

## T-şekilli Mikroakışkan Sistem Kullanılarak Halloysit Nanotüp Katkılı Aljinat Doku İskelesi Üretimi

İsrafil KÜÇÜK

Gebze Teknik Üniversitesi, Nanoteknoloji Enstitüsü, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilimdalı, Gebze, İzmit.

e-posta: i.kucuk@gtu.edu.tr. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1284-8880>

Geliş Tarihi: 16.09.2019; Kabul Tarihi: 23.09.2019

### Öz

Doku mühendisliği, çok disiplinli bilim dalının ilgi alanına giren, fonksiyonunu yitirmiş doku ve organların çeşitli yaklaşımlarla yeniden oluşumunu sağlamak amacıyla, üç boyutlu (3B) doku iskelelerinin tasarımı, sağlık alanındaki araştırmalarda önemli bir yer tutmaktadır. Çünkü 3B doku iskeleleri, kök hücre ve öncülleri gibi hücreler için yapısal destek sağlamak ve bu hücrelerin tutunma ve çoğalması için yapay hücrearası matriks görevi görmek gibi hayati bir fonksiyonu yerine getirmektedir. İdeal bir doku iskelesinin, yüksek derecede düzenli ve dar gözenek boyut dağılımına sahip olan gözenekli, biyoyuymululuk ve biyobozunma gibi özellikleri mekanik dayanımı da arzu edilen bir seviyede olması beklenilmektedir. Bu çalışmada, T-şekilli mikroakışkan yöntem kullanılarak mikron boyutunda elde edilen baloncuklardan halloysit nanotüp katkılı gözenekli yapıya sahip aljinat doku iskelelerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan çözeltilerin fiziksel özellikleri (yoğunluk, yüzey gerilimi ve viskozite) incelenmiştir. Ayrıca, elde edilen baloncuk yapılar ve doku iskelelerinin sırasıyla, optik mikroskop ve ileri seviye görüntüleme sistemleri, FT-IR, XRD ve DSC yöntemleri ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda, halloysit katkılı gözenekli yapıya sahip, aljinat doku iskelesinin başarıyla üretildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca elde edilen mikroskop incelemeleri ve kimyasal yapı analizleri sonucunda üretim yönteminin doku iskeleleri üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı da gözlemlenmiştir.

### Anahtar kelimeler

Halloysit; Aljinat; Doku iskelesi; T-şekilli mikroakışkan sistem.

## Preparation of Halloysite Reinforced Alginate Scaffolds Using by a T-shaped Microfluidic Junction Device

### Abstract

Design of the three-dimensional (3D) tissue scaffolds to provide regeneration or repairing of lost tissues or organs for a multidisciplinary science, tissue engineering is interest of health industry and materials engineering. Because, 3D tissue scaffolds, one of the major components of tissue engineering, provide structural support for cells such as stem cells and precursors that regenerate these damaged tissues and serves as an artificial intercellular matrix for cell attachment and proliferation. Properties such as biocompatibility, biodegradability, mechanical strength and well-ordered porous structure are required to design an ideal tissue scaffolds to utilize them in health applications such as bone or cartilage engineering. In the present work, preparation of halloysite nanotube ceramic reinforced porous alginate composite scaffolds from microbubbles is achieved using by a T-shaped microfluidic junction device method. Physical properties (for example; density, surface tension and viscosity) of the precursors used in this work is examined. Also, resultant microbubbles and composite scaffolds are characterized by optical and advanced microscopy imaging techniques, FT-IR, XRD and TGA to determine structural and chemical features. Thus, halloysite nanotubes reinforced well-ordered porous alginate composite scaffold structures are successfully produced from bubble bursting using a T-shaped microfluidic junction device. Moreover, structural and chemical analysis results showed that there is no hazardous effect of the microfluidic technique used on the resultant scaffold's features.

### Keywords

Halloysite; Alginate; Scaffolds; T-shaped microfluidic Junction Device.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

## 1. Giriş

Doku mühendisliği, dokuda meydana gelen hasarları onarmak amacıyla canlıdan alınan hücre veya doku nakli teknolojilerinin kullanımı sayesinde potansiyel olarak önemi artan bir alandır (Ahlfeld vd., 2017, Fathi-Achachelouei vd., 2019). Gözenekli yapıya sahip biyobozunur doku iskeleleri ise *in vitro* ve *in vivo* olarak hücre ve dokuların büyümesi için uygun bir ortam sağlama kabiliyetine sahiptir (Fathi-Achachelouei vd., 2019, Ahlfeld vd., 2017). Literatürde polimer ve inorganik malzemelerin yanı sıra, metallerin de içinde bulunduğu birçok farklı malzeme, gözenekli biyobozunur doku iskelesi üretimi için kullanılmaktadır (Ahlfeld vd., 2017, Huang vd., 2017, Massaro vd., 2017). Son yıllarda kompozit yapıları doku iskeleleri, farklı özelliklere sahip malzemelerin bir araya getirilmesi ile doku büyümesi için, karşılanması zor beklentilere cevap verecek şekilde tasarlanmaktadır (Massaro vd., 2017, Gloria vd., 2010). İdeal bir doku iskelesinin, yeterli miktarda gözeneklilik, protein veya sinyallerin hareketliliği için gözenekler arası bağlantı, biyouyumluluk, mükemmel biyobozunma kabiliyeti olan ve yüksek mukavemete sahip bir yapıda olması beklenmektedir (Gloria vd., 2010, Lawrie vd., 2007). Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan malzeme çeşitlerinin arasında, sentetik biyobozunur polimer malzemeler, polimerizasyon işlemleri ile kontrol edilebilir bir şekilde farklı özelliklerin elde edilebilirliği kabiliyetinden dolayı önemli bir yer tutmaktadır (Ahlfeld vd., 2017, Massaro vd., 2017, Murphy vd., 2010). Sentetik biyobozunur polimer malzemelerin sahip olduğu ana problem, biyoaktivite özelliğinin az olmasıdır. Doğal kaynaklardan elde edilen biyomakromolekül yapıları (örneğin; proteinler, nükleik asitler ve polisakkaritler) sentetik biyobozunur polimer malzemelere alternatif olarak kullanılan diğer doku iskelesi inşa malzemeleridir (Wu vd., 2019, Palantöken vd., 2016). Bu malzemelerin biyomedikal uygulamalarda çeşitli önemli avantajları bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla, hassas biyobozunurluk, biyouyumluluk, kan akışını önleyici kabiliyet, hemostatik özellikler, dikkat çekici tamir edebilme özelliği, su alma kabiliyeti, antibakteriyellik kabiliyeti ve düşük üretim maliyetidir (Chueh vd., 2010, Gloria vd., 2010, Gasperini vd., 2014).

Aljinat,  $\beta$ -D-manuronik asit ve  $\alpha$ -L-guluronik asidin bir araya gelmesinden meydana gelen doğal polisakkarit bir kopolimer malzemedir ve biyomedikal teknolojisi uygulamalarında geniş bir kullanım alanına sahiptir (Chueh vd., 2010, Sun vd., 2018). Dahası, sodyum aljinat (SA) divalent metal iyonlarının olduğu bir ortamda, hızlıca karmaşık bağ yapısına sahip jel oluşturma kabiliyetine de sahiptir (Tripathy vd., 1999, Huang vd., 2017a). Jel yapısındaki sodyum aljinat malzemeler, gen ve ilaç nakil sistemleri, doku mühendisliği, yara iyileştirme tedavileri ve hücre enkapsülasyonu alanlarında geniş bir kullanım alanına sahiptir (Palantöken vd., 2016, Massaro vd., 2017, Fathi-Achachelouei vd., 2019). Özellikle doku mühendisliği uygulamalarında aljinat hidrojel, hasar gören dokulara nüfuz ederek sıvı halde hücreler ile bir araya gelmek ve hücre büyümesine imkân sağlayan iskelet yapıya benzer üç boyutlu ağ yapıları şeklinde üretilebilmek gibi eşsiz avantajları bünyesinde barındırmaktadır (Wu vd., 2019, Gloria vd., 2010). Ancak SA hidrojel doku iskelesi yapılarının hücre kültürü ortamında hızlı bir şekilde bozunma ve zayıf mekanik özellikler gibi uygulama sırasında kısıtlılık meydana getiren önemli dezavantajları da mevcuttur (Tripathy vd., 1999, Gloria vd., 2010, Yuan vd., 2008). Bu önemli problemlerin üstesinden gelebilmek için SA, çeşitli malzemeler ile bir araya getirilerek kompozit doku iskelesi yapıları elde edilmiştir (Tripathy vd., 1999, Gloria vd., 2010). Nano boyutlu silika,  $\alpha/\beta$ -trikalsiyum fosfat, grafen oksit (GO), Halosyt nanotüpler (HNT) ve kitin çubuğu parçaları aljinat matris içerisine yerleştirilerek, adsorpsiyon, mekanik dayanım ve fiziksel özelliklerin geliştirilmesi amaçlanmıştır (Yuan vd., 2008, Brindley vd., 1946). Örneğin, GO katkısı, aljinat kompozit yapısında ısıl stabilite ve mekanik özelliklerini önemli ölçüde geliştirmiştir (Ahlfeld vd., 2017, Yuan vd., 2008). Yine Kitin çubuğu parçaları, aljinat kompozit yapıları, osteoblast hücrelerinin tutunma ve büyümesi kabiliyetini geliştirmiştir (Lawrie vd., 2007, Palantöken vd., 2016). Liu vd (2015) tarafından geliştirilen ve emülsiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, HNT katkılı aljinat kompozit yapısının, mekanik dayanım ve toksisite özelliklerini geliştirdiğini göstermiştir (Huang vd., 2017a, Liu vd., 2015).

Halloysit (HNT), içi boş kıvrımlı kanallı yapısının yanı sıra, yüksek en-boy oranına sahip doğal bir mineral nanotüp kil malzemesidir (Massaro vd., 2017). HNT'ler, polimer malzemelere kuvvetlendirici malzeme olarak katılarak, iyi dağılım meydana getirme, yüzeylerinin farklı aktif fonksiyonel gruplar ile uyumluluğu, düşük toksisite kabiliyeti, biyouyumluluk ve ucuz maliyetle elde edilme gibi önemli faydalar sağlamaktadırlar (Huang vd., 2017a, Rong vd., 2016). Son yıllarda HNT'ler özgün biyomalzemeler olarak dikkat çekmektedirler (Brindley vd., 1946, Massaro vd., 2017, Yuan vd., 2008). Örneğin, HNT'ler ilaç taşıyıcı bir araç olarak eşsiz bir nanoyapıya sahiptir. Zerdeçal, DNA, proteinler ve antibakteriyel ajanlar gibi kanser tedavisinde kullanılan malzemeler, Halloysit yapısı içerisinde rahatlıkla yer alabilmekle birlikte kontrol edilebilir yavaş bir salım davranışına sahiptir (Huang vd., 2017b). Bir başka çalışmada, HNT'ler ile SA polimerinin, bir kompozit malzeme olarak ara yüzey uyumunun hidrojen bağ yapılarının varlığından dolayı iyi olduğu belirtilmiştir ve bu özelliğinden dolayı iki malzemenin de bir arada kullanımı ve gözenekli doku iskelesi üretimi rahatlıkla gerçekleştirilebilmektedir (Tripathy vd., 1999, Massaro vd., 2017).

Literatürde HNT katkı SA kompozit doku iskelesi üretimi, çeşitli yöntemler (örneğin; dondurarak kurutma, elektro-eğirme tekniği, 3B yazıcılar, emülsiyon ve mikroakışkan yöntemler) kullanılarak yaygın bir şekilde gerçekleştirilmektedir (Liu vd., 2019, Sun vd., 2018, Chueh vd., 2010, Gasperini vd., 2014, Liu vd., 2015). Ancak mikroakışkan yöntem haricinde HNT katkı SA doku iskeleleri üretimi için kullanılan diğer yöntemlerde arzu edilen gözeneklilik boyutu, kontrol edilebilir homojen boyut dağılımı ve arzu edilir seviyede HNT ile SA birleşimi kompozit doku iskelesi üretimi yöntemlere özgü çeşitli zorluklardan dolayı kısıtlı kalmaktadır (Liu vd., 2015, Gasperini vd., 2014). Örneğin, emülsiyon yöntemi kullanılarak elde edilen HNT katkı SA kompozit doku iskelelerinde ilave kimyasal kullanımı, elde edilen numunelerde toksisite probleminin oluşmasına sebebiyet vermektedir (Liu vd., 2019). Yine 3B yazıcılar kullanılarak elde edilen HNT katkı SA kompozit doku iskeleleri ile düzenli iskelet üretilebilirken, üretim hızının yavaş olması ve istenilen hassasiyette yüzeylerin elde edilememesi problemi, bu yöntemin dezavantajı olarak görülmektedir (Gasperini vd., 2014). Öte yandan, mikroakışkan yöntemler kullanarak HNT katkı SA kompozit doku iskelesi üretimi literatürde yer alan çalışmalarda eş

akış yönüne sahip iki sıvının mikrokanallarda bir araya getirilmesi ile gerçekleştirilmiş olup, bu çalışmada iki tane birbiri ile kimyasal reaksiyona girmeyen sıvı kullanılmıştır (Chueh vd., 2010, Sun vd., 2018). Ancak bu yöntemin kullanılması sırasında kanallarda meydana gelen tıkanıklık problemi, yöntemin önemli bir dezavantajı olarak tespit edilmiştir.

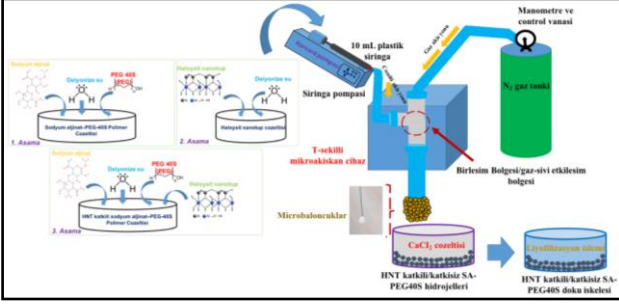
Bu çalışmada, HNT katkısı kullanılarak aljinat-PEG-40S kompozit doku iskelelerinin T-şekilli mikroakışkan cihaz vasıtasıyla elde edilen mikron boyutlu baloncukların jelleştirilmesi ve ardından kurutulması yöntemi ile elde edilmesi gerçekleştirilmiştir. Doku iskelesi üretiminde kullanılan ham maddelerin ve elde edilen katkı ve katkısız doku iskelelerinin fiziksel, kimyasal, termal, yapısal ve morfolojik özellikleri karakterize edilmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

Bu deneysel çalışmada Halloysit nanotüp (HNT) seramik kil katkı Aljinat doku iskelesi üretimi için, ileri teknolojik T-şekilli mikroakışkan sistem tekniği kullanıldı. Doku iskelesi üretiminde başlangıç kimyasalları sodyum aljinat (SA) [Sigma-Aldrich], polietilen glikol 40 stereat (PEG-40S) [Sigma-Aldrich, Almanya] ve kalsiyum klorür ( $CaCl_2$ ) [Sigma-Aldrich] ticari olarak analitik kalitede temin edildi. Seramik kil katkı olarak seçilmiş Halloysit, Sigma-Aldrich şirketinden tedarik edildi. Halloysit kil, nanotüp geometrisine sahip olup, biyouyumluluğu yüksek ve lümenli yapıya sahip bir üründür.

Şekil 1'deki akış şemasına göre sırasıyla, sodyum aljinat çözeltisi (1. Aşama) ve Halloysit içeren sulu süspansiyon çözeltisi (2. aşama) hazırlandı. Ağırlıkça %1'lik Sodyum aljinat polimeri ve yüzey aktif madde olarak seçilen ağırlıkça %0.25'lik PEG-40S uygun miktarda hassas terazi (ATX224, Shimadzu, Japonya) de tartıldı ve üzeri belirlenen hacme kadar saf su ile tamamlandı. Ardından manyetik karıştırıcı (UC 152, Stuart, Almanya) ile polimer içerikli çözelti tamamen çözülmeye kadar yaklaşık 1 saat süreyle karıştırıldı. Halloysit çözeltisi ise, toz halindeki Halloysit (HNT) killerinin çözünmesi için yüksek saflık derecesine sahip saf sudaki manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve daha sonra da HNT'lerin çözelti içerisinde homojen olarak dağılması için 700 W'lik ultrasonik homojenizatörde 5 dakika süreyle bekletildi. Daha

sonra sodyum aljinat-PEG40S çözeltisine HNT çözeltisi eklendi (3. aşama) ve çözeltiler iyice karışması için manyetik karıştırıcıda bir saat süreyle karıştırıldı.



**Şekil 1.** T-şekilli mikroakışkan yöntemi ile katkısız ve HNT katkılı sodyum aljinat-PEG40S doku iskelesi üretimi deney akım şeması.

Polimerik çözeltilerin yoğunlukları 25 ml'lik kalibreli piknometre [Merck] ile, viskoziteleri Reometre [Anton Paar] cihazıyla ve yüzey gerilimleri yüzey gerilimi ölçüm cihazı [Theta Lite, Attension] vasıtasıyla elde edildi.

Bu çalışmada, HNT katkılı sodyum aljinat doku iskelesi üretimi için öncelikle mikrobaloncukların T-bağlantılı bir mikroakışkan cihaz sistemi ile elde edilmesi gerçekleştirilmiştir. Şekil 1b'de deney düzeneğinin şematik olarak gösterimi yer almaktadır. CNC tekniği kullanılarak polimetilmetakrilat (PMMA) polimerinden tasarlanan T-geometriye sahip cihaz, bir ucu 10 ml'lik plastik şırınga (Becton Dickinson) içine yerleştirilen HNT içeren sodyum aljinat-PEG-40S çözeltisinin, sistem içine beslenmesi için yüksek hassasiyete sahip mekanik şırınga pompasına (Pump 11 Elite, Harvard), diğer ucu ise yüksek saflıktaki azot ( $N_2$ ) gazı (asal gaz), bir basınç düşürücü vasıtasıyla gaz girişine izin veren tüpe bağlandı. Cihaz ile şırınga pompası ve gaz arasındaki ilişki, birbirine dik 200  $\mu m$  çapında floretillen propilen (FEP) iki mikrokanailli ve mikrobaloncuk çıkışı sağlayan yine aynı çapa sahip FEP mikrokanailleri marifetiyle sağlandı. Bu deneysel çalışmada, homojen dağılıma sahip mikrobaloncukların elde edilmesi amacıyla, SA-PEG-40S çözeltisinin sisteme besleme hızı 100  $\mu l$  dakika<sup>-1</sup> ve azot gazı basıncı 0.8 bar olarak seçildi.

T-şekilli mikroakışkan cihazın kanal birleşim noktasında sıvı ve gaz fazın ara yüzey gerilimleri sonucu oluşan mikro boyutlu baloncuklar, doku

iskelesi üretimi için çıkış kanalının ucunda camdan imal edilmiş biriktirme kabına toplandı. Elde edilen baloncukların çapları ve boyut dağılımı optik mikroskop [LV 150N, Nikon-eclipse] ile tespit edildi. Mikrograflar kullanılarak mikrobaloncukların çapları ImageJ programı ile hesaplandı.

Katkısız ve HNT katkılı aljinat-PEG40S çözeltilerinden elde edilen mikrobaloncuklar, hidrojel oluşumu için ağırlıkça %1 konsantrasyona sahip  $CaCl_2$  çapraz bağlayıcı- deiyonize su çözeltisi ile 24 saat süreyle +4 °C'de bekletildi. Son olarak doku iskelesi oluşumu için hidrojel yapıdaki numuneler 3 kez saf su ile yıkandı ve 24 saat boyunca liyofilizatörde [TRS 2/2V, Toros] kurutma işlemine tabi tutuldu.

Polimer malzemelerin, HNT nanokillerin ve elde edilen doku iskelesi yapılarının morfolojik incelemesi, numuneler altın-paladyum ile kaplandıktan sonra taramalı elektron mikroskobu (The Quanta 200, FEI) kullanılarak gerçekleştirildi.

Bu çalışmada kullanılan doku iskelesi üretim hammaddeleri, SA, PEG-40S, HNT, üretilen SA-PEG40S ve HNT katkılı SA-PEG40S numunelerin kimyasal yapı analizleri, Fourier Transform Kızılötesi spektrometre (FT-IR) [Tensor 37, Bruker optics] cihazı ile, kristal yapı analizleri, X-ışını kırınım yöntemi (XRD) [Discovery D8, Bruker AXS] ve termal özellikleri, diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) [Discovery DSC 250, TA] tekniği kullanılarak incelendi.

### 3. Bulgular

Katkısız ve HNT katkılı aljinat-PEG-40S kompozit doku iskele yapılarının T-şekilli mikroakışkan cihaz sistemi ile üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir. T-şekilli mikroakışkan cihaz sistemi ile doku iskelesi üretiminde kullanılan katkısız ve HNT katkılı aljinat-PEG40S çözeltilerinin yoğunluk, viskozite ve yüzey gerilimi fiziksel özellikleri ölçüm testi sonuçları ve standart sapmaları ( $SS \pm$ ) Çizelge 1'de gösterilmiştir. Çizelge 1'de HNT katkısının, yoğunluk değerini azaltırken, viskozite ve yüzey gerilim değerlerini artırdığı görülmektedir. HNT katkısı, yoğunluk değerini yaklaşık %0,12 oranında azaltmıştır. Bu etki, hem viskozite değerini yaklaşık

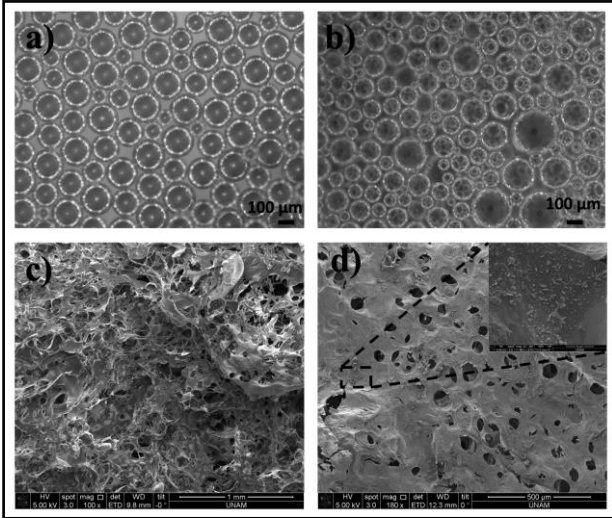


%11 hem de yüzey gerilimi değerini %6,75 oranında artırmıştır.

**Çizelge 1.** Numunelerin fiziksel özelliklerinin ölçüm sonuçları.

Çözelti içeriği	Yoğunluk (g ml <sup>-1</sup> )	Viskozite (mPa.s)	Yüzey gerilimi (mN m <sup>-1</sup> )
Aljinat-PEG40S	1,015 ±0,025	11,65 ±0,03	49 ±0,32
HNT-aljinat-PEG40S	1,0125 ±0,012	14,5 ±0,02	56,1 ±0,25

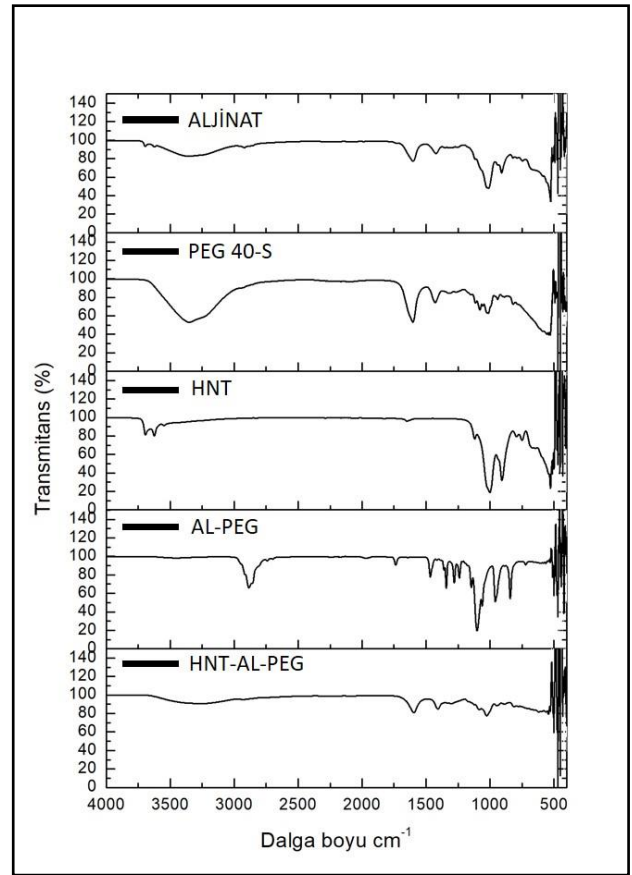
Literatürde HNT katkıli aljinat-PEG40S ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Zhou vd (2017) HNT ile elde edilmiş aljinat kompozit hidrojel yapıların fiziksel ve toksisite özelliklerinin değerlendirmesinde HNT katkısının, sadece viskozite değerinde artışa neden olduğunu göstermiştir (Huang vd., 2017a). Huang vd (2017) zerdeçal salımı için HNT katılarak elde edilmiş selüloz kompozit hidrojel yapılarını değerlendirdiği çalışmasında, HNT katkısının, çözeltinin viskozite değerini artırdığını göstermiştir (Huang vd., 2017b).



**Şekil 2.** Katkısız (a, c) ve HNT katkıli (b, d) aljinat-PEG-40S numunelerin sırasıyla optik mikroskop ve SEM görüntüleri. (d) SEM görüntüsü içerisinde yer alan görüntü, HNT nanotüplerin doku iskelesi üzerindeki görünümü.

Şekil 2'deki katkısiz ve HNT katkıli aljinat-PEG-40S numunelerin optik mikroskop ve SEM görüntüleri yer almaktadır. Şekil 2a'da katkısiz aljinat-PEG40S mikrobaloncuklarının homojen olarak dağıldığı ve boyutlarının yaklaşık 130 µm ± 25 olduğu görülmektedir. Şekil 2b'de ise HNT katkısının mikrobaloncuk boyutu üzerindeki etkisi görülmektedir. Burada elde edilen mikrobaloncuk

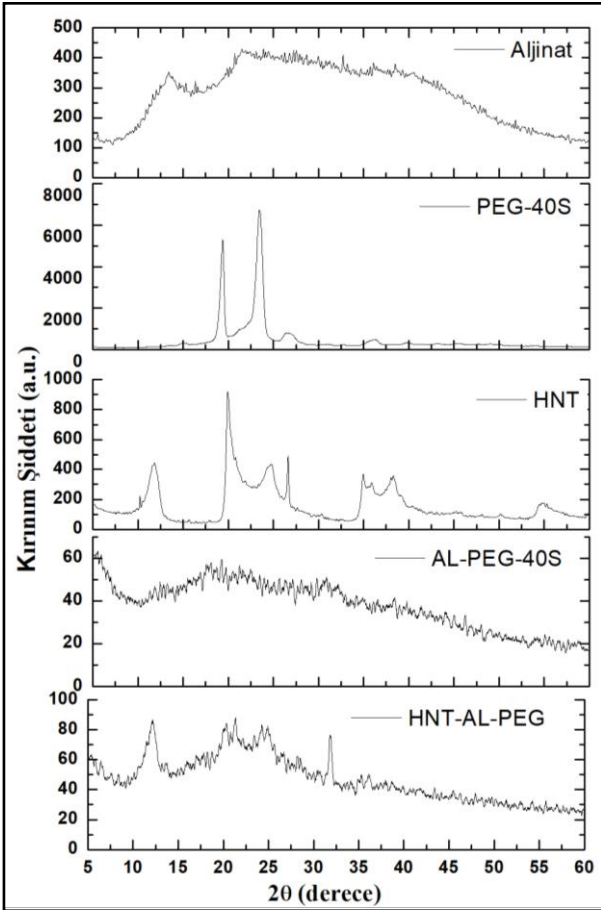
boyutu dağılımı, arzu edilen seviyede homojen olmamakla birlikte yaklaşık 180 µm ± 40 olarak elde edilmiştir. Şekil 2c'de katkısiz aljinat-PEG40S doku iskelesinin sahip olduğu 100-220 µm gözenek çapına sahip, birbiri ile bağlantılı yapı görülmektedir. Murphy vd (2010), hücre tutunması ve büyümesi için, doku iskelesi gözenek boyutunun 200 µm olmasının yeterli olduğunu belirtmiştir (Murphy vd., 2010). Şekil 2d'de HNT katkısının aljinat-PEG-40S yapısında, homojen gözenek dağılımına sahip gözenek çapı yaklaşık 100 µm olarak elde edilmiştir. Bu etki, gözenek boyutunu azaltırken, gözenek bölgeleri periferisinde yüzey pürüzlülüğü değerini artırmıştır (Şekil 2d içinde yer alan görüntü).



**Şekil 3.** Sodyum aljinat, PEG-40S, Halosiyt ham maddeleri ile Halosiyt katkıli ve katkısiz sodyum aljinat-PEG-40S içeren numunelerin FT-IR analizleri.

Şekil 3'de katkısiz aljinat, PEG-40S, Halosiyt ve HNT katkıli ve katkısiz aljinat-PEG-40S numunelerine ait FT-IR sonuçları HNT ve aljinat-PEG-40S arasındaki kimyasal etkileşimi incelemek amacıyla gösterilmektedir. Aljinata ait 3386 cm<sup>-1</sup>'de OH-bağını, 1634 cm<sup>-1</sup>'de asimetrik -COO- bağını ve 1419 cm<sup>-1</sup>'de asimetrik -COO- bağını temsil eden pikler tespit edilmiştir. Lawrie vd (2007) tarafından gerçekleştirilen ve aljinat biyopolimer

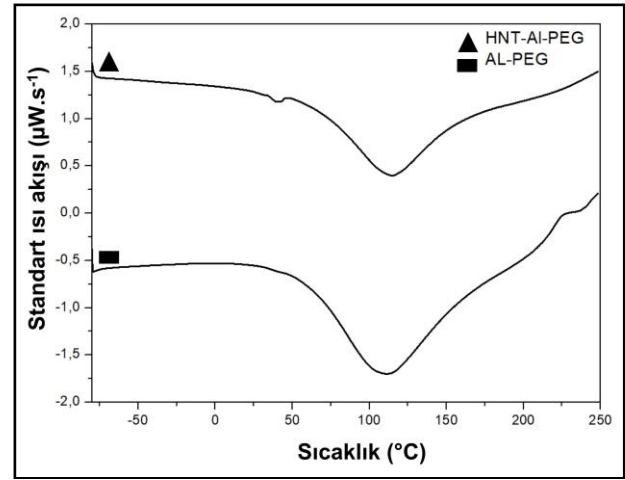
malzemesinin FT-IR analiz sonuçlarını da içeren çalışmada elde edilen sonuçlara benzer piklerin varlığı tespit edilmiştir (Lawrie vd., 2007). HNT'ye ait karakteristik pikler sırasıyla, 3696 ve 3624  $\text{cm}^{-1}$ 'de iç ve dış yüzeylerinde yer alan hidroksil bağ gruplarını temsil etmekle birlikte tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, Yuan vd (2008) tarafından gerçekleştirilen ve HNT killerin FT-IR analizlerini de içeren çalışma ile benzer olarak değerlendirilmiştir (Yuan vd., 2008). HNT katkısız aljinat-PEG-40S kompozit yapının FTIR sonuçları incelendiğinde, aljinat ve PEG-40S'ye ait karakteristik piklerin varlığı gözlemlendi. HNT katkılı aljinat PEG40S numunelerde ise bu piklerin dışında başka bir pik oluşumu gözlemlenmemiştir. Bu HNT ve aljinat-PEG-40S yapı arasında yeni bir kimyasal reaksiyonun olmadığı göstermektedir.



**Şekil 4.** Sodyum aljinat, PEG-40S, Halloysit ham maddeleri ile HNT katkısız ve katkılı sodyum aljinat-PEG-40S içeren numunelerin XRD analizleri.

Şekil 4'de katkısız aljinat, PEG-40S ve Halloysit numunelerine ait XRD analizleri verilmiştir. Aljinat amorf yapısından dolayı keskin bir pik göstermemiştir. Elde edilen bu sonuç Tripathy vd (1999) tarafından gerçekleştirilen sodyum aljinat XRD analiz sonucu ile benzerlik göstermektedir

(Tripathy vd., 1999). HNT katkılı aljinat-PEG40S yapısı,  $2\theta=12,3^\circ$ ,  $20,1^\circ$  ve  $25^\circ$  açılarında pikler verdiği tespit edilmiş olup, elde edilen yapının sırasıyla (001), (020, 110) ve (020) düzlemlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar Brindley vd (1946)'nin Halloysit kil yapısını incelediği çalışma ile benzerlik göstermiştir (Brindley vd., 1946). Dahası Halloysit nanotüplerin kaolin ve kuvarz yapısından oluştuğu da dikkate alınmalıdır ve HNT ye ait XRD sonucunda bulunan  $2\theta=8,9^\circ$ ,  $18,2^\circ$ ,  $30,3^\circ$  ve  $35,2^\circ$  açıları, HTN'nin karakteristik pikleri olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar Rong vd (2016)'nin gerçekleştirdiği ve Halloysit kilinin XRD analizini inceleyen çalışmada tespit edilen sonuçlara benzerlik göstermiştir (Rong vd., 2016).



**Şekil 5.** Halloysit katkılı ve katkısız sodyum aljinat-PEG-40S içeren numunelerin DSC analizleri.

Şekil 5'te HNT katkısız ve katkılı aljinat-PEG doku iskelelerinin DSC termografik analiz sonuçları gösterilmektedir.  $104^\circ\text{C}$ 'de, Aljinat-PEG40S numuneye ait endotermik bir pik tespit edilmiştir. Zohuriaan vd (2004) aljinatın da içinde olduğu gum yapıların termal analizini gerçekleştirdiği çalışmasında saf aljinatın fonksiyonel gruplarının hidrofilik (su sever) yapısında olduğunu ifade eden endotermik pik değerini,  $106^\circ\text{C}$  olarak göstermiştir (Zohuriaan ve Shokrolahi 2004). HNT etkisi, endotermik pik davranışının katkısız aljinat-PEG40S numuneleri ile benzer olarak tespit edildiğini ancak pik değerinin çok az miktarda daha yüksek sıcaklıkta ( $116^\circ\text{C}$ ) elde edildiğini göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, aljinat-PEG-40S ile HNT killerin ara yüzeylerinin etkileşim içerisinde olduğunu göstermiştir.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Halloysit nanotüp (HNT) katkıli doğal biyopolimer sodyum aljinat-PEG-40S kompozit doku iskelelerinin üretilmesinde karşılaşılan en büyük dezavantaj, elde edilen gözenek boyutunun kontrol edilebilir boyutlarda ve homojen dağılıma sahip olarak gerçekleştirilmesidir. Bu nedenle farklı nanokil çözelti konsantrasyonları ve üretim teknikleriyle HNT katkıli aljinat-PEG-40S üretimi üzerine çalışmalar birçok bilim adamının ilgisini çekmektedir.

Bu çalışmada, birçok çalışmada nano kil, takviye malzemesi olarak kullanılan doğal mineral Halloysit nanotüplerinin sodyum aljinat-PEG40S biyopolimeriyle birlikte, T-şekilli mikroakışkan tekniği kullanılarak öncelikle mikro baloncuk ardından da doku iskelesi olarak elde edilebilirliği araştırılmıştır. Ağırlıkça %1 sodyum aljinat, %0,25 PEG-40S yüzey aktifleştirici madde içeren doku iskelesi ve %0.10 HNT ile katkılandırılmış aynı konsantrasyona sahip SA-PEG-40S doku iskeleleri üretilip karakterizasyonu gerçekleştirildi.

HNT katkıli SA-PEG-40S çözeltisinin viskozite ve yüzey gerilim değerlerinin, sırasıyla katkısız numuneye göre yaklaşık %11 ve %6,75 oranında artış gösterdiği görülmüştür.

Optik mikroskop ve SEM analizleri sonucunda HNT katkısının T-şekilli mikroakışkan yöntemle elde edilen baloncuk boyutu ve homojenliği aynı zamanda da üretilen doku iskelesinin gözenek boyutu ve homojen boyut dağılımı üzerine etkisi olduğu görülmektedir. Ayrıca HNT'lerin SA-PEG-40S matris malzemesi üzerinde homojen bir şekilde dağılarak yüzey pürüzlülüğünü artırdığı da tespit edilmiştir.

FT-IR ve XRD kimyasal ve kristal yapı analizleri sonucunda HNT katkısının HNT katkıli SA-PEG-40S doku iskeleleri bünyesinde beklenmedik bir kimyasal yapı oluşumuna sebebiyet vermediği ve her iki malzemenin birbiri arasında bir uyum olduğu görülmektedir.

DSC ısısal analizler sonucunda da katkıli ve katkısız SA-PEG-40S doku iskelelerinin endotermik bir davranışa sahip olduğu ve yine HNT katkısı ile aralarındaki ara yüzey etkileşimlerinin uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

Son olarak, elde edilen sonuçlar nezdinde HNT katkıli SA-PEG-40S kompozit doku iskelelerinin ilaç salım ve hücre tutunma ve büyüme çalışmaları için önemli bir potansiyel platform olduğu belirtilmektedir.

#### Teşekkür

Bu çalışma 118M219 nolu TÜBİTAK projesi tarafından sağlanan maddi imkânlar ile oluşturulan Nano-delight araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. SEM analizleri Bilkent UNAM bünyesinde bulunan cihazlarda Uzman Semih Bozkurt ve Mustafa Güler'in katkıları ile gerçekleştirilmiştir. Yazarlar, XRD analizleri için Sakarya Üniversitesi Metalürji ve Malzeme Mühendisliği bölümü uzmanı Fuat Kayış'a teşekkür etmektedir. Son olarak yazarlar, kullanılan çözeltilerin fiziksel özelliklerinin belirlenmesi çalışmalarında teknik katkı sağlayan Bursa Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Arş. Gör. Gözde Geçim'e teşekkür eder.

#### 5. Kaynaklar

- Ahlfeld, T., vd. 2017. Development of a clay based bioink for 3d cell printing for skeletal application. *Biofabrication*, **9**, 034103.
- Brindley, G., vd. 1946. The clay minerals halloysite and meta-halloysite. *Nature*, **157**, 225.
- Chueh, B.-h., vd. 2010. Patterning alginate hydrogels using light-directed release of caged calcium in a microfluidic device. *Biomedical Microdevices*, **12**, 145-151.
- Fathi-Achachelouei, M., vd. 2019. Use of nanoparticles in tissue engineering and regenerative medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **7**, 113.
- Gasperini, L., vd. 2014. An electrohydrodynamic bioprinter for alginate hydrogels containing living cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*, **21**, 123-132.
- Gloria, A., vd. 2010. Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, **8**, 57-67.
- Huang, B., vd. 2017a. Effects of halloysite nanotubes on physical properties and cytocompatibility of alginate composite hydrogels. *Materials Science and Engineering: C*, **70**, 303-310.
- Huang, B., vd. 2017b. Cellulose-halloysite nanotube composite hydrogels for curcumin delivery. *Cellulose*, **24**, 2861-2875.
- Lawrie, G., vd. 2007. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using ftir and xps. *Biomacromolecules*, **8**, 2533-2541.

- Liu, M., vd. 2015. In vitro evaluation of alginate/halloysite nanotube composite scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, **49**, 700-712.
- Liu, Y., vd. 2019. Microfluidic synthesis of highly spherical calcium alginate hydrogels based on external gelation using an emulsion reactant. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **283**, 802-809.
- Massaro, M., vd. 2017. Covalently modified halloysite clay nanotubes: Synthesis, properties, biological and medical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, **5**, 2867-2882.
- Murphy, C. M., vd. 2010. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, **31**, 461-466.
- Palantöken, S., vd. 2016. A novel nonchemical approach to the expansion of halloysite nanotubes and their uses in chitosan composite hydrogels for broad-spectrum dye adsorption capacity. *Polymer Composites*, **37**, 2770-2781.
- Rong, R., vd. 2016. Facile preparation of homogeneous and length controllable halloysite nanotubes by ultrasonic scission and uniform viscosity centrifugation. *Chemical Engineering Journal*, **291**, 20-29.
- Sun, T., vd. 2018. Microfluidic spun alginate hydrogel microfibers and their application in tissue engineering. *Gels*, **4**, 38.
- Tripathy, T., vd. 1999. Novel flocculating agent based on sodium alginate and acrylamide. *European Polymer Journal*, **35**, 2057-2072.
- Wu, Y., vd. 2019. Advances in halloysite nanotubes–polysaccharide nanocomposite preparation and applications. *Polymers*, **11**, 987.
- Yuan, P., vd. 2008. Functionalization of halloysite clay nanotubes by grafting with  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane. *The Journal of Physical Chemistry C*, **112**, 15742-15751.
- Zohuriaan, M. and Shokrolahi, F. 2004. Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing*, **23**, 575-579.