

# Jelatin Doku İskelesinin Mekanik Özellikleri Üzerine Gözenek Oluşturucu Ajanın Boyutu ve Bağlantı Süresinin Etkileri

Melda BÜYÜKÖZ<sup>1\*</sup>, Sacide ALSOY ALTINKAYA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Bölümü, 35430, Urla, İzmir, TÜRKİYE, meldabykz@gmail.com

<sup>2</sup> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Bölümü, 35430, Urla, İzmir, TÜRKİYE, sacidealsoy@iyte.edu.tr

\*İletişimden sorumlu yazar / Corresponding author

Geliş / Recieved: 23 Şubat (February) 2015

Kabul / Accepted: 7 Ağustos (August) 2015

DOI: <http://dx.doi.org/10.18466/cbujos.63838>

## Özet

Bu çalışmada, makrogözenekli ve gözenekleri birbirleri ile bağlantılı olarak kalıplama, ısı etkili faz ayrımı ve tanecik uzaklaştırma yöntemleri ile üretilen jelatin bazlı doku iskelelerinde gözenek oluşturucu ajan olan parafin kürelerin boyutu ve bağlantı sürelerinin doku iskelelerinin mekanik özellikleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Sünger formu ve açık hücreli yapıda olan doku iskelelerinin mekanik özellikleri sıkıştırma testi ile ölçülmüştür. Yapılan ölçümler parafin küre çapındaki artışın doku iskelelerinin sıkıştırma katsayısını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde etkilemediğini göstermiştir. Ancak, parafin kürelerin maruz bırakıldığı ısı etkileşim süresinin 100 dakikadan 400 dakikaya arttırılmasının 250-425 µm çapındaki parafin kürelerle hazırlanan doku iskelesinin elastisite değerini arttırdığı belirlenmiştir (p<0.05). Ayrıca, 425-600 µm çapındaki parafin kürelerle hazırlanan doku iskelelerinde, ısı etkileşim süresi 100 dakikadan 400 dakikaya arttırıldığında sıkıştırma katsayısı anlamlı bir şekilde azalmıştır (p<0.05). Elde edilen sonuçlar, bu tür doku iskelelerinde parafin kürelerin boyutundan çok bağlantı süresinin mekanik özellikler üzerinde etkili olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler** – Doku iskelesi, gözenek oluşturucu ajan, sıkıştırma testi.

## The Effects of Porogen Agent Size and Interconnection Time on the Mechanical Properties of Gelatin Scaffold

### Abstract

In this study, the effects of particle size and interconnection time of porogen agent paraffin spheres on the mechanical properties of macroporous and interconnected scaffolds prepared with combination of molding, phase separation and particle leaching methods were investigated. The mechanical properties of the open-cell foam type scaffolds were measured with a compressive test. It was determined that the increase in the size of paraffin spheres did not significantly change the compressive modulus of the scaffolds. On the other hand, elasticity of the scaffold prepared from 250-425 µm sized paraffin spheres increased significantly (p<0.05) by extending incubation time from 100 to 400 minutes. Moreover, elasticity of the scaffold prepared from 425-600 µm sized paraffin spheres decreased significantly (p<0.05) by extending incubation time from 100 to 400 minutes. The results indicated that in this type of scaffold, interconnection time of paraffin spheres has a stronger influence on the compressive modulus of scaffolds than the size of paraffin spheres.

**Keywords** – Compressive test, porogen agent, scaffold.

## 1 Giriş

Doku mühendisliği çalışmalarında hedef, hücrelerin içinde bulunduğu doğal ortamı taklit eden yapıların geliştirilmesidir. İki boyutlu hücre kültürü ortamları hücrenin doğal yaşamını taklit etmede yetersiz kalır. Bu nedenle üç boyutlu doku iskelelerinin üretimi doku mühendisliği çalışmalarının temelini oluşturur. Doku iskelesi üretiminde en sık kullanılan yöntemler; gözenek oluşturucu ajanı uzaklaştırma, faz ayrımı, gaz enjeksiyonu ile köpürtme ve elektro dokuma yöntemleridir [1]. Her bir yöntemin kendine özgü avantajları vardır. Örneğin; gözenek oluşturucu ajanı uzaklaştırma yöntemi makro gözenekli doku iskelesi hazırlamada sıkça kullanılan bir yöntemdir ([2], [3]). Bir doku iskelesinin büyük ve birbiri ile bağlantılı gözeneklere sahip olması, yeni ve fonksiyonel doku oluşumu açısından oldukça önemlidir. Gözenekler hücrelerin doku iskelesi içerisinde homojen bir şekilde dağılımını ve yeni oluşan dokunun çevre dokularla bağlantısını kolaylaştırır. Ayrıca bu gözenekler sayesinde, hücrelere besin ve oksijen taşınımı kolaylaşır, yeni doku oluşumu ve damarlanma daha çabuk gerçekleşir [4].

Doku iskelesi, hasar görmüş bir dokunun yerine yerleştirildiğinde, o bölgede mekanik ve şekilsel bir bütünlük oluşturur. Bu nedenle, üretilen doku iskelesinin mekanik özelliklerinin, hedeflenen dokunun mekanik özellikleri ile benzer olması gerekmektedir [5]. Konuyla ilgili yapılan araştırmalar doku iskelesi mekanik özelliklerinin, hücrenin kaderini belirlemedeki rolünü net bir şekilde ortaya koymuştur. Örneğin; epitel, fibroblast, kas ve sinir hücreleri gibi pek çok hücre hattı kullanılarak yapılan bir çalışmada, hücrelerin içerisine ekildikleri doku iskelesinin sertliğini hissedebildikleri ve buna bağlı olarak şekillerini ve doku iskelesi yüzeyine tutunma karakteristiklerini değiştirdikleri gözlenmiştir [6]. Yine başka bir çalışmada, mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma eğilimlerinin, üzerinde büyüdüğü matrisin sertliğine göre değiştiği belirlenmiştir [7]. Mezenkimal kök hücreler yumuşak bir yüzeyde büyütüldüğünde, beyin hücreleri olan nöronlara, biraz daha sert bir yüzeyde büyütüldüklerinde kas hücrelerine ve daha sert bir yüzeyde büyütüldüklerinde ise kemik doku hücrelerine farklılaştıkları gözlenmiştir.

Bu çalışmada, doku yenilenmesi ve hücresel cevap için önemi bilinen doku iskelesi mekanik özelliklerinin, gözenek oluşturucu ajan boyutu ve bağlantı süresiyle

ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla daha önce Liu ve Ma [8] tarafından geliştirilen kalıplama, ısı etkili faz ayrımı ve gözenek oluşturucu ajanı uzaklaştırma yöntemleri birlikte kullanılarak, üç boyutlu ve makro gözenekli doku iskeleleri üretilmiş ve mekanik özellikleri ölçülmüştür.

## 2 Materyal Metot

Parafin (erime noktası 53–37 °C), polivinil alkol (PVA) (molekül ağırlığı 31,000–50,000 g/mol), Tip B jelatin, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimide (EDAC), N-hidroksi-süksinimid (NHS), 2-N-morfolino-etansulfonik asit hidrat (MES Hidrat), Sigma Aldrich' den; n-Hekzan, sikloheksan, 1,4-dioksan, etanol ve aseton Merck'ten temin edilmiştir. Tüm deneylerde deiyonize su kullanılmıştır.

### 2.1. Kalıp Üretimi

Doku iskelelerinin hazırlanması için teflon bir plaka, kalıp oluşturacak şekilde tasarlanmıştır. Hazırlanan kalıp, çapları 1.7 cm ve derinlikleri 1.5 cm olan 20 kuyucuktan oluşmaktadır (Şekil 1). İki plakanın birleştirilmesi sonucu oluşan bu kalıbın üst plakası deliklerden oluşurken, alt plaka bu deliklere tam oturan yükselticiler içerir. Böylece montajı yapıldığında sıvı geçirgenliği olmayan demonte olduğunda ise oluşturulan malzemenin kolayca çıkarılabildiği bir kalıp yapısı üretilmiştir.



Şekil 1. 20 kuyucuklu teflon kalıp.

### 2.2. Gözenek Oluşturucu Ajan Üretimi

Doku iskelesi üretiminde gözenek oluşturucu ajan olarak parafin küreler kullanılmıştır. Isıtıcı tabla üzerinde 55 °C' ye kadar ısıtılmış parafin, % 1' lik PVA çözeltisi üzerine eklenmiş ve mekanik karıştırıcı (IKA) ile 578 rpm' de 1 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışımın içerisine soğuk su ilave edilerek parafin küreciklerin katılaşması sağlanmıştır. Oluşturulan kürecikler birkaç kez distile su ile yıkanmış ve havada kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen kürecikler 250

$\mu\text{m}$ , 425  $\mu\text{m}$  ve 600  $\mu\text{m}$  lik eleklele elenmiş, boyutlarına göre ayrılarak desikatör içerisinde saklanmıştır.

### 2.3. Jelatin Doku İskelelerinin Hazırlanması

Bu çalışmada, doku iskelesi hazırlanırken ısı etkili faz ayrımı tekniği, gözenek oluşturma tekniği ve kalıplama tekniği birarada kullanılmıştır. Doku iskelesi matrisini oluşturacak olan % 5 jelatin çözeltisi 1:1 oranında etanol su karışımı ile hazırlanmış ve 45 °C' ye ısıtılmıştır. Bu çözelti parafin küreciklerin içinde bulunduğu teflon kalıba eklenerek, faz ayrımı için -80 °C' de 5 saat bekletilmiştir. İçerisinde jelatin/parafin kompozitleri bulunduran kalıp 24 saat süresince -20 °C' de tutulmuştur. Süre sonunda jelatin/parafin kompozitler teflon kalıptan çıkarılmış ve çözücü değişimi için 1,4-dioksan içerisinde 24 saat bekletilmiştir. Ardından, 1,4-dioksanın uzaklaştırılması için azot enjeksiyonlu evaporasyon gerçekleştirilmiştir. Kompozitler dondurularak kurutulmuş ve parafin kürelerin uzaklaştırılması için jelatin/parafin kompleksi 50 ml hekzan içerisine daldırılmıştır. Doku iskelesinden hekzanı uzaklaştırmak için 50 ml siklohekzan kullanılmıştır. Doku iskelesi daha sonra dondurularak kurutulmuştur [8].

Jelatin suda çözünür bir biyopolimer olduğu için mekanik test yapılmadan önce çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağ ajanı olarak 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimide (EDAC) ile N-hidroksi-süksinimid (NHS) kullanılmıştır. Reaksiyon 0.05 M 2-N-morfolino- etansulfonik asit hidrat (MES Hidrat) içerisinde gerçekleştirilmiştir. MES Hidrat çözeltisi hazırlanırken su yerine 90/10 (v/v) oranında aseton-su karışımı kullanılmıştır. Doku iskelesi bu kimyasallarla +4 °C' de 24 saat muhafaza edildikten sonra distile suyla yıkanmış, -20 °C' de 12 saat boyunca dondurulmuş ve 3 gün süre ile dondurarak kurutma işlemine maruz bırakılmıştır.

Hazırlanan parafin küreciklerin ve doku iskelelerinin morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Quanta 250FEG) ile incelenmiştir. Analiz öncesinde örnekler destek üzerine yapıştırılmış daha sonra altın paladyum ile kaplanmıştır.

### 2.4. Doku İskelelerinin Mekanik Özelliklerinin Ölçümü

Hazırlanan doku iskelelerinin sıkıştırma testleri bizim doku iskelemizin dahil olduğu, sünger formu açık hücreli malzemeler için önerilen protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir [9]. Bu testte, 16 mm çapında

2 mm yükseklikte silindirik şeklindeki örneklere tek yönlü sıkıştırma testi 0.5 mm/dakika hızda uygulanmıştır (Schimadzu AG-I 5 kN). Sıkıştırma testi yapılmadan önce biyolojik ortamı taklit etmek için doku iskeleleri 24 saat pH = 7.4 olan tampon çözeltisi içinde tutulmuştur. Her tip örnek için en az 5 adet doku iskelesi test edilmiş ve yapılan testlerde elastik bölgeden sıkışma bölgesine geçiş % 0.5 gerinimde gerçekleşmiştir.

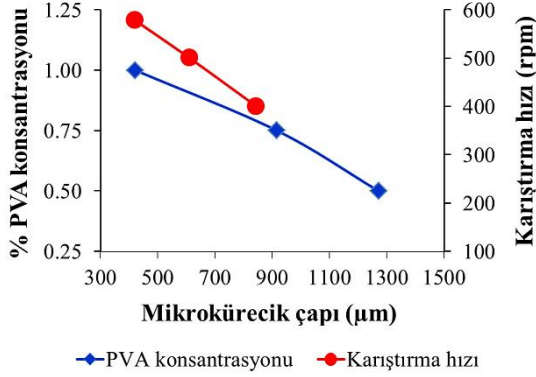
### 2.5. İstatistiksel analiz

Çalışılan örnek grupları arasındaki farkı belirlemek için eşleşmemiş t testi uygulanmıştır.  $p < 0.05$  olduğu zaman farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

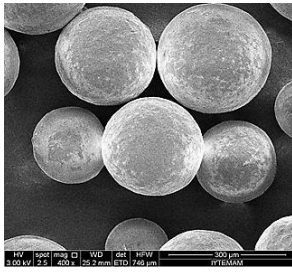
## 3 Bulgular

### 3.1. Gözenek Oluşturucu Ajan Üretimi

Bu çalışmada, gözenek oluşturucu ajan olan parafin küre üretiminde dispersiyon yöntemi kullanılmıştır. Mikro kürelerin hazırlanması için parafin önceden ısıtılmış polivinil alkol (PVA) çözeltisi içerisinde emülsifiye edilmiştir [9]. Şekil 2' deki grafikte görüldüğü gibi, PVA konsantrasyonu %0.5' ten %1.0' e arttırıldığında ortalama mikroküre çapı 1272  $\mu\text{m}$ ' den 421  $\mu\text{m}$ ' ye azalmıştır. Benzer bir etki karıştırma hızı arttırıldığında da gözlenmiştir. Mekanik karıştırıcı hızı 400 rpm' den 578 rpm' e çıkarıldığında elde edilen parafin kürelerin çapı 845  $\mu\text{m}$ ' den 421  $\mu\text{m}$ ' ye düşmüştür. Bu deneyde ayrıca iyi bir dağılıma sahip küresel tanecik hazırlamak için çözelti hacminin ve karıştırma hızının önemli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Parafin küre üretiminde %1.0' lik (w/v) PVA çözeltisinin hacmi 600 ml ve karıştırma hızı da 578 rpm olarak seçilmiştir. Bu karıştırma hızında 12 g parafin, tanecik halinde %100 verimlilikle elde edilebilmiştir (Şekil 3). Daha sonra parafin mikro küreler elenerek boyutlarına göre ayrılmış ve doku iskelesi hazırlanırken 250-425  $\mu\text{m}$  ve 425-600  $\mu\text{m}$  lik 2 farklı çap aralığındaki kürecikler kullanılmıştır.



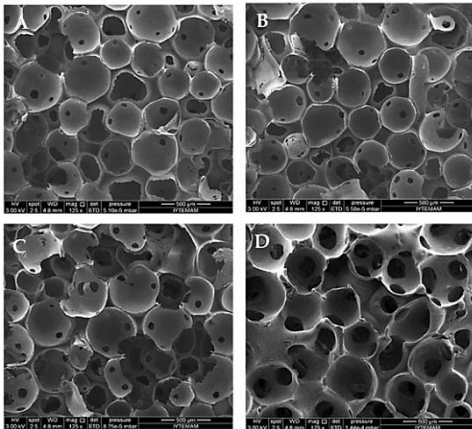
Şekil 2. PVA konsantrasyonu ve karıştırma hızının parafin mikro kürecik çapına etkisi.



Şekil 3. Hazırlanan parafin küreciklerin SEM görüntüsü.

### 3.2. Jelatin Doku İskelelerinin Hazırlanması

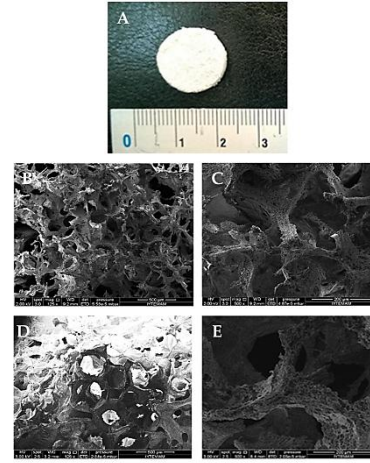
Jelatin doku iskelesi hazırlanması için 0.4 g parafin kürecik teflon kalıba aktarılmış ve birbirleriyle bağlantılı bir yapı oluşumunu sağlamaları için 37 °C' de 20, 50, 200 ve 400 dakika bekletilmiştir. Şekil 4' de farklı sürelerde ısı inkübasyonuna maruz bırakılan parafin kürelerle hazırlanmış doku iskeleleri görülmektedir.



Şekil 4. Farklı sürelerde 37 °C ısıya maruz bırakılan parafin mikro küreciklerle (250 µm - 425 µm) hazırlanmış doku iskelelerinin SEM görüntüleri (X125); A- 20 dakika, B- 50 dakika, C- 200 dakika, D- 400 dakika.

Parafin küreler hekzanla uzaklaştırıldıktan sonra oluşan gözeneklerin bağlantıları 20, 50 ve 200. dakikalar-

da çok farklı değildir. Oysa 400 dakika 37 °C' de inkübe edilen küreciklerle hedeflenen, birbirleriyle bağlantılı makro gözenek yapısı elde edilmiştir. Hazırlanan doku iskelesinin mat beyaz renkli genel yapısı Şekil 5-A'da görülmektedir. Bu yapının SEM görüntüleri ise makro gözenekli ve gözenekleri birbirleriyle bağlantılı doku iskelesi üretiminin başarılı olduğunu göstermektedir (Şekil 5B-E).

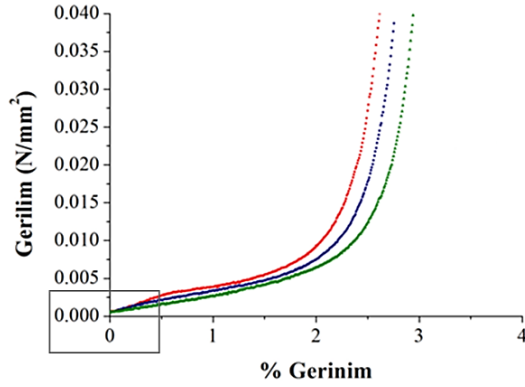


Şekil 5. A- Doku iskelesinin genel görüntüsü, B-C; 250-425 µm, D-E; 425-600 µm parafin kullanılarak hazırlanan doku iskelelerinin SEM görüntüleri (B ve D; X 125, C ve E; X 500).

### 3.3. Doku İskelelerinin Mekanik Özelliklerinin Ölçümü

Bu parametrik çalışmada jelatin konsantrasyonu % 5, parafin küreciklerin boyutları 250-425 µm ve 425-600 µm ve küreciklerde bağlantılı bir yapı oluşturmak için uygulanan ısı inkübasyon süreleri 100, 200 ve 400 dakika olarak belirlenmiştir. Doku iskelelerinin mekanik testleri önceden ıslatılmış örnekler kullanılarak sıkıştırma testi ile yapılmıştır.

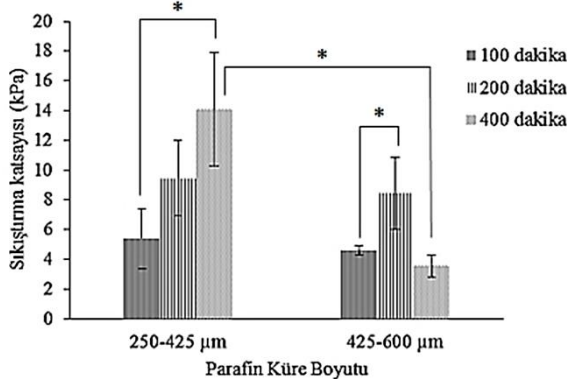
Doku iskelelerinin açık hücreli süngerimsi yapılar için tipik olan bir gerilim-gerinim özelliğine sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 6). Bu tür yapılar genellikle gerilim-gerinim grafiğinde doğrusal elastik bir bölgenin ardından sıkışma bölgesi ve yoğunlaşma bölgesi içerir [9]. Üretilen doku iskelelerinin sıkıştırılma karşısındaki genel davranışları model alınan sisteme uyum göstermiştir. Yapılan testlerde elastik bölgeden sıkışma bölgesine geçiş % 0.5 gerinimde gerçekleşmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Doku iskelelerinin gerilim-gerinim grafiği.

250-425 µm parafin kürelerle hazırlanan doku iskelelerinde, inkübasyon süresi 100 dakikadan 200 dakikaya çıkarıldığında sıkıştırma katsayısında önemli bir artış olmazken ( $p>0.05$ ) bu süre 400 dakikaya çıkarıldığında 100 dakika ile kıyaslandığında sıkıştırılma katsayısında istatistiksel açıdan anlamlı bir artış belirlenmiştir ( $p<0.05$ ) (Şekil 7).

425-600 µm parafin küreler kullanılarak hazırlanan doku iskelelerinin mekanik özellikleri incelendiğinde bu anlamlı artış 100 dakika ile 200 dakika inkübasyon süreleri karşılaştırıldığında gözlenmiştir. Ancak inkübasyon süresi 400 dakikaya çıkarıldığında malzemenin elastisitesinde önemli bir düşüş olmuştur. Ayrıca Şekil 7' de görüldüğü gibi gözenek oluşturucu ajan olan parafinin küre çapının 250-425 µm' den 425-600 µm' ye artırılması, 100 ve 200 dakika ısı etki süresi sonrası üretilen doku iskelelerinin sıkıştırılma katsayıları arasında anlamlı bir fark yaratmamış, ancak 400 dakika ısıya maruz bırakılan doku iskelelerinin sıkıştırma katsayısında azalma gözlenmiştir ( $p<0.05$ ).



Şekil 7. Doku iskelelerinin sıkıştırılma katsayısı sonuçları (\* $p<0.05$ ).

#### 4 Tartışma Ve Sonuçlar

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak

ideal bir doku iskelesi; doku gelişimi, besin ve oksijen transferi ve doku iskelesi içerisinde damarlanma sağlanabilmesi için büyük ve birbiri ile bağlantılı gözeneklere sahip olmalıdır. Bunun yanısıra hedef doku ile uyumlu mekanik özellikler de ideal bir doku iskelesinde aranan şartlardandır. Bu çalışma ile farklı parametreler göz önüne alınarak gözenekli ve gözenekleri birbirleriyle bağlantılı olarak üretilen doku iskelelerinin, mekanik özellikleri incelenmiştir.

Doku iskelesinde gözenekli yapı oluşturmak için parafin mikro kürecikler kullanılmıştır. Bu kürecikler mekanik karıştırıcı varlığında parafinin su içerisinde dispersiyonu ile hazırlanmıştır. Dispersiyonu kolaylaştırmak ve küre şeklinde parçacıklar elde etmek için, emulsifiye edici ajan olarak PVA kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, PVA konsantrasyonu arttırıldıkça üretilen mikro küre çaplarının azaldığını göstermiştir. Bu tür sistemlerde emulsifiye edici ajan konsantrasyonu yükseltildiğinde mikro küre boyutundaki azalma beklenen bir etkidir [11]. Çünkü, PVA konsantrasyonundaki artışla daha fazla sayıda PVA molekülü partikül yüzeyini kaplayabilir ve dispersiyon esnasında partikül damlacıklarının yeniden birleşmesi ve büyümesi engellenir [12] Bu çalışmada elde edilen bir diğer sonuç da, karıştırıcı hızı arttırıldığında elde edilen mikro kürecik çapının azalmasıdır. Dispersiyon gerçekleşirken karıştırma hızı arttırılınca daha küçük çapta kürecikler elde edilmesinin nedeni; yağ fazının (parafin) küçük damlacıklara ayrılması için gerekli olan kayma kuvvetinin (shearing force) yüksek karıştırma hızı ile sağlanmasıdır [13]. Böylece parafin su fazı içerisinde daha kolay bir şekilde dağılır ve küçük çapta mikro küreler üretilir.

Bu çalışmada, gözenekleri birbiri ile bağlantılı doku iskelesi hazırlamak için farklı boyutlardaki parafin kürecikler belli sürelerde ısıya maruz bırakılmıştır. Farklı sürelerde ısıya maruz bırakılan parafin kürecikler doku iskelelerinden uzaklaştırıldıktan sonra alınan SEM görüntüleri (Şekil 4), ısı etki süresi 400 dakikaya çıkarıldığında elde edilen bağlantılı gözenek yapısının çok daha belirgin olduğunu göstermiştir.

Gözenekli ve gözenekleri birbiri ile bağlantılı olarak üretilen doku iskelelerinin mekanik özellikleri incelendiğinde, 400 dakika inkübasyon süresine sahip olan doku iskelesi hariç gözenek oluşturucu ajanın boyutundaki artış, doku iskelesinin sıkıştırma katsayısında anlamlı bir değişim sağlamamıştır. Elde edilen bu sonuç Liu ve Ma'nın [8] bulguları ile örtüşmekte-

dir. Gözenek oluşturuca ajan boyutunun doku iskelesi mekanik özellikleri üzerine olan etkisinin araştırıldığı benzer çalışmalarda, partikül boyutu 90–250 µm' den 250-350 µm' ye arttırıldığında sıkıştırma katsayısının arttığı gözlemlenmiştir. Ancak partikül boyutu 250-350 µm' den 420-500 µm'ye çıkarıldığında sıkıştırma katsayısının anlamlı olmasa da azaldığı belirlenmiştir ([14], [15]). Bu çalışmalarda, gözenek oluşturuca ajan olarak parafin kullanılmasına rağmen, sıkıştırma katsayısı sonuçları bağlantı süresi 40 dakika olan doku iskelelerinden elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise parçacık boyutu 250-425 µm' den 425-600 µm'ye çıkarılıp bağlantı süresi 400 dakikaya arttırıldığında, sıkıştırma katsayısında anlamlı bir azalma belirlenmiştir. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar ışığında bu tür doku iskelelerinde, mekanik özelliklerin belirlenmesinde baskın olan faktörün partikül boyutundan çok bağlantı süresi olduğu belirlenmiştir.

Vücudumuzdaki dokular mekanik olarak incelendiğinde; beyin dokusu 0.1-1 kPa, deri 5-10 kPa, kas dokusu 10-15 kPa, kıkırdak doku 1-10 MPa ve kemik doku 12-20 GPa sıkıştırma katsayısına sahiptir [16]. Hücrelerin davranış ve kaderinin belirlenmesinde mekanik özelliklerin büyük bir rol oynadığı gerçeği düşünüldüğünde, bu çalışmada geliştirilen, mekanik özellikleri ayarlanabilen ve yüksek gözenekliliğe sahip doku iskelelerinin farklı tip doku mühendisliği araştırmalarında kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Ancak, jelatin bazlı doku iskelelerinin *in vivo* çalışmalarda kullanılabilmesi için biyobozunurluk, hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşması gibi diğer özellikleri açısından da değerlendirilmesi gerekmektedir.

## Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 112M568 nolu proje ile desteklenmiştir. Doku iskelerinin üretimi ve karakterizasyonlarının gerçekleştirildiği İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Araştırma ve Uygulama Merkezi (BIOMER) ve Malzeme Araştırma Merkezi' ne katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

## 4 Referanslar

- [1] Subia, B.; Kundu, J.; Kundu, S.C. Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications. In *Tissue Engineering*; Eberli, D., Ed.; In Tech: Croatia, 2010; 141-157.
- [2] Ma, P.X.; Langer, R. Fabrication of Biodegradable Polymer Foams for Cell Transplantation and Tissue Engineering. In *Tissue Engineering Methods and Protocols*; Morgan, J., Yarmush, M., Eds.; Humana Press: New Jersey, 1993; 47-56.
- [3] Lu, L.; Peter, S.; Lyman, M.; Lai, H.; Leite, S.; Tamada, J.; Uyama, S.; Vacanti, J.; Langer, R.; Mikos, A. In vitro and in vivo degradation of porous poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials*. 2000, 21, 1595-1605.
- [4] Park, S.; Kim, G.; Jeon, Y.C.; Koh, Y.; Kim, W. 3D polycaprolactone scaffolds with controlled pore structure using a rapid prototyping system. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2009, 20, 229-234.
- [5] Chan, B.P.; Leong, K.W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur. Spine. J.* 2008, 17, (Suppl 4) S467-S479.
- [6] Discher, D.E.; Janmey, P.; Wang, Y.L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. 2005, 310, 1139-1143.
- [7] Engler, A.J.; Sen, S.; Sweeney, H.L.; Discher, D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006, 126, 677-689.
- [8] Liu, X.; Ma, P.X. Phase separation, pore structure, and properties of nanofibrous gelatin scaffolds. *Biomaterials*. 2009, 30, 4094-4103.
- [9] Ma, P.X.; Choi, J-W. Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Eng.* 2001, 7, 23-33.
- [10] Wang, T.W.; Spector, M. Development of hyaluronic acid-based scaffolds for brain tissue engineering. *Acta Biomater.* 2009, 5, 2371-2384.
- [11] Ahlin, P.; Kristl, J.; Kristl, A.; Vrecer, F. Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration. *Int. J. Pharm.* 2002, 239, 113-120.
- [12] Bolourtchian, N.; Karimi, K.; Aboofazeli, R. Preparation and characterization of ibuprofen microspheres. *J. Microencapsul.* 2005, 22, 529-538.
- [13] Francis, L.; Meng, D.; Knowles, J.; Keshavarz, T.; Boccaccini, A.R.; Roy, I. Controlled delivery of gentamicin using poly(3-hydroxybutyrate) microspheres. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 4294-314.
- [14] Chen, V.J.; Ma, P.X. Nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds with interconnected spherical macropores. *Biomaterials*. 2004, 25, 2065-73.

[15] Kim, H.Y.; Kim, H.N.; Lee, S.J.; Song, J.E.; Kwon., S.Y.; Chung, J.W.; Lee, D.; Khang, G. Effect of pore sizes of PLGA scaffolds on mechanical properties and cell behaviour for nucleus pulposus regeneration in vivo. *J. Tissue. Eng. Regen. Med.* 2014, [Epub ahead of print].

[16] Sartori, S.; Chiono, V.; Tonda-Turo, C.; Mattu, C.; Gianluca C. Biomimetic polyurethanes in nano and regenerative medicine. *J. Mater. Chem. B.* 2014, 2, 5128-5144.