden, 0,8 bar sabit gaz basıncı ve 50 µl dk<sup>-1</sup> sıvı faz akış hızında elde edilen mikrobaloncukların jelleştirilmesi ile üretilen hidrojel yapılarının SEM görüntüleri Şekil 4.15' te gösterilmiştir. %0,25 PEG40S içeren numune ile %0,5 PEG40S numunesi incelendiğinde en belirgin farkın film gözenek boyutları ve yapısı üzerine olduğu görülmektedir. %0,25 ve %0,5 PEG40S içeren hidrojel filmlerin ortalama gözenek büyüklükleri sırasıyla 31,6 PDI değeri ile 116,6 µm ve 27,2 PDI değeri ile 94,1 µm olarak hesaplanmıştır. Polimerik çözeltideki PEG40S oranının iki kat artması mikrobaloncuk kabuğunun incelmeye başlaması bu

%1 Al-  
%0.25 PEG40S



%1 Al-  
%0.5 PEG40S

%1 Al-  
%0.75 PEG40S

**Şekil 4.15:** PEG40S konsantrasyonunun hidrojel mikro yapısı üzerine etkisi ( $Q_s=50\mu\text{l dk}^{-1}$ ,  $P_g=0,8\text{ bar}$ ) (a, c ve e 250X ; b, d ve f 1000X büyütme).

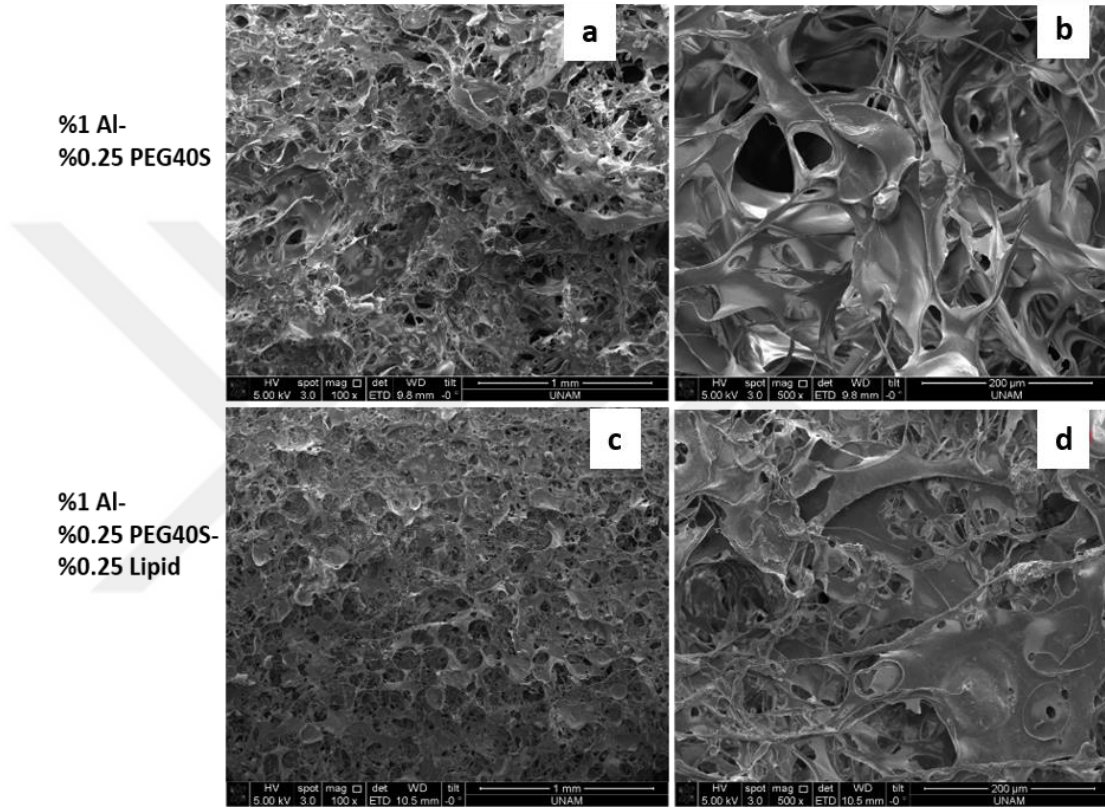
sebeple de daha küçük boyutlu daha gözenekli bir yapı meydana getirmiş olabilir. Bu durumun diğer bir sebebi ise mikrobaloncuk stabilizasyonu olmuş olabilir. Bölüm 4.3.2’de yapılan stabilizasyon deneylerinin sonuçlarına göre %0,5 PEG40S içeren mikrobaloncukların daha uzun süre stabil olduğu saptanmıştır. Jelleşmeye kadar olan süre içinde %0,25 PEG40S içeren numuneden daha fazla miktarda mikrobaloncuk bulunması gözenekliliği arttıran bir etmen olabilir. Ancak bu durumun kütlece en fazla oranda (%0,75) PEG40S içeren çözelti için geçerli olmadığı görülmektedir. %0,75 PEG40S içeren hidrojel filmin ortalama gözenek boyutu 24,6 PDI ile  $178,1\ \mu\text{m}$  olarak bulunmuştur. Filmlerin ortalama gözenek boyutları ile film oluşumu için kullanılan mikrobaloncukların ortalama çapları karşılaştırıldığında film gözenek boyutlarının ortalama mikrobaloncuk boyutlarından daha küçük olduğu görülmektedir. PEG40S

oranının baloncuk boyutları üzerinde önemli bir etkisi olmamasına rağmen filmlerin ortalama gözenek boyutlarını farklı şekilde etkilemiştir. En küçük gözenek boyutlu film %0,5 PEG40S içeren çözeltiden elde edilen mikrobalonculardan (21,6 µm, PDI 2,66) ve en büyük gözenek boyutu ise %0,75 PEG40S içeren mikrobalonculardan (217,6 µm, PDI 3,02) elde edilmiştir. PEG40S konsantrasyonunun %0,5'ten %0,75'e çıkarılması her ne kadar ortalama gözenek boyutunu arttırmış olsa da Şekil 4.15c incelendiğinde gözenekliliğin azaldığı görülmektedir. Bu durum, yüksek yüzey aktif madde oranlarının jelleşmeyi etkilemesinden dolayı gerçekleşmiş olabilir. [173]. Bu etki yüzey aktif maddenin doğası gereği yüzeydeki aljinat moleküllerinin çapraz bağlama çözeltisindeki  $Ca^{+2}$  iyonlarıyla etkileşimini kısıtlamasından kaynaklanmaktadır.  $Ca^{+2}$  iyonlarının polimerik mikrobalonculara yeteri kadar difüze olmamasının jelleşme sürecini etkilediği düşünülmektedir. Bu da jelleşmeyen mikrobaloncuların düzensiz bir şekilde patlayarak gözenekli yapıyı bozabileceğini düşündürmektedir. Genel olarak artan PEG40S oranı belli bir orana kadar gözenekliliği artırırken fazla miktarlarda jelleşmeyi engellediği için gözeneklilik üzerinde istenmeyen etkiye yol açtığı söylenebilir.

#### **Fosfolipitin eklenmesinin hidrojel film yapılarına etkisi**

Mikrobalonculara lipit eklenmesinin oluşturulan hidrojellerin mikro yapısında meydana getirdiği etkileri incelemek için %1Al-%0,25PEG40S ve %1Al-%0,25 PEG40-%0,25lipit çözeltileri kullanılmıştır. Bu çözeltiler kullanılarak  $100 \mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında ve 0,8 bar sabit azot gazı basıncında üretilmiş mikrobalonculardan elde edilen hidrojellerin SEM görüntüleri Şekil 4.16'da gösterilmektedir. Lipit içermeyen hidrojel filmlerin ortalama gözenek büyüklüğü 29,1 PDI ile 108,2 µm ve lipit içeren hidrojel filmlerin ise 18,9 PDI ile 138,2 µm olarak hesaplanmıştır. Mikrobaloncuk boyutları ile film gözenek boyutları karşılaştırıldığında lipit içeren mikrobaloncukuların ortalama çapları (169,2 µm, PDI 1,28) içermeyen mikrobalonculara göre (212,1 µm, PDI 6,63) daha küçük olmasına rağmen elde edilen lipitli hidrojel filmler daha büyük gözenek boyutlarında oluşmuştur. Bu sonuç baloncuk patlama prosesiyle elde edilen sodyum aljinat filmlerle paralellik göstermektedir. Mikrobalonculara lipit ilavesi hidrojel filmlerde daha büyük gözenek boyutlarını sağlamıştır. Yine Şekil 4.16'taki görüntüler incelendiğinde lipit içeren mikrobalonculardan elde edilen hidrojelin daha düzenli bir yapıda olduğu görülmektedir. Bu durumun elde edilen mikrobaloncuların düşük polidispersitesi ile

ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bölüm 4.2.1.3'teki bulgular SEM analizi ile elde edilen sonuçlarla paraleldir. Lipit ilavesinin diğer bir önemli etkisi stabilizasyon süresi üzerinedir. Literatürde lipitlerle hazırlanan mikrobaloncukların stabilizasyonun daha iyi olduğu bildirilmektedir [169,174]. Lipitli mikrobaloncukların üretiminden çapraz bağlama süresine kadar stabil kalması jelleştirme aşamasında lipit içermeyen mikrobaloncuklara göre daha düzenli bir yapı oluşturmasını sağlamış olabilir.



**Şekil 4.16:** Lipitli ve lipitsiz mikrobaloncuklardan elde edilmiş hidrojellerin SEM görüntüsü ( $Q_s=50\mu\text{l dk}^{-1}$ ,  $P_g=0,8$  bar) (a ve c 100X ; b, d ve 500X büyütme).

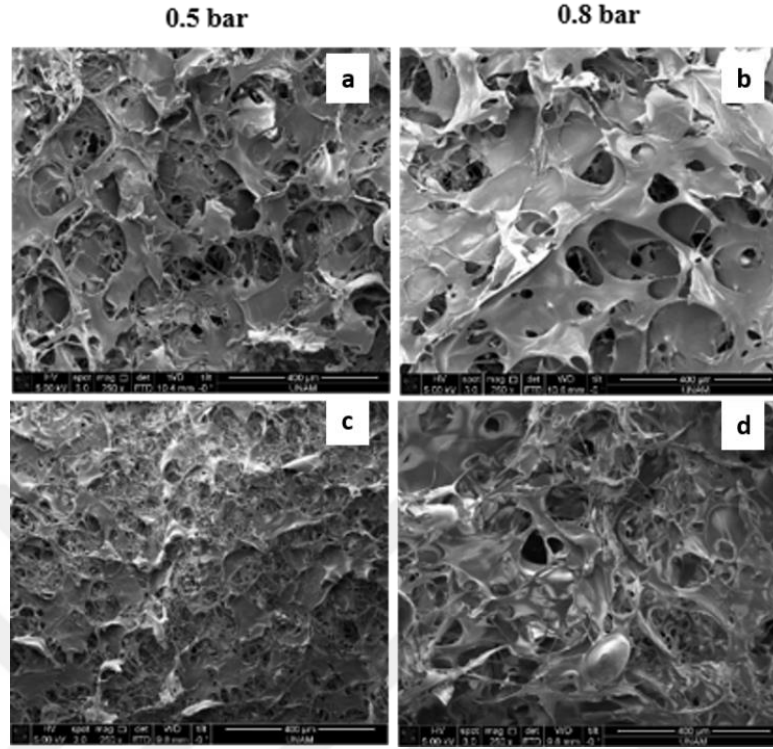
#### 4.5.1.2 T-Şekilli mikroakışkan cihaz işlem parametrelerinin hidrojel film içyapıları üzerine etkileri

Bu kısımda azot gazı basıncı ve sürekli faz akış hızı gibi T-şekilli mikroakışkan sistemin işlem parametrelerini değişmesinin elde edilen hidrojel filmlerin içyapılarına olan etkileri incelenmiştir.

#### Gaz basıncının hidrojel filmlerin içyapılarına etkisi

Farklı gaz basınçlarında üretilen mikrobaloncuklardan elde edilen hidrojellerin mikro yapısında meydana getirdiği farklılıkları incelemek için, %1Al-%0,25PEG40S çözeltisi kullanılarak 0,5 ve 0,8 bar iki farklı gaz basıncında, 50 ve 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  sıvı akış

hızlarında üretilen mikrobaloncuklardan hidrojeller elde edilmiştir. Hidrojellerin SEM görüntüleri Şekil 4.17’de gösterilmektedir.

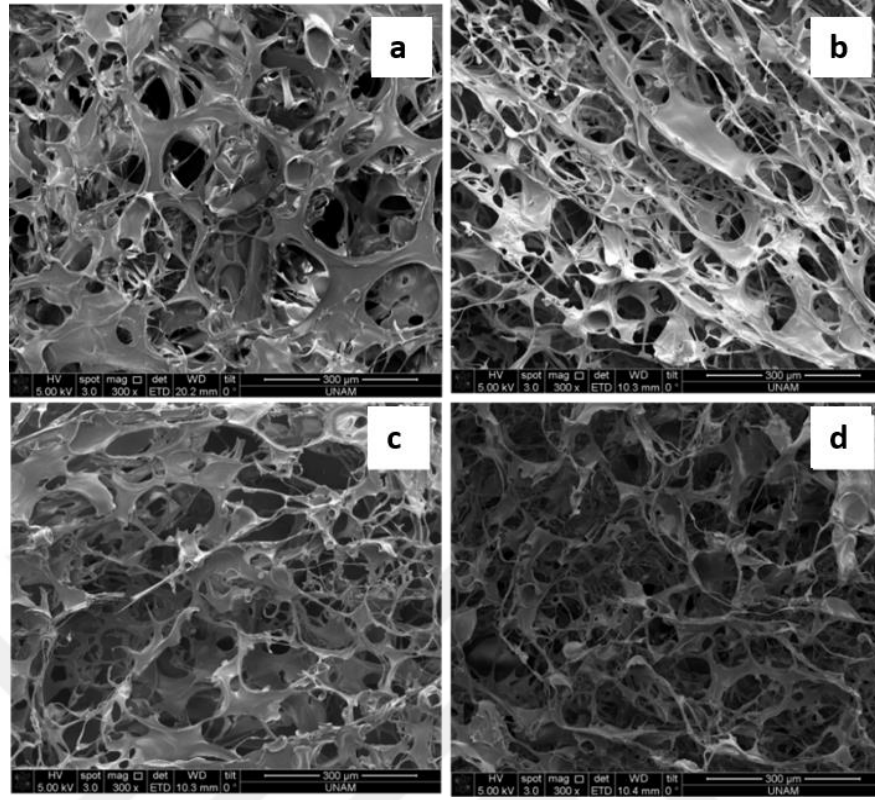


**Şekil 4.17:** Farklı gaz basıncında üretilen mikrobaloncuklardan elde edilmiş hidrojellerin SEM görüntüleri (a ve b;  $Q_s = 50 \mu\text{l dk}^{-1}$ , c ve d;  $Q_s = 100 \mu\text{l dk}^{-1}$ , 200X büyütme.

50  $\mu\text{l dk}^{-1}$  sıvı akış hızında 0,5 ve 0,8 bar gaz basıncında elde edilen hidrojellerin ortalama gözenek büyüklükleri sırasıyla yüzde 34,4 PDI ile 111,4  $\mu\text{m}$  ve yüzde 31,6 PDI ile 116,6  $\mu\text{m}$  olarak bulunmuştur. 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  sıvı akış hızı için bu değerler yüzde 28,9 ile 72,8  $\mu\text{m}$  ve yüzde 29,1 ile 108,2  $\mu\text{m}$  olarak hesaplanmıştır. Gaz basıncındaki artışın hidrojel yapılarındaki gözenek boyutunu arttırdığı görülmektedir. Bu durumun gaz basıncına bağlı artan mikrobaloncuk çaplarının sonucu olarak gerçekleşmiş olabilir. Bölüm 4.2.2’de elde edilen bulgular basınç artışının mikrobaloncuk boyutunu arttırdığı yönündedir. Mikrobaloncuk boyutlarının artmasını sağlayan basınç artışının hidrojellerde gözenek boyutlarının artması ile sonuçlandığı düşünülmektedir.

#### **Sürekli faz akış hızının hidrojel filmlerin içyapılarına etkisi**

Üretilen hidrojel filmlerin mikro yapısına akış hızının etkisini görmek amacıyla %1,5Al- %0,25PEG40S çözeltisi ile 0,5 bar gaz basıncında 25, 50, 75 ve 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızlarında çalışılmıştır. Elde edilen numunelere ait SEM görüntüleri Şekil 4.18’de gösterilmiştir.



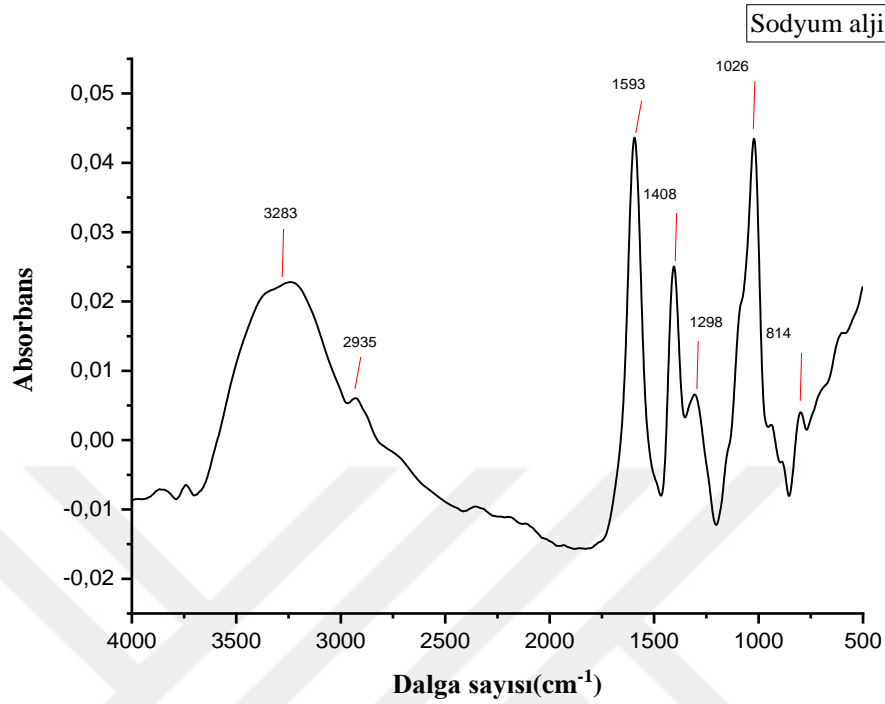
**Şekil 4.18:** Farklı sıvı faz akış hızında üretilen mikrobalonculardan elde edilen hidrojel filmlerin SEM görüntüsü a)  $Q_s=25\mu\text{l dk}^{-1}$  b) a;  $Q_s=50\mu\text{l dk}^{-1}$  b) c)  $Q_s=75\mu\text{l dk}^{-1}$  d) a;  $Q_s=100\mu\text{l dk}^{-1}$  ( $P_g=0,5$  bar, 300X büyütme)

Görüntüler incelendiğinde, akış hızının artması ile hidrojel filmin gözenek boyutları üzerinde azalan bir etki nitel olarak gözükmemektedir. 25, 50, 75 ve 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızlarında üretilen hidrojellerin ortalama gözenek boyutları sırasıyla 192, 111,3, 92,8 ve 73,3  $\mu\text{m}$  olarak bulunmuştur. PDI değerleri ise sırasıyla yüzde 23,4, 21,2, 34,6 ve 18,33 olarak hesaplanmıştır. Bu durum mikroakışkan sistemde üretilen mikrobaloncuların, diğer bir mikroakışkan sistem parametresi olan gaz basıncının sabitken akış hızının artırılmasının daha küçük boyutlarda baloncuk üretilmesine paralel olarak gerçekleşmektedir. Bu sonuçlar hidrojel film gözenek boyutunun sıvı faz akış hızı değiştirilerek ayarlanabileceğini göstermektedir.

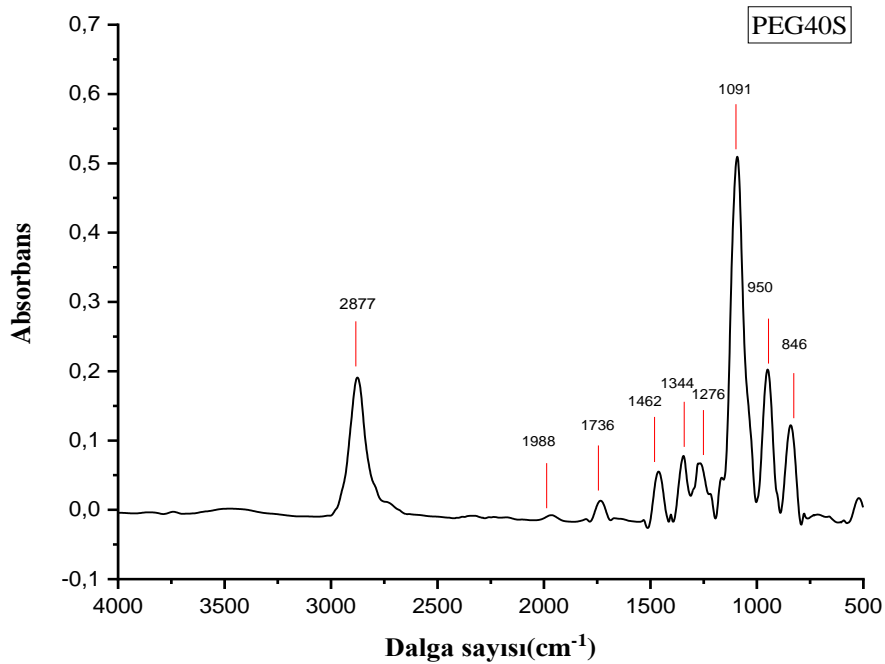
#### 4.5.2 Hidrojel filmlerin FT-IR ile kimyasal yapı analizleri

Elde edilen hidrojel filmlerin kimyasal yapılarında herhangi bir değişiklik olup olmadığı bir kimyasal yapı analiz yöntemi olan FTIR analizi ile belirlenmiştir. Bunun için başlangıç maddeleri ve elde edilen numunelerin IR spektrumları karşılaştırılmıştır.

Ticari olarak temin edilen aljinat ve PEG40S'in IR spektrumları sırasıyla Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de gösterilmektedir.

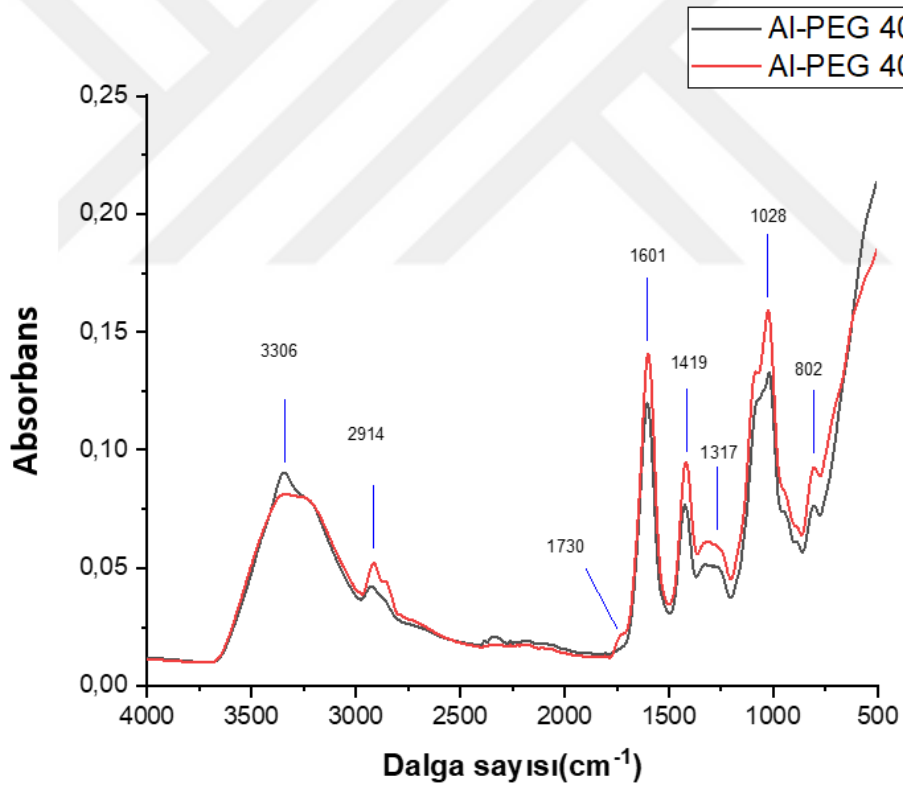


**Şekil 4.19:** Ticari olarak alınan sodyum aljinatın FT-IR spektrumu. Şekil 4.19' da gösterilen aljinata ait spektrumda 3283 cm<sup>-1</sup>'de geniş OH titreşim bandı, 2935 cm<sup>-1</sup> CH<sub>2</sub> asimetrik gerilimi, siklik alkene ait 1593 cm<sup>-1</sup> C=C 1408 cm<sup>-1</sup>'deki C-OH bükülmeleri, 1298 cm<sup>-1</sup> aromatik esterdeki ve 1082-1026 cm<sup>-1</sup> bandında



**Şekil 4.20:** PEG40S FT-IR spektrumu.

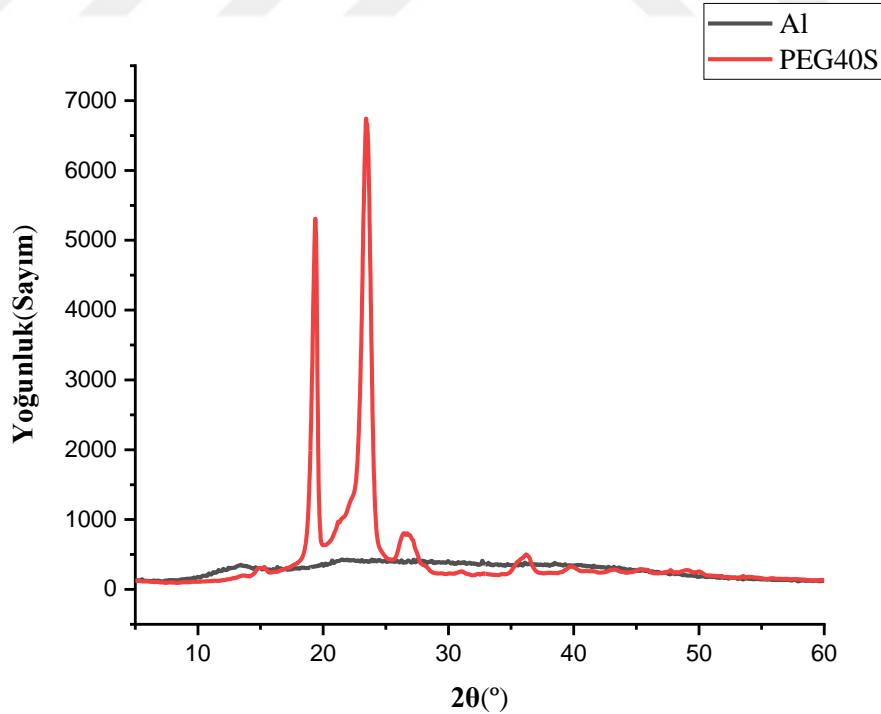
görülen güçlü C-O gerilmeleri aljinatın beklenen yapıda olduğunu göstermektedir. Aljinat-PEG40S ve aljinat-PEG40S-Lipit içeren hidrojel filmler ait numunelerin IR spektrumunu Şekil 4.21’de gösterilmiştir. Her iki spektrumda görülen 1028  $\text{cm}^{-1}$ ’deki aromatik C-O-C titreşimleri, aljinatın beklenen yapıda olduğunu doğrulamaktadır. PEG40S için elde edilen spektrum sonuçlarına göre 2877  $\text{cm}^{-1}$ ’de alifatik C-H gerilmeleri 1462-1276  $\text{cm}^{-1}$ ’deki alifatik C-H eğilme titreşimleri ve 1091  $\text{cm}^{-1}$  C-O gerilme titreşimleri gözlenmektedir. Genel olarak Al-PEG ve Al-PEG40S-lipit numunelerinin spektrumlarının sodyum aljinat ile benzer olması herhangi bir kimyasal bağ oluşumun olmadığını göstermektedir. Al-PEG ve Al-PEG40S-Lipit numuneleri karşılaştırıldığında 1730  $\text{cm}^{-1}$ ’deki doymamış estere ait güçlü C=C gerilmesi yapıda lipit varlığının göstergesidir. Karakteristik PEG40S piklerinin Al-PEG ve Al-PEG 40S-lipit numunelerinde görülmemesi aljinatın PEG40S üzerinde bir kaplama oluşturduğu sonucuna varılmıştır.



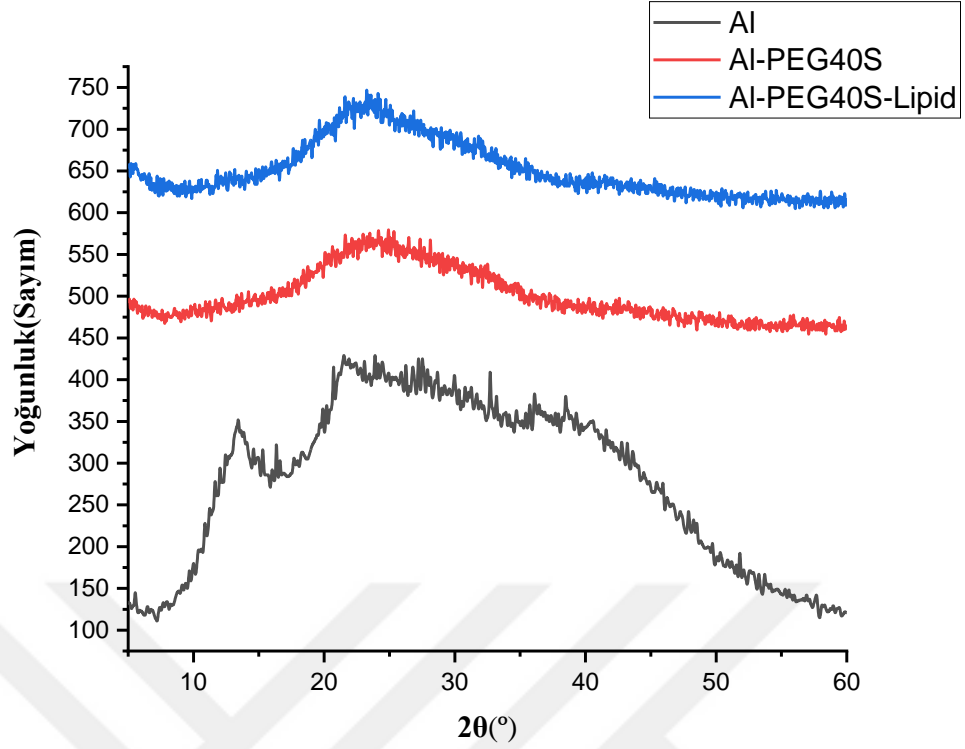
**Şekil 4.21:** Elde edilen %1Al-%0,25PEG40S ve %1Al-%0,25PEG40S-%0,25lipit içeren hidrojellerin FT-IR spektrumu.

### 4.5.3 Hidrojel filmlerin X- ışını kırınımı (XRD) yöntemi ile kristal yapı analizi

Aljinat hidrojel film yapılarına fiziksel olarak yüzey aktif madde ve lipitin, kristal yapı üzerine etkisini değerlendirmek için sodyum aljinat, PEG40-S, %1Al-%0,25PEG40S ve %1Al-%0,25PEG40-%0,25lipit formülasyonunda hazırlanan hidrojel örnekleri üzerinde yapılan XRD analizi Şekil 4.22 ve Şekil 4.23’de gösterilmektedir. Şekil 4.22 incelendiğinde PEG40S numunesinin  $2\theta = 19^\circ$ ,  $2\theta = 23^\circ$ ’te iki büyük piki  $2\theta = 26^\circ$  ve  $2\theta = 36^\circ$ ’da iki küçük piki bulunmaktadır. Şekil 4.23 incelendiğinde sodyum aljinata ait  $2\theta = 13^\circ$  ve  $2\theta = 21^\circ$  iki pik görülmektedir. Literatürde sodyum aljinatın  $\text{CaCl}_2$  ile çapraz bağlı hidrojel formunda  $2\theta = 13^\circ$ ’teki pikin kaybolduğu bilinmektedir [175]. Yine  $2\theta = 21^\circ$ ’de görülen pikin %1Al-%0,25 PEG40S ve %1 Al-%0,25 PEG40S-%0,25 lipit numunelerinde ise sırasıyla  $2\theta = 23^\circ$  ve  $2\theta = 24^\circ$ ’e kaydığı görülmektedir. Bu durum sodyum aljinatın PEG40S ve lipit ile oluşturulan hidrojel formunun düşük kristallığe sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar sodyum aljinatın, PEG40S ve lipit arasındaki güçlü fiziksel etkileşimlere, özellikle de  $\text{CaCl}_2$  çapraz bağlanmasının yol açtığı karmaşıklığa atfedilmektedir.



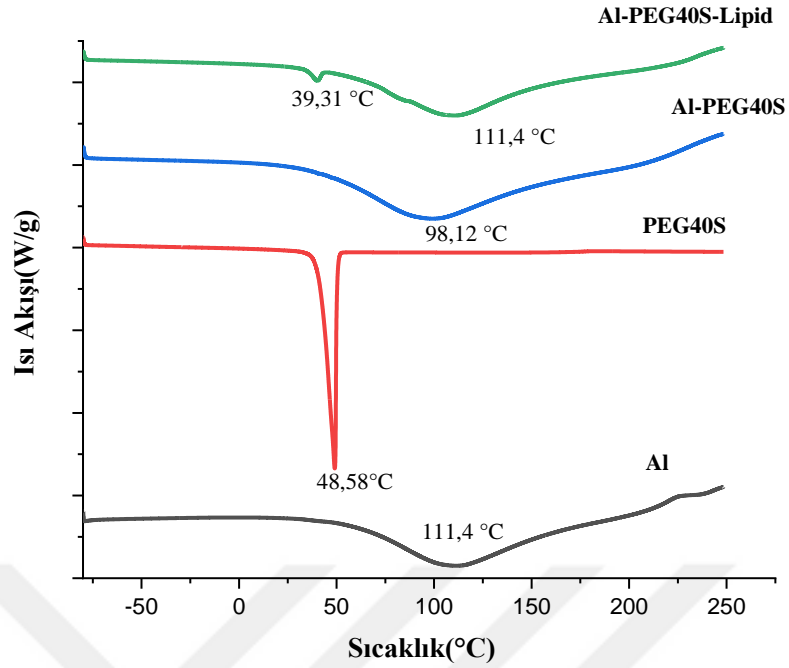
Şekil 4.22: Sodyum aljinat ve PEG40S’in XRD ölçüm sonucu grafiği.



**Şekil 4.23:** Sodyum aljinat, %1Al-%0,25PEG40S ve %1Al-%0,25PEG40S-%0,25lipit içeren hidrojel filmlerin XRD ölçümü sonucu grafiği.

#### 4.5.4 Hidrojel filmlerin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile termal özelliklerin analizi

Saf sodyum aljinatın, PEG40S'in ve %1Al-%0,25PEG40S ve %1Al-%0,25PEG40S-lipit içeren hidrojel numunelerinin camsı geçiş sıcaklıkları (T<sub>g</sub>) DSC ile belirlenmiştir. Örneklere ait DSC termogramları Şekil 4.24'te gösterilmektedir. Cam geçiş sıcaklığı, kristalimsi olmayan (şekilsiz) bir polimerin kırılğan, cam halinden lastiksi, yumuşak haline değiştiği sıcaklık aralığının yaklaşık orta noktası olarak tanımlanmaktadır. Aljinatlar kimyasal içeriğine göre 95°C ile 136°C arasında değişen T<sub>g</sub> değerleri olduğu bilinmektedir. Şekil 4.24'te saf sodyum aljinatın termogramı incelendiğinde, 111,4°C derece civarındaki endotermik pik camsı geçiş davranışını göstermektedir. PEG40S ise 48,5°C de T<sub>g</sub> değerine sahiptir. Al-PEG40S hidrojel film numunesinde ise T<sub>g</sub> değeri 98,12°C ye düşerek sodyum aljinata göre azalma eğilimindedir. Aljinatın Ca iyonlarıyla çapraz bağlı formunun T<sub>g</sub> değerinin saf SA ya göre bir az miktarda yüksek olduğu literatürdeki çalışmalardan bilinmektedir [176]. Bu yüzden bu azalmanın asıl sebebi PEG40S eklenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

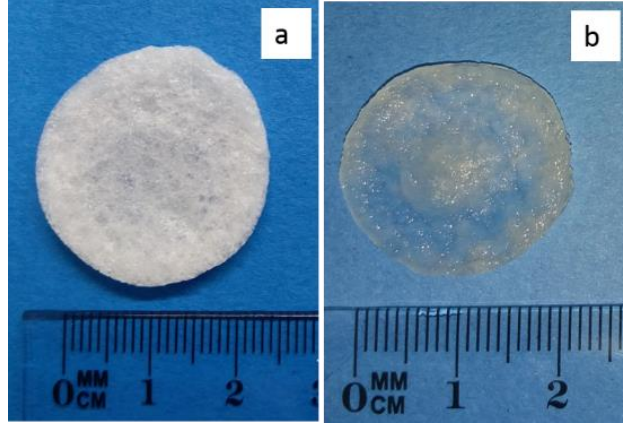


**Şekil 4.24:** Sodyum aljinat, PEG40S, %1 Al-%0,25PEG40S ve %1Al-%0,25PEG40S-%0,25lipit içeren hidrojel filmlerin DSC eğrileri.

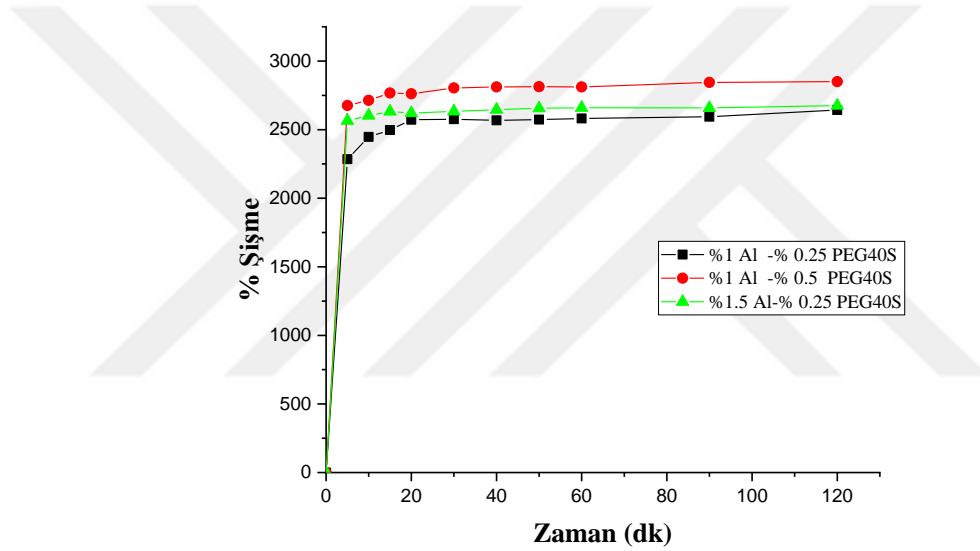
Al-PEG40S-Lipit içeren hidrojinin DSC eğrisi incelendiğinde ise biri 39,31°C’de ve diğeri 111,4 °C de iki pik bulunmaktadır. 39,31°C’deki zayıf ve küçük endotermik pik numune içeriğindeki lipitin faz geçişine ait olabilir. Literatürdeki diğçer çalışmalar, fosfolipitlerin (fosfatidilkolin) yaklaşık (40-43,6 °C) bu değerlerde Tg değerine sahip olduğunu desteklemektedir [177]. Şekil 4.24’de 39,31 °C’de faz geçişine atfedilen endotermik bir tepe görülmemektedir. Al-PEG40S örneğinde olduğu gibi Tg değerinde saf sodyum aljinata göre belirgin bir değişme meydana gelmemiştir.

#### 4.5.5 Hidrojel film yapılarının şişme testleri sonuçları

Su, dokuların temel bir bileşenidir ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak bir iskelenin su alma kabiliyeti kritik önem taşır. Mikroakışkan sistemde hazırlanan hidrojel filmlerin şişme davranışları distile su içerisinde 23°C’de incelenmiştir. Hidrojel şişme davranışına aljinat, PEG40S ve akış hızının etkisini gözlemlemek için 2, 3 ve 5 numaralı çözeltiler kullanılarak 50 ve 100 µl dk<sup>-1</sup> sıvı faz akış hızı oranında, 2,5 cm çapında ve 1 mm kalınlığında disk şeklinde hidrojel numuneleri hazırlanmıştır. Şekil 4.25 üretilen hidrojel diskleri göstermektedir. Hidrojellerin yüzde şişme (su alma) eğrileri 50 µl dk<sup>-1</sup> ve 100 µl dk<sup>-1</sup> için sırasıyla Şekil 4.26 ve Şekil 4.27’te gösterilmektedir.



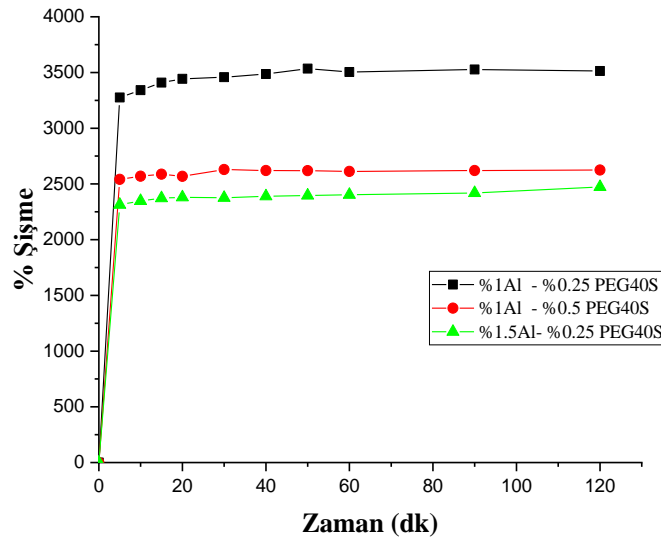
**Şekil 4.25:** Mikroakışkan sistemde hazırlanan hidrojel film yapıları a) Dondurularak kurutulmuş kuru hidrojel b) Distile suda şişmiş hidrojel.



**Şekil 4.26:** 50  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında farklı konsantrasyonlarda elde edilmiş hidrojellerin film yapılarının şişme eğrisi.

Grafikler incelendiğinde hidrojellerin çok kısa bir sürede denge şişme oranına geldiği görülmektedir. Bu yöntemle üretilen hidrojeller gözenek yoğunluğunun fazla olması nedeniyle, geleneksel hidrojellerden daha fazla yüzey alanına ve daha kısa difüzyon mesafesine sahiptir. Bu nedenle çok kısa bir sürede çok miktarda su absorblayabilirler. Bu özellikler kuru hidrojellerin su ile temasında çok hızlı bir şekilde çok hızlı su absorpsiyonuna ve şişmesine izin verdiği düşünülmektedir. Hidrojel filmlerin su alım kapasitesi, vücut sıvısının iskele yapısının tüm kısımlarına absorpsiyonu, besinlerin ve metabolik atıkların transferi ve yeni dokunun morfolojisini etkileyen hücre bağlanması gibi birçok hücresele olay için önemlidir [178]. Bu nedenle iskelelerin yüksek bir şişme oranına sahip olması beklenmektedir. Şekil 4.25 ve 4.26'ta ki şişme grafikleri

incelendiğinde, doku iskelesi olarak kullanımı planlanan hidrojel film yapılarının farklı akış hızında üretilmelerinin yüzde şişme oranlarını etkilediği görülmektedir. 50  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında üretilen hidrojellerin şişme oranlarında çok büyük farklılıklar olmamasına rağmen en yüksek şişme oranı %1Al-%0,5PEG40S, en düşük ise %1Al-%0,25PEG40S formülasyonunda hazırlanmış numunedir. Bu durum PEG40S'in hidrojinin hidrofilik yapısını arttırmasıyla açıklanabilir. Polimer konsantrasyonun artması beklenildiği gibi hidrojinin su alma kapasitesinde bir miktar artışa sebep olmuştur. 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında üretilen hidrojellerin şişme eğrileri incelendiğinde 50  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında üretilenlerden farklı olarak en yüksek su alım oranı %1Al-%0,25PEG40S formülasyonda üretilmiş hidrojelde görülmektedir. Aynı formülasyonda 50  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında üretilen hidrojele göre 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında hazırlanan hidrojel, %32,8 daha fazla şişme oranı göstermiştir. Bu etki akış hızına bağlı olarak küçülen hidrojel por büyüklüğü ile açıklanabilir. Akış hızının arttırılması gözenekliliği dolayısıyla birim alan yüzey alanını artması hidrojellerin su adsorpsiyon kapasitesini arttırmış olabilir. Ancak bu etki 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızlarında üretilen diğer hidrojellerde görülmemektedir. 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  sıvı akış hızında, %1Al-%0,5PEG40S ve %1.5Al-%0,25PEG40S formülasyonlarında hazırlanan hidrojeller, 50  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında üretilen hidrojellerle karşılaştırıldığında su alım kapasitesinin az miktarda azaldığı bulunmuştur.

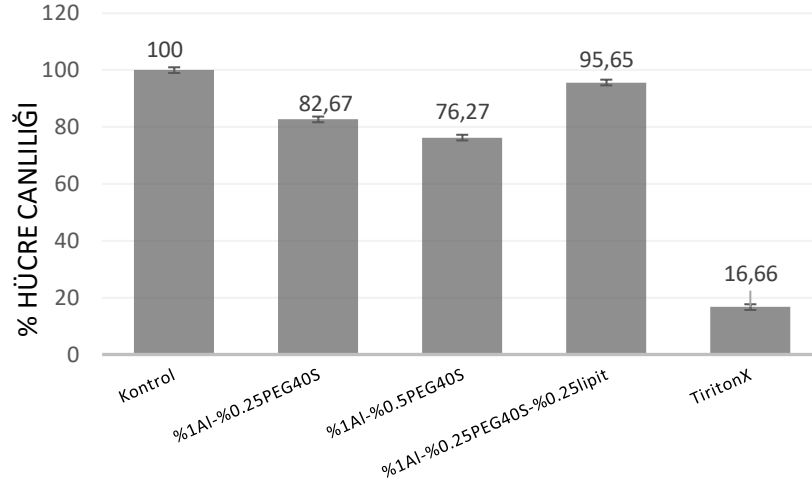


**Şekil 4.27:** 100  $\mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında farklı konsantrasyonlarda elde edilmiş hidrojellerin film yapılarının şişme eğrisi.

Her ne kadar akış hızının artırılarak gözenek boyutlarının küçülmesi birim alan başına düşen yüzeyi arttıracakını düşündürse de bu etkinin %1Al-%0,5PEG40S ve %1,5Al-%0,25PEG40S hidrojellerin su alım kapasitesi oranında etkili olmadığı gözlemlenmektedir.

#### **4.5.6 Hidrojel filmlerin sitotoksitete testi sonuçları**

Farklı PEG40S ve lipit konsantrasyonunda hazırlanan hidrojellerin hücre canlılığı ve çoğalması üzerinde herhangi bir sitotoksik etki oluşturup oluşturmayacağı Nötral Kırmızısı Alım (NKA) sitotoksitete testi ile araştırılmıştır. Bu amaçla doku iskelesi olarak kullanılması planlanan hidrojellerden olası toksik bir sızıntının varlığını anlamak için 72 saat serum içermeyen besi yerinde 37 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra bu besiyeri toksisitenin belirlenmesi için hücreler ekstraksiyon çözeltisini içeren besiyeri ortamına alınmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler nötral kırmızısı ile boyanmış canlı hücrelerin konsantrasyonu bir optik mikropilaya okuyucu ile belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak besi yeri ile muamele edilmeyen hücreler, pozitif kontrol olarak Triton kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.28'de gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlar hidrojellerin herhangi bir sitotoksik etki oluşturmadığını göstermektedir. Sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek hücre canlılığı oranının %1Al-%0,25PEG40S-%0,25lipit hidrojellerinde olmuştur. Hidrojellerde PEG40S konsantrasyonunun artması ise hücre canlılığı üzerinde negatif etki göstermektedir. %0,5 PEG40S içeren hidrojel %0,25 PEG içerenine göre hücre canlılığı %6,4 azalmıştır. Lipit içeren ve içermeyen hidrojel filmlerin hücre canlılığı oranları karşılaştırıldığında lipitli hidrojellerin hücre canlılığını ve çoğalmasını arttırdığı görülmektedir. Bu sonuçlar literatürde diğer yöntemlerle üretilen aljinat hidrojellerin sitotoksitete sonuçlarıyla uyumlu hücre canlılığı göstermektedir [179,180]. In vitro sitotoksitete üzerine yapılan ön araştırma, üretilen hidrojellerin Beas-2b hücrelerinde sitotoksik olmadığını göstermiştir. Her ne kadar birçok çalışma, aljinatın sitotoksik olmayan, biyolojik olarak çözünebilir ve biyolojik olarak uyumlu bir polimer olduğunu ortaya koymuş olsa da farklı yüzey aktif maddelerle oluşturulan formülasyonlarının sitotoksitete etkisi kontrol edilmesi gerekmektedir.



**Şekil 4.28:** Hidrojel film yapılarının Nötral Kırmızısı Alım sitotoksosite testi sonuçlarına göre hücre canlılığı.

Özellikle yüzey aktif maddelerin mikroakışkan sistemde kararlı eşdüze mikrobaloncukların üretimi için oldukça gerekli olduğu düşünüldüğünde, mikroakışkan sistemde üretilen bu yapıların biyouyumlulukları açısından hassasiyetle dikkate alınmalıdır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi olarak kullanılabilir çeşitli formlarda gözenekli aljinat/PEG40S/lipit film yapılarının mikroakışkan yöntem ile üretimi ve bu yapıların karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada T-şekilli bir mikroakışkan cihaz polimerik mikrobaloncukları üretmek için kullanılmıştır. Mikrobaloncuklardan iki farklı yöntem kullanılarak gözenekli yapıların oluşumu sağlanmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki polimerik çözeltilerden mikroakışkan cihaz vasıtasıyla üretilen mikrobaloncukların boyutları ve boyut dağılımları hesaplanmış film oluşumu ilk olarak cam bir altlık biriktirme ortamında biriktirilerek kurutulmaya bırakılmıştır. Çalışmanın diğer aşamasında ise mikrobaloncuklar bir petri kabında toplanarak  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi kullanılarak bir katılaştırma prosesi uygulanmıştır. Daha sonra elde edilen hidrojeller dondurarak kurutularak üç boyutlu gözenekli yapılar elde edilmiştir. Her iki yöntemle elde edilen gözenekli iskele yapılarının çeşitli yöntemlerle karakterizasyonu yapılmış ve biyoyuymulukları sitotoksikite testi ile değerlendirilmiştir.

Yürütülen çalışma kapsamında doku mühendisliği uygulamaları için doku iskelesi olarak kullanılabilir film yapılarının mikroakışkan sistem yöntemle üretiminden elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Elde edilen bulgulara göre çözeltilere ait özelliklerin mikrobaloncuk, film ve hidrojel film oluşumuna önemli etkileri olmaktadır. Polimerik çözeltinin aljinat konsantrasyonunun kütlece artması ile ortalama mikrobaloncuk çapını azaltmakta, yüzey aktif madde olarak kullanılan PEG40S'in kütlece konsantrasyonunun artması ise ortalama mikrobaloncuk çapında önemli bir farklılık oluşturmamaktadır. Ayrıca çözeltide lipit kullanımının mikrobaloncuk çapını önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır. Tüm bu etkiler, viskozite ve yüzey gerilimi gibi mikroakışkan sistem için önemli olan çözeltilerin özellikleriyle ilişkilendirilmiştir. Akış parametrelerinin değiştirilmesi mikrobaloncuk boyutları ve PDI'lerinde önemli değişiklikler oluşturmuştur. Bu bağlamda sıvı faz akış hızındaki artış mikrobaloncuk boyutunu azaltırken gaz basıncının artması mikrobaloncuk boyutunu arttırmaktadır.

- Cam altlık üzerinde film oluşumu için farklı konsantrasyonlarda çözeltiler kullanılmış ve film oluşturma potansiyelleri incelenmiştir. En iyi gözenekli film oluşumu %1Al-%0,5PEG40S ve %1Al-%0,25PEG40S-%0,25lipit içeren çözeltiden elde edilmiştir.
- Hidrojel film oluşumu için farklı aljinat ve PEG40S ve lipit konsantrasyonlarından çözeltilerle, farklı basınç ve akış hızlarında üretilen mikrobaloncuklar kullanılmıştır. Elde edilen filmlerin mikro yapıları polimerik mikrobaloncukların aljinat içeriğine göre farklılıklar göstermiştir. Aljinat içeriğinin artmasının gözenek bağlantılarını azalttığı sonucuna varılmıştır. Yüzey aktif madde olarak kullanılan PEG40S'in ise yüksek konsantrasyonlarda jelleşmeyi engelleyici etkisi olduğu düşünülmektedir. Lipit içeren mikrobaloncuklardan elde edilen hidrojel filmlerin ise içermeyene göre daha düzenli bir gözenek yapısı oluşturduğu SEM görüntülerinden saptanmıştır. Hidrojel gözenek boyutlarının iskele oluşumu için kullanılan mikrobaloncukların boyutlarına bağlı olarak değiştiği bulunmuştur. Buna göre mikrobaloncuklarda olduğu gibi akış hızının artması hidrojel filmin gözenek boyutlarını azaltmaktadır. Gaz basıncı artışı ise hidrojel filmlerin gözenek boyutlarında ve gözenekliliğinde artışa yol açmıştır.
- FT-IR sonuçları kullanılan polimer, yüzey aktif madde ve lipit arasında kimyasal olarak bağ oluşumu olmadığını doğrulamaktadır.
- X- ışını kırınımı (XRD) analizi hidrojel filmlerin kristalliğinin azaldığını göstermektedir.
- DSC analizi yapıda PEG40S kullanımının Tg değerini azalttığı lipit ilavesinin ise Tg' yi arttırdığını göstermektedir.
- Hidrojel filmlerin şişme testi sonuçları ise iskele gözenek boyutu ile su alma kapasitesi arasında doğrudan bir ilişki bulunmadığını göstermiştir.
- Biyouyumluluğun değerlendirilmesi için yapılan NKA testi hidrojellerin Beas-2b hücreleri için toksik olmadığını göstermektedir. En iyi hücre canlılığı lipit içeren hidrojel filmde görülmektedir.

Bu tez çalışması ile T-şekilli bir mikroakışkan sistem ile yüksek derecede tekdüze mikrobaloncuklardan gözenekli film ve hidrojel formunda doku iskelelerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışma konusunun özgünlüğü ve kapsamı açısından ülkemizde yapılan ilk tez çalışmasıdır. Bu çalışma sayesinde mikroakışkan sistemin doku mühendisliği uygulamalarında gözenekli yapıların üretimi için kullanılabilir

etkili ve yeni bir yöntem olduğu yurtiçinde yapılmış olan bu çalışma ile gösterilmiştir. Ayrıca çalışma kapsam olarak uluslararası özgünlüğe sahiptir. Literatürde daha önce mikroakışkan sistem parametrelerinin elde edilen filmler üzerindeki etkileri bu denli kapsamlı olarak araştırıldığı bir yayın henüz bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasının sonuçları sayesinde mikroakışkan sistemin doku mühendisliği uygulamalarında gözenekli yapıların oluşumu için etkili bir yöntem olduğu görölmektedir. Ayrıca bu çalışmada sunulan detaylı sonuçlar, bir mikroakışkan sistemde, istenilen formda iskele yapılarının üretilmesi için konsantrasyon, akış hızı, gaz basıncı ve kurutma yöntemi gibi çeşitli makroskopik özelliklerin seçimini kolaylaştırmaktadır. Çalışmaların bundan sonraki aşamalarında farklı polimer ve surfaktanların bu sistem için kullanılabilirliği değerlendirilebilir. Farklı biyopolimerlerin mikroakışkan sistemde iskele üretimi için kullanımı çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında etkili olabilir. Çalışmanın ileriki aşamalarında elde edilen yapıların mekanik özellikleri incelenebilir. Diğer önemli bir nokta ise iskele gözenek boyutunu ayarlanması için farklı boyutlarda mikro kanalların kullanılması olabilir. Mikro kanal boyutunun mikrobaloncuk boyutu üzerinde önemli etkisi çeşitli gözenek boyutlarında iskelelerin üretimi için farklı bir bakış açısı sağlanabilir.

## KAYNAKLAR

- [1] **Langer, R. & Vacanti, JP.** (1993). Tissue Engineering, *Science*, 260 (5), 920–926.
- [2] **Khan, F. & Tanaka, M.** (2018). Designing Smart Biomaterials for Tissue Engineering, *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (1), 1–14.
- [3] **Fioretta, ES., Dijkman, PE., Emmert, MY., Hoerstrup, SP.** (2018). The Future of Heart Valve Replacement: Recent Developments and Translational Challenges for Heart Valve Tissue Engineering, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12 (1), 323–335.
- [4] **Rahmani, S. & Mooney, DJ.** (2018). Tissue-Engineered Wound Dressings for Diabetic Foot Ulcers BT, *The Diabetic Foot: Medical and Surgical Management*, 247–256.
- [5] **Li, X. & Su, X.** (2018). Multifunctional Smart Hydrogels: Potential in Tissue Engineering and Cancer Therapy, *Journal of Materials Chemistry B*, 6 (29), 4714–4730.
- [6] **Bhatia, SN., Balis, UJ., Yarmush, ML., Toner, M.** (1999). Effect of Cell–Cell Interactions in Preservation of Cellular Phenotype: Cocultivation of Hepatocytes and Nonparenchymal Cells, *FASEB Journal*, 13 (14), 1883–1900.
- [7] **Chan, BP. & Leong, KW.** (2008). Scaffolding in Tissue Engineering: General Approaches and Tissue-Specific Considerations, *European Spine Journal*, 17 (4), 467–479.
- [8] **Furukawa, KS.** (2016). Tissue Engineering Approaches With/Without Scaffold, *International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS)*, Nagoya, Japonya.
- [9] **Mccarthy, M., A. Brown, T., Bukowska, J., Bunnell, B., Frazier, T., Wu, X. vd.** (2018). Therapeutic Applications for Adipose-Derived Stem Cells in Wound Healing and Tissue Engineering, *Current Stem Cell Reports*, 4, 1–11.
- [10] **Yue, B.** (2014). Biology of the Extracellular Matrix: An Overview, *Journal of Glaucoma*, 23 (8), 20–23.
- [11] **Hussey, GS., Dziki, JL., Badylak, SF.** (2018). Extracellular Matrix-Based Materials for Regenerative Medicine, *Nature Reviews Materials*, 3 (7), 159–173.
- [12] **Kim, BS. & Mooney, DJ.** (1998). Development of Biocompatible Synthetic Extracellular Matrices for Tissue Engineering, *Trends Biotechnology*, 6 (5), 224–230.

- [13] **Hinderer, S., Layland, SL., Schenke-Layland, K.** (2016). ECM and ECM-like Materials—Biomaterials for Applications in Regenerative Medicine and Cancer Therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 260–269.
- [14] **Jafari, M., Paknejad, Z., Rad, MR., Motamedian, SR., Eghbal, MJ., Nadjmi, N. vd.** (2017). Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering: A Literature Review, *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 105 (2), 431–459.
- [15] **Hutmacher, DW.** (2006). Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage, *Biomaterials Silver Jubilee Compendium*, 21, 175–189.
- [16] **O'Brien, FJ.** (2011). Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering, *Materials Today*, 14 (3), 88–95.
- [17] **Naahidi, S., Jafari, M., Logan, M., Wang, Y., Yuan, Y., Bae, H. vd.** (2017). Biocompatibility of Hydrogel-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications, *Biotechnology Advances*, 35 (5), 530–544.
- [18] **Naumenko, EA., Guryanov, ID., Yendluri, R., Lvov, YM., Fakhrullin, RF.** (2016). Clay Nanotube-Biopolymer Composite Scaffolds for Tissue Engineering, *Nanoscale*, 8 (13), 7257–7271.
- [19] **Babensee, JE., Anderson, JM., McIntire, L V., Mikos, AG.** (1998). Host Response to Tissue Engineered Devices, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 33 (1–2), 111–139.
- [20] **Asghari, F., Samiei, M., Adibkia, K., Akbarzadeh, A., Davaran, S.** (2017). Biodegradable and Biocompatible Polymers For Tissue Engineering Application: A Review, *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnology*, 45 (2), 185–192.
- [21] **Brown, BN., Valentin, JE., Stewart-Akers, AM., McCabe, GP., Badylak, SF.** (2009). Macrophage Phenotype and Remodeling Outcomes in Response To Biologic Scaffolds With and Without A Cellular Component, *Biomaterials*, 30 (8), 1482–1491.
- [22] **Hutmacher, DW.** (2000). Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage, Editör:Williams DFBT-TBSJC, *Oxford: Elsevier Science*, 175–189.
- [23] **Kuo, CK., Li, W-J., Mauck, RL., Tuan, RS.** (2006). Cartilage Tissue Engineering: Its Potential And Uses, *Current Opinion in Rheumatology*, 18 (1), 64-73.
- [24] **Price, GM., Wong, KHK., Truslow, JG., Leung, AD., Acharya, C., Tien, J.** (2010). Effect of Mechanical Factors on the Function of Engineered Human Blood Microvessels in Microfluidic Collagen Gels, *Biomaterials*, 31 (24), 6182–6189.
- [25] **Santamaría, VA., Deplaine, H., Marigió, D., Villanueva-Molines, AR., García-Aznar, JM., Ribelles, JLG. vd.** (2012). Influence of the Macro and Micro-Porous Structure on the Mechanical Behavior ff Poly(L-Lactic Acid) Scaffolds, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 358 (23), 3141–3149.
- [26] **Loh, QL. & Choong, C.** (2013). Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size, *Tissue Engineering Part B Reviews*, 19 (6), 485–502.
- [27] **Karande, T., Ong, LJ., Agrawal, CM.** (2003). Diffusion in Musculoskeletal Tissue Engineering Scaffolds: Design Issues Related to Porosity, Permeability,

Architecture, and Nutrient Mixing, *Annals of Biomedical Engineering*, 32 (12), 1728–1743.

[28] **Phelps, EA. & Garcia, AJ.** (2009). Update on therapeutic Vascularization Strategies, *Regenerative Medicine*, 4 (1), 65–80.

[29] **Ko, HCH., Milthorpe, BK., McFarland, CD.** (2007). Engineering Thick Tissues - The Vascularisation Problem, *European Cells & Materials*, 14, 1–18.

[30] **Zeltinger, J., Sherwood, JK., Graham, DA., Müller, R., Griffith, LG.** (2001). Adhesion , Proliferation , and Matrix Deposition, *Tissue Engineering*, 7 (5), 557–572.

[31] **Stevens, MM. & George, JH.** (2005). Exploring and Engineering the Cell Surface Interface, *Science*, 310 (5751), 1135–1138.

[32] **Berry, CC., Campbell, G., Spadicino, A., Robertson, M., Curtis, ASG.** (2004). The Influence of Microscale Topography on Fibroblast Attachment and Motility, *Biomaterials*, 25 (26), 5781–5788.

[33] **Murphy, CM., Haugh, MG., O'Brien, FJ.** (2010). The Effect of Mean Pore Size on Cell Attachment, Proliferation And Migration in Collagen-Glycosaminoglycan Scaffolds For Bone Tissue Engineering, *Biomaterials*, 31 (3), 461–466.

[34] **Lee, SJ., Choi, JS., Park, KS., Khang, G., Lee, YM., Lee, HB.** (2004). Response of MG63 Osteoblast-Like Cells onto Polycarbonate Membrane Surfaces With Different Micropore Sizes, *Biomaterials*, 25 (19), 4699–4707.

[35] **Lien, SM., Ko, LY., Huang, TJ.** (2009). Effect of Pore Size on ECM Secretion And Cell Growth in Gelatin Scaffold For Articular Cartilage Tissue Engineering, *Acta Biomaterialia*, 5 (2), 670–679.

[36] **Murphy, CM. & O'Brien, FJ.** (2010). Understanding the Effect of Mean Pore Size on Cell Activity in Collagen-Glycosaminoglycan Scaffolds, *Cell Adhesion & Migration*, 4 (3), 377–381.

[37] **Carr-brendel, JHBVE., Martinson, LA., Crudele, J., Johnston, WD., Johnson, RC., Healthcare, B. vd.** (1995). Neovascularization of Synthetic Membranes Directed, *Materials Research*, 29, 1517–1524.

[38] **Yannas, I V., Lee, E., Orgill, DP., Skrabut, EM., Murphy, GF.,** (1989). Synthesis and Characterization of A Model Extracellular Matrix That Induces Partial Regeneration of Adult Mammalian Skin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86 (3), 933–937.

[39] **Glorieux, FH., Tsai, DC., Sprague, SM., Whang, K., Nam, EK., Nuber, GW. vd.** (2007). Engineering Bone Regeneration with Bioabsorbable Scaffolds with Novel Microarchitecture, *Tissue Engineering*, 5 (1), 35–51.

[40] **Karageorgiou, V. & Kaplan, D.** (2005). Porosity of 3D biomaterial Scaffolds and Osteogenesis, *Biomaterials*, 26 (27), 5474–5491.

[41] **Mandal, BB. & Kundu, SC.** (2009). Cell Proliferation and Migration in Silk Fibroin 3D Scaffolds, *Biomaterials*, 30 (15), 2956–2965.

[42] **Rouwkema, J., Rivron, NC., Van Blitterswijk, CA.** (2008). Vascularization in Tissue Engineering, *Trends Biotechnology*, 26 (8), 434–441.

- [43] **Dunn, JCY., Chan, W-Y., Cristini, V., Kim, JS., Lowengrub, J., Singh, S. vd.** (2006). Analysis of Cell Growth in Three-Dimensional Scaffolds, *Tissue Engineering*, 12 (4), 705–716.
- [44] **Freed, LE., Marquis, JC., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G.** (1994). Kinetics of Chondrocyte Growth in Cell-Polymer Implants, *Biotechnology and Bioengineering*, 43 (7), 597–604.
- [45] **Kang, Y. & Chang, J.** (2018). Channels in A Porous Scaffold: A New Player For Vascularization, *Regenerative Medicine*, 13 (6), 705–715.
- [46] **Carrier, RL., Rupnick, M., Langer, R., Schoen, FJ., Freed, LE., Vunjak-Novakovic, G.** (2002). Effects of Oxygen on Engineered Cardiac Muscle, *Biotechnology and Bioengineering*, 78 (6), 617–625.
- [47] **Greenberg, S., Margulis, A., Garlick, JA.** (2005). In Vivo Transplantation of Engineered Human Skin, *Epidermal Cells*, Springer, 425–429.
- [48] **Mercado-Pagán, ÁE., Stahl, AM., Shanjani, Y., Yang, Y.** (2015). Vascularization in Bone Tissue Engineering Constructs, *Annals of Biomedical Engineering*, 43 (3), 718–729.
- [49] **Van Kelle, MAJ., Oomen, PJA., Janssen-van den Broek, WJT., Lopata, RGP., Loerakker, S., Bouten, CVC.** (2018). Initial Scaffold Thickness Affects the Emergence of A Geometrical and Mechanical Equilibrium in Engineered Cardiovascular Tissues, *Journal of the Royal Society Interface*, 15 (148).
- [50] **Walles, T., Herden, T., Haverich, A., Mertsching, H.** (2003). Influence of Scaffold Thickness and Scaffold Composition on Bioartificial Graft Survival, *Biomaterials*, 24 (7), 1233–1239.
- [51] **Hossain, KMZ., Felfel, RM., Ogbilikana, PS., Thakker, D., Grant, DM., Scotchford, CA. vd.** (2018). Single Solvent-Based Film Casting Method for the Production of Porous Polymer Films, *Macromolecular Materials and Engineering*, 303 (4), 1–7.
- [52] **Liu, Q., Tang, Z., Ou, B., Liu, L., Zhou, Z., Shen, S. vd.** (2014). Design, preparation, and application of ordered porous polymer materials, *Materials Chemistry and Physics*, 144 (3), 213–225.
- [53] **Mandal, BB., Priya, AS., Kundu, SC.** (2009). Novel silk sericin/gelatin 3-D scaffolds and 2-D films: Fabrication and characterization for potential tissue engineering applications, *Acta Biomaterialia*, 5 (8), 3007–3020.
- [54] **McHugh, K., Tao, S., Saint-Geniez, M.** (2013). A Novel Porous Scaffold Fabrication Technique for Epithelial and Endothelial Tissue Engineering, *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 24 (7), 1659-1670.
- [55] **Suntornond, R., An, J., Yeong, WY., Chua, CK.** (2015). Biodegradable Polymeric Films and Membranes Processing and Forming for Tissue Engineering, *Macromolecular Materials and Engineering*, 300 (9), 858–877.
- [56] **Domke, J. & Radmacher, M.** (1998). Measuring the Elastic Properties of Thin Polymer Films with the Atomic Force Microscope, *Langmuir*, 14 (12), 3320-3325.

- [57] **Tamanna, Nipu N.** (2019). Preparation and Characterization of Porous Scaffold Composite Films by Blending Carboxymethyl Chitosan and Gelatin for Tissue Engineering, *International Journal of Materials Science and Applications*, 7 (2), 62-68.
- [58] **Dai, N-T., Williamson, MR., Khammo, N., Adams, EF., Coombes, AGA.** (2004). Composite Cell Support Membranes Based on Collagen and Polycaprolactone for Tissue Engineering of Skin, *Biomaterials*, 25 (18), 4263–4271.
- [59] **Liu, M., Dai, L., Shi, H., Xiong, S., Zhou, C.** (2015). In Vitro Evaluation of Alginate/Halloysite Nanotube Composite Scaffolds for Tissue Engineering, *Materials Science and Engineering C*, 49, 700–712.
- [60] **Ozcelik, B., Brown, KD., Blencowe, A., Daniell, M., Stevens, GW., Qiao, GG.** (2013). Ultrathin Chitosan-Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel Films for Corneal Tissue Engineering, *Acta Biomaterialia*, 9 (5), 6594–6605.
- [61] **Han, F., Dong, Y., Su, Z., Yin, R., Song, A., Li, S.** (2014). Preparation, Characteristics and Assessment of A Novel Gelatin-Chitosan Sponge Scaffold As Skin Tissue Engineering Material, *International Journal of Pharmaceutics*, 476 (1), 124–133.
- [62] **Shi, Y., Wang, Y., Zhang, P.** (2014). Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering, *Inflammation and Regeneration*, 34 (1), 23–32.
- [63] **Shalumon, KT., Chennazhi, KP., Nair, S V., Jayakumar, R.** (2013). High Thick Layer-by-Layer 3D Multiscale Fibrous Scaffolds for Enhanced Cell Infiltration and It's Potential in Tissue Engineering, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 9 (12), 2117–2122.
- [64] **Rana, D., Ratheesh, G., Ramakrishna, S., Ramalingam, M.** (2017). Nanofiber Composites in Cartilage Tissue Engineering, *Nanofiber Composites for Biomedical Applications. Elsevier*, 325–344.
- [65] **Banerjee A, Ganguly S.** (2019). Alginate–Chitosan Composite Hydrogel Film with Macrovoids in the Inner Layer for Biomedical Applications, *Journal of Applied Polymer Science*, 136 (22), 30–33.
- [66] **Van Vlierberghe, S., Graulus, GJ., Samal, SK., Van Nieuwenhove, I., Dubruel, P.** (2014). Porous Hydrogel Biomedical Foam Scaffolds for Tissue Repair: Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications, *Woodhead Publishing Limited*; 335–390.
- [67] **Chaudhari, AA., Vig, K., Baganizi, DR., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V. vd.** (2016). Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review, *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (12).
- [68] **Zhong, SP., Zhang, YZ., Lim, CT.** (2010). Tissue Scaffolds for Skin Wound Healing and Dermal Reconstruction, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2 (5), 510–525.
- [69] **Crabb, RAB., Chau, E., Evans, M., Barocas, V., Hubel, A.** (2006). Collagen Film-Based Corneal Stroma Equivalent, *Tissue Engineering*, 12 (6), 1565–1575.

- [70] Sun, F., Zhou, H., Lee, J. (2011). Various Preparation Methods of Highly Porous Hydroxyapatite/Polymer Nanoscale Biocomposites for Bone Regeneration, *Acta Biomaterialia*, 7 (11), 3813–3828.
- [71] Hillmann, G., Steinkamp-Zucht, A., Geurtsen, W., Gross, G., Hoffmann, A. (2002). Culture of Primary Human Gingival Fibroblasts on Biodegradable Membranes, *Biomaterials*, 23 (6), 1461–1469.
- [72] Bozkurt, A., Apel, C., Sellhaus, B., Van Neerven, S., Wessing, B., Hilgers, R.D. vd. (2014). Differences in Degradation Behavior of Two Non-Cross-Linked Collagen Barrier Membranes: An In Vitro And In Vivo Study, *Clinical Oral Implants Research*, 25 (12), 1403–1411.
- [73] Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S., Schenke-Layland, K. (2012). Skin Tissue Engineering-In Vivo and In Vitro Applications, *Clinics in Plastic Surgery*, 39 (1), 33–58.
- [74] Mohammadi, S., Ramakrishna, S., Laurent, S., Shokrgozar, MA., Semnani, D., Sadeghi, D. vd. (2019). Fabrication of Nanofibrous PVA/Alginate-Sulfate Substrates for Growth Factor Delivery, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107 (2), 403–413.
- [75] Park, H., Cannizzaro, C., Vunjak-Novakovic, G., Langer, R., Vacanti, CA., Farokhzad, OC. (2007). Nanofabrication and Microfabrication of Functional Materials for Tissue Engineering, *Tissue Engineering*, 13 (8), 1867–1877.
- [76] Yang, S., Leong, K-F., Du, Z., Chua, C-K. (2001). The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors, *Tissue Engineering*, 7 (1), 679–689.
- [77] Liu, X. & Ma, PX. (2009). Phase Separation, Pore Structure, and Properties of Nanofibrous Gelatin Scaffolds, *Biomaterials*, 30 (25), 4094–4103.
- [78] Nam, YS. & Park, TG. (1999). Biodegradable Polymeric Microcellular Foams by Modified Thermally Induced Phase Separation Method, *Biomaterials*, 20 (19), 1783–1790.
- [79] La Carrubba, V., Carfi Pavia, F., Brucato, V., Piccarolo S. (2008). PLLA/PLA Scaffolds Prepared via Thermally Induced Phase Separation (TIPS): Tuning of Properties and Biodegradability, *International Journal of Material Forming*, 1, 619–622.
- [80] Akbarzadeh, R. & Yousefi, AM. (2014). Effects of Processing Parameters in Thermally Induced Phase Separation Technique on Porous Architecture of Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterial*, 102 (6), 1304–1315.
- [81] Brougham, CM., Levingstone, TJ., Shen, N., Cooney, GM., Jockenhoevel, S., Flanagan, TC. vd. (2017). Freeze-Drying As A Novel Biofabrication Method for Achieving A Controlled Microarchitecture within Large, Complex Natural Biomaterial Scaffolds, *Advanced Healthcare Materials*, 6 (21).
- [82] Hatton, J., Davis, GR., Mourad, A-HI., Cherupurakal, N., Hill, RG., Mohsin, S. (2019). Fabrication of Porous Bone Scaffolds Using Alginate and Bioactive Glass, *Journal of Functional Biomaterials*, 10 (1), 15.

- [83] Kang, H-W., Tabata, Y., Ikada, Y. (1999). Fabrication of Porous Gelatin Scaffolds for Tissue Engineering, *Biomaterials*, 20 (14), 1339–1344.
- [84] O'Brien, FJ., Harley, BA., Yannas, I V., Gibson, L. (2004). Influence of Freezing Rate on Pore Structure in Freeze-Dried Collagen-GAG Scaffolds, *Biomaterials*, 25 (6), 1077–1086.
- [85] Zulkifli, FH., Hussain, FSJ., Harun, WSW., Yusoff, MM. (2019). Highly Porous of Hydroxyethyl Cellulose Biocomposite Scaffolds for Tissue Engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 562–571.
- [86] Mikos, AG., Thorsen, AJ., Czerwonka, LA., Bao, Y., Langer, R., Winslow, DN. vd. (1994). Preparation and Characterization of Poly(L-Lactic Acid) Foams, *Polymer*, 35 (5), 1068–1077.
- [87] Sola, A., Bertacchini, J., D'Avella, D., Anselmi, L., Maraldi, T., Marmioli, S. vd. (2019). Development of Solvent-Casting Particulate Leaching (SCPL) Polymer Scaffolds As Improved Three-Dimensional Supports to Mimic the Bone Marrow Niche, *Materials Science and Engineering C*, 96, 153–165.
- [88] Liao, C., Chen, C., Chen, J., Chiang, S., Lin, Y., Chang, K. (2002). Fabrication of Porous Biodegradable Polymer Scaffolds Using A Solvent Merging/Particulate Leaching Method, *Journal of Biomedical Materials Research*, 59 (4), 676-681.
- [89] Echalié, C., Jebors, S., Laconde, G., Brunel, L., Verdié, P., Causse, L., vd. (2017). Sol-gel Synthesis of Collagen-Inspired Peptide Hydrogel, *Materials Today*, 20 (2), 59–66.
- [90] Pereira, MM., Jones, JR., Hench, LL. (2005). Bioactive Glass and Hybrid Scaffolds Prepared by Sol-Gel Method for Bone Tissue Engineering, *Advances in Applied Ceramics*, 104 (1), 35–42.
- [91] Chen, Q-Z., Li, Y., Jin, L-Y., Quinn, JMW., Komesaroff, PA. (2010). A New Sol-Gel Process for Producing Na<sub>2</sub>O-Containing Bioactive Glass Ceramics, *Acta Biomaterialia*, 6 (10), 4143–4153.
- [92] Dehghani, F. & Annabi, N. (2011). Engineering Porous Scaffolds Using Gas-Based Techniques, *Current Opinion Biotechnology*, 22 (5), 661–666.
- [93] Mooney, DJ., Baldwin, DF., Suht, NP., Vacantis, JP., Langer, R. (1996). Novel Approach To Fabricate Porous Sponges Of Poly (D, L-Lactic-Co-Glycolic Acid) Without The Use Of Organic Solvents, *Biomaterials*, 17 (14), 1417–1422.
- [94] Manavitehrani, I., Le, TYL., Daly, S., Wang, Y., Maitz, PK., Schindeler, A. vd. (2019). Formation of porous biodegradable scaffolds based on poly(propylene carbonate) using gas foaming technology, *Materials Science and Engineering C*, 96, 824–830.
- [95] Kim, HJ., Park, IK., Kim, JH., Cho, CS., Kim, MS. (2012). Gas Foaming Fabrication of Porous Biphasic Calcium Phosphate for Bone Regeneration, *Tissue Engineering Regenerative Medicine*, 9 (2), 63–68.
- [96] Salerno, A., Oliviero, M., Di Maio, E., Iannace, S., Netti, PA. (2009). Design of Porous Polymeric Scaffolds by Gas Foaming of Heterogeneous Blends, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20 (10), 2043–2051.

- [97] **Barbetta, A., Barigelli, E., Dentini, M.** (2009). Porous Alginate Hydrogels: Synthetic Methods for Tailoring the Porous Texture, *Biomacromolecules*, 10 (8), 2328–2337.
- [98] **Poursamar, SA., Hatami, J., Lehner, AN., da Silva, CL., Ferreira, FC., Antunes, APM.** (2015). Gelatin Porous Scaffolds Fabricated Using A Modified Gas Foaming Technique: Characterisation and Cytotoxicity Assessment, *Materials Science and Engineering C*, 48, 63–70.
- [99] **Keskar, V., W Marion, N., Mao, J., Gemeinhart, R.** (2009). In Vitro Evaluation of Macroporous Hydrogels to Facilitate Stem Cell Infiltration, Growth, and Mineralization, *Tissue engineering. Part A*, 15, 1695–1707 .
- [100] **Catanzano, O., Soriente, A., La Gatta, A., Cammarota, M., Ricci, G., Fasolino, I. vd.** (2018). Macroporous Alginate Foams Crosslinked with Strontium for Bone Tissue Engineering, *Carbohydrate Polymers*, 202, 72–83.
- [101] **Rapp, F., Schneider, A., Elsner, P.** (2014). Biopolymer Foams - Relationship Between Material Characteristics and Foaming Behavior of Cellulose Based Foams, *The 29th International Conference of the Polymer Processing Society, AIP Conference Proceedings*.(ss: 362–366). Nürnberg, Temmuz 15–19.
- [102] **Kmetty, Á., Litauszki, K., Réti, D.** (2018). Characterization of Different Chemical Blowing Agents and Their Applicability to Produce Poly(Lactic Acid) Foams by Extrusion, *Applied Sciences*, 8 (10), 1960, 1-17.
- [103] **Costantini, M. & Barbetta, A.** (2017). Gas Foaming Technologies for 3D Scaffold Engineering, Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds: Materials, Technologies, And Applications, *Elsevier*, 127–149.
- [104] **Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I. vd.** (2017). Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the Art and New Perspectives, *Materials Science and Engineering C*, 78, 1246–1262.
- [105] **Liu, X. & X Ma, P.** (2004). Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Annals of Biomedical Engineering*, 32 (3), 477–486.
- [106] **Li, W., Laurencin, CT., Caterson, EJ., Tuan, RS., Ko, FK.** (2002). Electrospun Nanofibrous Structure: A Novel Scaffold for Tissue Engineering, *Journal of Biomedical Materials Research*, 60 (4), 613–621.
- [107] **Wu, J., Liu, S., He, L., Wang, H., He, C., Fan, C. vd.** (2012). Electrospun Nanoyarn Scaffold and Its Application in Tissue Engineering. *Materials Letters*, 89, 146–149.
- [108] **Nam, J., Huang, Y., Agarwal, S., Lannutti, J.** (2008). Materials Selection and Residual Solvent Retention in Biodegradable Electrospun Fibers, *Journal of Applied Polymer Science*, 107, 1547–1554.
- [109] **Vaquette, C. & Cooper-White, J.** (2013). A Simple Method for Fabricating 3-D Multilayered Composite Scaffolds, *Acta Biomaterialia*, 9 (1), 4599–4608.
- [110] **Pfister, A., Landers, R., Laib, A., Hübner, U., Schmelzeisen, R., Mülhaupt, R.** (2004). Biofunctional Rapid Prototyping for Tissue-Engineering Applications: 3D Bioplotting versus 3D Printing, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42, 624–638.

- [111] Sachlos, E., Czernuszka, JT., Gogolewski, S., Dalby, M. (2003). Making Tissue Engineering Scaffolds Work. Review on the Application of Solid Freeform Fabrication Technology to the Production of Tissue Engineering scaffolds, *European Cells & Materials Journal*, 5, 29–40.
- [112] Duan, B., Hockaday, LA., Kang, KH., Butcher, JT. (2013). 3D Bioprinting of Heterogeneous Aortic Valve Conduits with Alginate/Gelatin Hydrogels, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A (5), 1255–1264.
- [113] An, J., Teoh, JEM., Suntornnond, R., Chua, CK. (2015). Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues, *Engineering*, 1 (2), 261–268.
- [114] Do, AV., Khorsand, B., Geary, SM., Salem, AK. (2015). 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications, *Advanced Healthcare Materials*, 4 (12), 1742–1762.
- [115] Vijayavenkataraman, S., Yan, W-C., Lu, WF., Wang, C-H., Fuh, JYH. (2018). 3D Bioprinting of Tissues and Organs for Regenerative Medicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132, 296–332.
- [116] Cho, DD. & Yoo, HJ. (2015). Microfabrication Methods for Biodegradable Polymeric Carriers for Drug Delivery System Applications: A Review, *Journal of Microelectromechanical Systems*, 24 (1), 10–18.
- [117] Shembekar, N., Chaipan, C., Utharala, R., Merten, CA. (2016). Droplet-based Microfluidics in Drug Discovery, Transcriptomics and High-Throughput Molecular Genetics, *Lab on a Chip*, 16 (8), 1314–1331.
- [118] Wang, K., Xie, L., Lu, Y., Luo, G. (2013). Generating Microbubbles in A Co-Flowing Microfluidic Device, *Chemical Engineering Science*, 100, 486–495.
- [119] Teh, S-Y., Lin, R., Hung, L-H., Lee, AP. (2008). Droplet Microfluidics, *Lab on a Chip*, 8 (2), 198–220.
- [120] Seemann, R., Brinkmann, M., Pfohl, T., Herminghaus, S. (2012). Droplet Based Microfluidics, *Reports on Progress in Physics Reports on Progress in Physics*, 75 (1), 1–41.
- [121] Kucuk, I. & Edirisinghe, M. (2014). Microfluidic Preparation of Polymer Nanospheres, *Journal of Nanoparticle Research*, 16 (12), 1-9.
- [122] Costantini, M., Colosi, C., Mozetic, P., Jaroszewicz, J., Tosato, A., Rainer, A. vd. (2016). Correlation between porous texture and cell seeding efficiency of gas foaming and microfluidic foaming scaffolds, *Materials Science and Engineering C*, 2, 668–677.
- [123] Li, W-J., Jiang, YJ., Tuan, RS. (2008). Cell–Nanofiber-Based Cartilage Tissue Engineering Using Improved Cell Seeding, Growth Factor, and Bioreactor Technologies, *Tissue Engineering Part A*, 14 (5), 639–648.
- [124] Harley, BAC., Kim, H-D., Zaman, MH., Yannas, I V., Lauffenburger, DA., Gibson, LJ. (2008). Microarchitecture of Three-Dimensional Scaffolds Influences Cell Migration Behavior via Junction Interactions, *Biophysical Journal*, 95 (8), 4013–4024.

- [125] Agrawal, CM., McKinney, JS., Lanctot, D., Athanasiou, KA. (2000). Effects of Fluid Flow on the In Vitro Degradation Kinetics of Biodegradable Scaffolds for Tissue Engineering, *Biomaterials*, 21 (23), 2443–2452.
- [126] Wu, L. & Ding, J. (2005). Effects of Porosity and Pore Size on In Vitro Degradation of Three-Dimensional Porous Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Scaffolds For Tissue Engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 75A (4), 767–777.
- [127] Lo, YP., Liu, YS., Rimando, MG., Ho, JHC., Lin, KH., Lee, OK. (2016). Three-Dimensional Spherical Spatial Boundary Conditions Differentially Regulate Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells, *Scientific Reports*, 6 (2), 1–14.
- [128] Lin, JY., Lin, WJ., Hong, WH., Hung, WC., Nowotarski, SH., Gouveia, SM. vd. (2011). Morphology and Organization of Tissue Cells in 3D Microenvironment of Monodisperse Foam Scaffolds, *Soft Matter*, 7 (21), 10010–10016.
- [129] Perets, A., Baruch, Y., Weisbuch, F., Shoshany, G., Neufeld, G., Cohen, S. (2003). Enhancing The Vascularization of Three-Dimensional Porous Alginate Scaffolds by Incorporating Controlled Release Basic Fibroblast Growth Factor Microspheres, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 65A (4), 489–497.
- [130] Chung, BG., Lee, K-H., Khademhosseini, A., Lee, S-H. (2012). Microfluidic Fabrication of Microengineered Hydrogels and Their Application in Tissue Engineering, *Lab on a Chip*, 12 (1), 45–59.
- [131] Costantini, M., Colosi, C., Jaroszewicz, J., Tosato, A., Wiğszkowski, W., Dentini, M, vd. (2015). Microfluidic Foaming: A Powerful Tool for Tailoring the Morphological and Permeability Properties of Sponge-like Biopolymeric Scaffolds, *ACS Applied Material Interfaces*, 7 (42), 23660–23671.
- [132] Wang, B., Prinsen, P., Wang, H., Bai, Z., Luque, R. vd. (2017). Macroporous Materials: Microfluidic Fabrication, Functionalization and Applications, *Chemical Society Reviews*, 46 (3), 855–914.
- [133] Zhang, H., Tumarkin, E., Peerani, R., Nie, Z., Sullan, RMA., Walker, GC. vd. (2006). Microfluidic Production of Biopolymer Microcapsules with Controlled Morphology, *Journal of the American Chemical Society*, 128 (37), 12205–12210.
- [134] Stride, E. & Edirisinghe, M. (2009). Novel Preparation Techniques for Controlling Microbubble Uniformity: A Comparison, *Medical & Biological Engineering & Computing*, 47 (8), 883–892.
- [135] Kucuk, I., Ahmad, Z., Edirisinghe, M., Orlu-Gul, M. (2014). Utilization of Microfluidic V-Junction Device to Prepare Surface Itraconazole Adsorbed Nanospheres, *International Journal of Pharmaceutics*, 472 (1–2), 339–346.
- [136] Liu, H. & Zhang, Y. (2009). Droplet Formation in A T-Shaped Microfluidic Junction, *Journal of Applied Physics*, 106 (3), 1-20.
- [137] Elsayed, M., Huang, J., Edirisinghe, M. (2015). Bioinspired Preparation of Alginate Nanoparticles Using Microbubble Bursting, *Materials Science and Engineering C*, 46, 132–139.

- [138] Stone, HA., Stroock, AD., Ajdari, A. (2004). Engineering in Small Devices: Microfluidics Toward a Lab-on-a-Chip, *Annual Review of Fluid Mechanics*, 36 (1), 381–411.
- [139] Garstecki, P., Gitlin, I., DiLuzio, W., Whitesides, GM., Kumacheva, E., Stone, HA. (2004). Formation of Monodisperse Bubbles in a Microfluidic Flow-Focusing Device, *Applied Physics Letters*, 85 (13), 2649–2651.
- [140] Parhizkar, M., Edirisinghe, M., Stride, E. (2013). Effect of operating Conditions and Liquid Physical Properties on the Size Of Monodisperse Microbubbles Produced in A Capillary Embedded T-Junction Device, *Microfluid Nanofluidics*, 14 (5), 797–808.
- [141] Christopher, GF. & Anna, SL. (2007). Microfluidic Methods for Generating Continuous Droplet Streams, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40 (19), 319-336.
- [142] Deng, N-N., Meng, Z-J., Xie, R., Ju, X-J., Mou, C-L., Wang, W. vd. (2011). Simple and Cheap Microfluidic Devices for the Preparation of Monodisperse Emulsions, *Lab on a Chip*, 11 (23), 3963-3972.
- [143] Kucuk, I. & Edirisinghe, M. (2015). Changing the Size and Surface Roughness of Polymer Nanospheres Formed Using a Microfluidic Technique, *Jom*, 67 (4), 811–817.
- [144] Garstecki, P., J Fuerstman, M., A Stone, H., M Whitesides, G. (2006). Formation of Droplets and Bubbles in A Microfluidic T-Junction - Scaling And Mechanism of Break-Up, *Lab on a chip*, 6, 437–446.
- [145] Xu, J., Li, S., Chen, G., Luo, G. (2006). Formation of Monodisperse Microbubbles in A Microfluidic Device, *AIChE Journal*, 52, 2254–2259.
- [146] Xu, J., Li, S., Tan, J., J Wang, Y., Luo, G. (2006). Preparation of Highly Monodisperse Droplet in A T-Junction Microfluidic Device, *AIChE Journal*, 52, 3005–3010.
- [147] Xu, J., Li, S., Wang, YJ., Luo, G. (2006). Controllable Gas-Liquid Phase Flow Patterns and Monodisperse Microbubbles in A Microfluidic T-Junction Device, *Applied Physics Letters*, 88 (13), 133506.
- [148] Thorsen, T., Roberts, RW., Arnold, FH., Quake, SR. (2001). Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device, *Physical Review Letters*, 86 (18), 4163–4166.
- [149] Tice, JD., Lyon, AD., Ismagilov, RF. (2004). Effects of Viscosity on Droplet Formation and Mixing in Microfluidic Channels, *Analytica Chimica Acta*, 507 (1), 73–77.
- [150] Yang, L-J., J Yao, T., L Huang, Y., Xu, Y., C Tai, Y. (2004). The Marching Velocity of the Capillary Meniscus in a Microchannel, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 14 (2), 220–225.
- [151] Parhizkar, M., Edirisinghe, M., Stride, E. (2015). The Effect of Surfactant Type and Concentration on the Size and Stability of Microbubbles Produced in a Capillary Embedded T-Junction Device, *RSC Advances*, 5 (14), 10751–10762.

- [152] **Van der Graaf, S., Schroën, C., Van der Sman, RGM., Boom, RM.** (2004). Influence of Dynamic Interfacial Tension on Droplet Formation During Membrane Emulsification, *Journal of Colloid and Interface Science*, 277 (2), 456–463.
- [153] **Wehking, JD., Gabany, M., Chew, L., Kumar, R.** (2014). Effects of Viscosity, Interfacial Tension, and Flow Geometry on Droplet Formation in a Microfluidic T-Junction, *Microfluid Nanofluidics*, 16 (3), 441–453.
- [154] **Nie, Z., Seo, MS., Xu, S., Lewis, PC., Mok, M., Kumacheva, E. vd.** (2008). Emulsification in a Microfluidic Flow-Focusing Device: Effect of the Viscosities of the Liquids, *Microfluid Nanofluidics*, 5 (5), 585–594.
- [155] **Nekouei, M. & Vanapalli, SA.** (2017). Volume-of-Fluid Simulations in Microfluidic T-Junction Devices: Influence of Viscosity Ratio on Droplet Size, *Physics of Fluids*, 29 (3), 032007.
- [156] **Lee, KY. & Mooney, DJ.** (2012). Alginate: Properties and Biomedical Applications, *Progress in Polymer Science*, 37 (1), 106–126.
- [157] **Augst, AD., Kong, HJ., Mooney, DJ.** (2006). Alginate Hydrogels as Biomaterials, *Macromolecular Bioscience*, 6, 623–633.
- [158] **Sun, J. & Tan, H.** (2013). Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications, *Materials (Basel)*, 6, 1285–1309.
- [159] **Cai, Y., Wu, F., Yu, Y., Liu, Y., Shao, C., Gu, H., Li, M., Zhao, Y.** (2019). *Acta Biomaterialia*, 84, 222-230.
- [160] **Wu, KH., Mei, C., Lin, CW., Yang, KC., Yu, J.** (2017). The Influence of Bubble Size on Chondrogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells in Gelatin Microbubble Scaffolds, *Journal of Materials Chemistry B*, 6 (1), 125–132.
- [161] **Andrieux, S. Drenckhan, W., Stubenrauch, C.** (2018). Generation of Solid Foams with Controlled Polydispersity Using Microfluidics, *Langmuir*, 34 (4), 1581–1590.
- [162] **Chung, KY., Mishra, NC., Wang, CC., Lin FH., Lin KH.** (2009). Fabricating Scaffolds by Microfluidics, *Biomicrofluidics*, 3 (2), 1–8.
- [163] **Wang, CC., Yang, KC., Lin, KH., Liu, HC., Lin, FH.** (2011). A Highly Organized Three-Dimensional Alginate Scaffold for Cartilage Tissue Engineering Prepared by Microfluidic Technology, *Biomaterials*, 32 (29), 7118–7126.
- [164] **Elsayed, M., Kothandaraman, A., Edirisinghe, M., Huang, J.** (2016). Porous Polymeric Films from Microbubbles Generated Using a T-Junction Microfluidic Device, *Langmuir*, 32 (50), 13377–13385.
- [165] **Colosi, C., Costantini, M., Barbetta, A., Pecci, R., Bedini, R., Dentini, M.** (2013). Morphological Comparison of PVA Scaffolds Obtained by Gas Foaming and Microfluidic Foaming Techniques, *Langmuir*, 29 (1), 82–91.
- [166] **Herrero, EP., Valle, EMM Del., Galán, MA.** (2006). Development of a New Technology for the Production of Microcapsules Based in Atomization Processes, *Chemical Engineering Journal*, 117 (2), 137–142.
- [167] **Lhuissier, H. & Villermaux, E.** (2012). Bursting Bubble Aerosols. *Journal of Fluid Mechanics*, 696, 5–44.

- [168] **Li, D.** (1996). Coalescence between Small Bubbles: Effects of Surface Tension Gradient and Surface Viscosities, *Journal of Colloid and Interface Science*, 181 (1), 34–44.
- [169] **Segers, T., De Rond, L., De Jong, N., Borden, M., Versluis, M.** (2016). Stability of Monodisperse Phospholipid-Coated Microbubbles Formed by Flow-Focusing at High Production Rates, *Langmuir*, 32 (16), 3937–3944.
- [170] **Borden, MA. & Longo, ML.** (2002). Dissolution Behavior of Lipid Monolayer-Coated, Air-Filled Microbubbles: Effect of Lipid Hydrophobic Chain Length, *Langmuir*, 18 (24), 9225–9233.
- [171] **Borden, MA., Pu, G., Runner, G.J., Longo, ML.** (2004). Surface Phase Behavior and Microstructure of Lipid/PEG-Emulsifier Monolayer-Coated Microbubbles, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 35 (3–4), 209–223.
- [172] **Hamzah, S., Nora'aini, A., M.A, M.** (2010). The Influence of Polymer Concentration on Performance and Morphology of Asymmetric Ultrafiltration Membrane for Lysozyme Separation, *Journal of Applied Sciences*. 10 (24), 3325-3330.
- [173] **Moonprasith, N., Sanguanthamarong, P., Kongkaew, C., Loykulnant, S.** (2008). Effect of Surfactant on Gelation of Hydroxypropylmethyl Cellulose in Skim Natural Rubber Latex Serum, *The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society*, 18 (2), 89–91.
- [174] **Talu, E., Lozano, MM., Powell, RL., Dayton, PA., Longo, ML.** (2006). Long-term Stability by Lipid Coating Monodisperse Microbubbles Formed by A Flow-Focusing Device, *Langmuir*, 22 (23), 9487–9490.
- [175] **Qu, B., Li, J., Xiao, H., He, B., Qian, L-Y.** (2015). Facile Preparation and Characterization of Sodium Alginate/Graphite Conductive Composite Hydrogel, *Polymer Composites*, 37 (10), 3050-3056.
- [176] **Simpliciano, C., Clark, L., Asi, B., Chu, N., Mercado, M., Diaz, S. vd.** (2013). Cross-Linked Alginate Film Pore Size Determination Using Atomic Force Microscopy and Validation Using Diffusivity Determinations, *Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology*, 3 (4), 1–12.
- [177] **Guo, Y., Ma, J., Lv, Z., Zhao, N., Wang, L., Li, Q.** (2018). The Effect of Plasticizer on the Shape Memory Properties of Poly (Lactide Acid)/Poly (Ethylene Glycol) Blends, *Journal of Materials Research and Technology*, 33 (23), 4101–4112.
- [178] **Zhu, J. & Marchant, RE.** (2011). Design Properties of Hydrogel Tissue-Engineering Scaffolds, *Expert Review of Medical Devices*, 8 (5), 607–626.
- [179] **Lee, C., Shin, J., Lee, JS., Byun, E., Ryu, JH., Um, SH. vd.** (2013). Bioinspired, Calcium-Free Alginate Hydrogels with Tunable Physical and Mechanical Properties and mproved Biocompatibility, *Biomacromolecules*, 14 (6), 2004–2013.
- [180] **Ma, G., Fang, D., Liu, Y., Zhu, X., Nie, J.** (2012). Electrospun Sodium Alginate/Poly(Ethylene Oxide) Core–Shell Nanofibers Scaffolds Potential for Tissue Engineering Applications, *Carbohydrate Polymers*, 87 (1), 737–743.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : BETÜL MUTLU  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 23.11.1993 BURSA  
**E-Posta** : betlmutl@gmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU:

**Lisans** : 2015, Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalürji Fakültesi, Biyomühendislik

**Yüksek Lisans** : 2019, Bursa Teknik Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji

### TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

MUTLU B., KUÇUK I. (2019). Effect of Gas Pressure on The Production of Porous Alginate Films by Using a T-junction Microfluidic Device, 2<sup>nd</sup> International Conference on Physical Chemistry & Functional Materials, Kapadokya, Haziran 2019 (Poster bildirisi)