

**NANOTOPOGRAFİK FİBER  
MATRİKSLERİN DOKU İSKELESİ  
OLARAK ÜRETİMİ VE İN-VİTRO  
ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**PRODUCTION OF  
NANOTOPOGRAPHIC FIBER  
MATRICES AS TISSUE SCAFFOLD  
AND INVESTIGATION OF THEIR IN-  
VITRO EFFECTIVENESS**

**ŞEYMA POYRAZ**

**PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

# ÖZET

## NANOTOPOGRAFİK FİBER MATRİKSLERİN DOKU İSKELESİ OLARAK ÜRETİMİ VE İN-VİTRO ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ

**Şeyma POYRAZ**

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**

**Ocak 2022, 66 sayfa**

Bu çalışma “Nanotopografik Fiber Matrikslerin Doku İskelesi Olarak Üretimi ve İn-vitro Etkinliklerinin İncelenmesi” başlıklı Lisansüstü Tez Projesi (18725) kapsamında Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Sunulan tez çalışması kapsamında nanotopografik morfolojiye sahip fiber matrikslerin üretilmesi ve üretilen fiber matriksler üzerinde hücrel davranışların incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak biyobozunur bir poliester olan ε-polikaprolakton (PCL) polimeri kullanılarak, elektroğirme yöntemi ile nanotopografik desenlere sahip, rastgele ve hizalı düzende fiber matriksler üretilmiştir. Üretilen fiberlerin ayrıntılı karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Son aşamada fibroblast (insan dermal fibroblast hücre hattı-BJ) ve epitel (insan dermal keratinosit hücre hattı-HS2) morfolojide olmak üzere iki farklı hücre hattı kullanılarak fiberler üzerindeki hücrel davranışlar incelenmiştir.

Konsantrasyonu % 11 (w/v) olan PCL çözeltisi, sırasıyla 1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol (HFIP), kloroform (CF)/N,N-dimetilformamid (DMF):9/1 (v/v), CF/dimetil sülfoksit (DMSO):8/2 (v/v), diklorometan (DCM)/DMSO:8/2 (v/v), aseton (ACT)/DMSO:8/2 (v/v) ve

tetrahidrofuran (THF)/DMSO:9/1 (v/v), iyi/kötü çözücü kombinasyonları kullanılarak hazırlanmıştır. Fiber matriksler üzerindeki çeşitli nanotopografik ayrıntılar, kullanılan bu çözücülerin faz ayrımı mekanizmaları ile elde edilmiştir. HFIP çözücüsü kullanılarak üretilen pürüzsüz morfolojideki rastgele ve hizalı örneklerde tek çözücü kullanıldığından faz ayrımı görülmemiştir. Buruşuk morfolojiye sahip rastgele düzende fiber matriksler, CF/DMF ve DCM/DMSO çözücü sistemlerinin kullanıldığı kötü çözücü ile indüklenen faz ayrımı mekanizması (NIPS) aracılığıyla elde edilmiştir. Rastgele düzendeki gözenekli morfolojiye sahip fiber matriksler ise CF/DMSO ve THF/DMSO çözücü sistemleri ile elde edilmiştir. Bu sistemde NIPS mekanizması yanında kapalı sistem içerisinde korunan bağıl nemin etkisiyle buhar ile indüklenen faz ayrımı (VIPS) gerçekleşmiş ve gözenek yapısı oluşmuştur. Rastgele düzende benekli morfolojiye sahip fiber matriksler ise ACT/DMSO çözücü sistemi kullanılarak nefes şekilleri (BF) mekanizması aracılığıyla elde edilmiştir. Hizalı düzende üretilen nanofiberlerde, tüm çözücü sistemlerinde, döner toplayıcının etkisiyle ısıl olarak indüklenen faz ayrımı mekanizması (TIPS) aracılığıyla oluklu (groove) morfoloji elde edilmiştir.

Üretilen fiber matrikslerin yüzey morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile görüntülenmiş ve üretim yöntemine göre pürüzsüz, buruşuk, gözenekli, benekli ya da oluklu morfolojiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Fiberlerin kimyasal yapıları Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile incelenmiş ve örneklerin PCL polimerinin karakteristik piklerine sahip olduğu ortaya koyulmuştur. Fiber matrikslerin kimyasal yapılarının doğrulanması, yapı içerisindeki fazların belirlenmesi için X Işını Kırınımı (XRD) analizi yapılmıştır. Fiber matriks üretiminde kullanılan çözücüler, yarı kristalin yapıdaki PCL polimerinin kristalinitesinde artışa yol açmıştır ve her grup için  $2\theta$  ( $^{\circ}$ ) = 21.4 ve 23.7'de iki adet şiddetli pik gözlenmiştir. Fiberlerin ısıl özellikleri Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ve Termogravimetrik Analiz (TGA) ile belirlenmiştir. Sonuçlar doğrultusunda PCL fiber matrikslerin karakteristik erime piklerinin 56°C-61°C aralığında değiştiği ve her grup için ilk bozunma sıcaklıklarının 388°C civarında olduğu görülmüştür. Yüzey pürüzlülük analiziyle, en yüksek pürüzlülük değerinin, benekli morfolojiye sahip olan ve ACT/DMSO-R çözücü sistemiyle üretilen fiber matrikslerde olduğu tespit edilmiştir.

Hücre kültür çalışmaları kapsamında fibroblastik (BJ) ve epitelyal (HS2) olmak üzere 2 farklı fenotipe sahip hücre hattının nanofiberler üzerindeki hücresel davranışları incelenmiştir. Bu amaçla hemositometrik sayım ile hücre tutunma oranları hesaplanmış, hücre canlılığı MTT

analizi ile takip edilmiş, fiberler üzerindeki hücre morfolojisi, hücre-hücre ve hücre-malzeme etkileşimleri ise SEM analizi ile belirlenmiştir. Son olarak hücre iskeletinin organizasyonu F-aktin/çekirdek ikili boyamaları ile görüntülenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, her iki hücre hattı için de en etkin hücre tutunmasının buruşuk morfolojideki fiberler üzerinde gerçekleştiği görülmüştür. Hücre proliferasyonuna bakıldığında ise BJ hücrelerinin canlılığının kültür boyunca çok fazla değişmediği belirlenmiştir. HS2 hücrelerinin canlılığının ise tüm fiberler üzerinde zamana bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. SEM görüntüleri her iki hücre tipi için de hücrelerin rastgele fiberler üzerinde her yöne yayılırken, düzenli fiberler üzerinde hücre uzamasının fiber yönünü takip ettiğini göstermiştir. Ayrıca fiberler üzerindeki topografik yapıların her iki hücrede hücre-hücre ve hücre-yüzey etkileşimlerini arttırdığı görülmüştür. Bu sonuç floresan görüntüler ile de desteklenmiş ve özellikle buruşuk ve benekli morfolojinin aktin filamentlerinin sayısını artırdığı tespit edilmiştir. İki hücre grubu kıyaslandığında, fiberler üzerinde keratinosit hücrelerinin gruplar halinde çoğaldığı, dermal fibroblastların ise daha yoğun bir iskelet organizasyonu ile yüzeyde daha geniş alanlara yayıldıkları belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, doku mühendisliğinde kullanılması planlanan nanofibröz iskelelerin üretiminde fiber özelliklerinin (çap, yüzey nanotopografisi ve organizasyon) hücre morfolojisiyle birarada değerlendirilmesinin gerekli ve önemli olduğunu vurgulamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Nanotopografi, PCL, elektroegirme, insan dermal fibroblast, insan keratinosit

## **ABSTRACT**

# **PRODUCTION OF NANOTOPOGRAPHIC FIBER MATRICES AS TISSUE SCAFFOLD AND INVESTIGATION OF THEIR IN-VITRO EFFECTIVENESS**

**Şeyma POYRAZ**

**Master of Science, Department of Bioengineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**

**January 2022, 66 pages**

This study was funded by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (BAP) graduate project entitled "Production Of Nanotopographic Fiber Matrices As Tissue Scaffold And Investigation Of Their In-Vitro Effectiveness." (18725).

In this thesis, it was aimed to produce fiber matrices with nanotopographic details and to examine the cellular behavior on them. For this purpose, random and aligned fiber matrices with nanotopographic patterns were produced by electrospinning using a biodegradable polyester polycaprolactone (PCL). Characterization studies were carried out and then, cellular behaviors on the fibers were examined in terms of adhesion, proliferation and morphology, using two different cell lines in the fibroblastic (human dermal fibroblast cell line-BJ) and epithelial (human dermal keratinocyte cell line-HS2) morphology.

PCL solution with 11% (w/v) concentration was prepared by using solvent/non-solvent combinations including 1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol (HFIP), chloroform (CF)/N, N-dimethylformamide (DMF): 9/1, (v/v), CF/dimethyl sulfoxide (DMSO):8/2 (v/v),

dichloromethane (DCM)/ DMSO:8/2 (v/v), acetone (ACT)/DMSO:8/2 (v/v) and tetrahydrofuran (THF)/DMSO:9/1 (v/v). Various nanotopographic details on the fiber matrices were obtained via the phase separation mechanisms and observed by scanning electron microscope (SEM). No phase separation was observed in the random and aligned samples with smooth morphology produced using the HFIP solvent. Random fiber matrices with wrinkled morphology were obtained by non-solvent induced phase separation mechanism (NIPS) using CF/DMF and DCM/DMSO solvent systems. On the other hand, CF/DMSO and THF/DMSO solvent systems were used in the production of random fiber matrices with porous morphology. In this system, besides the NIPS mechanism, vapour-induced phase separation (VIPS) was occurred as a results of the relative humidity in the closed system. Random fiber matrices with crater-like morphology were obtained via breath figures (BF) mechanism using the ACT/DMSO solvent system. Aligned fibers with groove morphology were obtained by thermally induced phase separation mechanism (TIPS) in fiber matrices by the effect of the rotating drum in all solvent systems.

The chemical structures of the fibers were investigated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and it was revealed that the samples had characteristic peaks of PCL. X-Ray Diffraction (XRD) analysis was performed to confirm the chemical structures of the fiber matrices and determine the phases in the structure. Solvents used in fiber matrix production led to an increase in the crystallinity of the semi-crystalline PCL polymer and two intense peaks were observed at  $2\theta$  ( $^{\circ}$ ) = 21.4 and 23.7 for each group. The thermal properties of the fibers were determined by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Thermogravimetric Analysis (TGA). According to the results, it was observed that the characteristic melting peaks of PCL fiber matrices ranged from 56 $^{\circ}$ C to 61 $^{\circ}$ C, and the initial degradation temperatures for each group were around 388 $^{\circ}$ C. By surface roughness analysis, it was determined that the highest roughness was found in fiber matrices with crater-like morphology and produced with ACT/DMSO-R solvent system.

Within the scope of cell culture studies, the cellular behaviors of cell lines with 2 different phenotypes, fibroblastic (BJ) and epithelial (HS2), on the nanofibers were investigated. For this purpose, percentage of cell adhesion was calculated by hemocytometric counting, cell viability was followed by MTT analysis and cell morphology on fibers, cell-cell, cell-material interactions were determined by SEM analysis. Finally, the organization of the cytoskeleton was visualized by F-actin/nucleus dual staining. When the results were evaluated, it was

observed that for both cell lines, the most effective cell attachment occurred on the fibers with the wrinkled morphology. Considering the cell proliferation, it was determined that the viability of BJ cells did not change much during the culture period. On the other hand, it was found that the viability of HS2 cells increased with time on all fibers. When the SEM images were examined, it was seen that the cell elongation on the aligned fibers followed the fiber direction, while the cells spread in all directions on the random fibers for both cell types. It was observed that the topographic structures on the fibers increased cell-cell and cell-surface interactions for both cells. This result was supported by fluorescent staining and it was indicated that especially wrinkled and crater-like morphology increased the number of actin filaments. When the two cell groups were compared, it was determined that keratinocyte cells proliferated in groups on the fibers, while dermal fibroblasts spread over larger areas on the surface with a denser skeletal organization.

The results emphasize that, it is necessary and important to evaluate the fiber properties (diameter, surface nanotopography and organization) together with cell morphology in the production of nanofibrous scaffolds that are planned to be used in tissue engineering.

**Key Words:** Nanotopography, PCL, electrospinning, human dermal fibroblast, human keratinocyte

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca benden sabrını, anlayışını, bilgi ve tecrübelerini, güleryüzünü, maddi ve manevi desteğini, şefkatini esirgemediği için değerli hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na pek çok saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın önemli bir kısmı olan hücre kültür çalışmalarında bana çokça yardımı dokunan, maskemden bile gizleyemediğim stresimi pozitifliğiyle anında yok edip rahatlatan, içtenliğiyle her zaman motive eden, çok anlayışlı, çok tatlı Dr. Öğr. Gör. Anıl Sera Çakmak hocama çok çok saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin tamamlanmasında 18725 numaralı proje ile maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (BAP), teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda bana en çok yardımı dokunan, bilgisini ve deneyimini en cömert şekilde benimle paylaşan, gördüğümde hem yüzümü hem de kalbimi güldüren, 'iyi ki' dediğim ve hep de diyeceğim canım Zeynep Altınışik'a; 'iyi ki Ankara'ya gelmişim de kalbi nasibim olmuş' dediğim, hem iyi hem de zor zamanlarımda bana kalbi gibi evini de açan, beni ve papillalarımı neşelendiren canım Arife Macit'e; tanıdığım için kendimi çok nasipli hissettiğim, orijinalliğinden kendimi alamadığım, beni gerçekten çok mutlu eden, çokça yardımları dokunan canım İzgen Canver'e; her seferinde 'kardeş olsak bu kadar olurdu herhalde' dediğim, zor zamanlarımda desteğini çokça hissettiğim, sevdiğimi ve sevildiğimi dolu dolu hissettiğim canım Gökçe Mülazımoğlu'na ne kadar teşekkür etsem o kadar az!

Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu'ndaki, her soruma ve acemiliğime anlayışları, ilgileri ve engin bilgileriyle karşılık veren, 'günaydın dın dın'ımı havada bırakmayan tüm arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazım sürecinde dinlemekten bıkmadığım –her ne kadar benden bihaber olsalar da- Beethoven, Göksel Baktagir, Çaykovski, Yeni Türkü, Yann Tiersenn, İncesaz'a; Ankara'da keşfettiğim ve unutamayacağım güleryüzle, hoş sohbetle, entelektüel dertlerle ağırlandığım Ekmek Teknesi'ne bana katlandıkları için teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her anında, her ahvalimde, bitmek bilmeyen ve sürekli değişen hayallerimi, planlarımı dinlemekten bir an olsun sıkılmayan, beni hep seven, daima anlayan ve güvenen, canı gönülden kocaman 'iyi ki' diyebileceğim canım annem Hanım Poyraz'a, canım babam İsmet Poyraz'a, canım kardeşlerim Şeyda, Miraç ve minik adamım Yusuf'a en kalpten sevgi, saygı ve teşekkürleri sunarım.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Nanotopografi Temelli Doku Mühendisliği.....	5
2.1.1. Nanotopografik Biyomalzemelerin Üretim Yöntemleri .....	8
2.1.2. Nanotopografik Malzemelerin Karakterizasyonu .....	12
2.1.3. Nanotopografiye Karşı Oluşturulan Hücresel Cevap.....	12
2.1.4. Nanotopografinin Uygulama Alanları.....	14
2.2. Elektroğirme Yöntemi .....	15
2.2.1. Elektroğirme Yöntemi ile Nanotopografik Matrikslerin Üretilmesi .....	15
2.3. PCL'nin Yapısı ve Fiziksel Özellikleri .....	22
2.3.1. PCL Nanofiberlerin Doku Mühendisliği Uygulamaları.....	23
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	25
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Biyolojik Malzemeler.....	25
3.2. PCL Fiber Matrikslerin Üretimi .....	26
3.2.1. Nanotopografik PCL Fiber Matrikslerin Karakterizasyonu.....	28
3.3. Hücre Kültür Çalışmaları .....	29
3.3.1. Hücre Tutunma Çalışmaları .....	29
3.3.2. Hücre Canlılığı .....	30
3.3.3. SEM Analizi .....	30
3.3.4. Floresan Mikroskobu ile Görüntüleme .....	30
3.3.5. İstatistiksel Analiz .....	31

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	32
4.1. PCL/Çözücü Seçimi ve Çözeltilerin Hazırlanması .....	32
4.2. PCL Fiber Matrislerin Üretim Koşullarının Belirlenmesi.....	34
4.3. PCL Fiber Matrislerin Karakterizasyon Sonuçları.....	35
4.3.1. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Analiz Sonuçları .....	35
4.3.2. FTIR (Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi) Analiz Sonuçları .....	40
4.3.3. XRD (X Işını Kırınımı) Analiz Sonuçları .....	40
4.3.4. TGA (Termogravimetrik) ve DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre) Analiz Sonuçları .....	42
4.3.5. Gözeneklilik ve Pürüzlülük Analizi .....	44
4.4. Hücre Kültür Çalışmalarının Sonuçları.....	47
4.4.1. Hücrelerin Karakterizasyonu.....	47
4.4.2. Fibröz Doku İskelelerine BJ ve HS2 Hücrelerinin Tutunması .....	48
4.4.3. BJ ve HS2 Hücrelerinin MTT Analizi Sonuçları .....	50
4.4.4. BJ ve HS2 Hücrelerinin Morfolojik İncelemesi.....	51
5. GENEL SONUÇLAR .....	57
6. KAYNAKLAR.....	59
EKLER .....	66
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu .....	66
ÖZGEÇMİŞ .....	67

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> Hücre-yüzey etkileşiminin (adezom) şematik görüntüsü: integrinler (mavi), ECM'deki fibronektin (kahverengi) gibi proteinler ile etkileşime girer. Bu etkileşim, hücre içi kısımda ise integrin adaptör proteinleri (yeşil), sinyal molekülleri (sarı) ve hücre iskeleti (pembe) ile ilişki içerisindedir. Bu bağlanma ile mekanik etkiler hücre içi sinyallere dönüştürülür ve hücre çekirdeğine aktarılır.....	6
<b>Şekil 2.2.</b> Nanotopografik yüzeyler üzerinde kültüre edilen hücreler: (a) Yüzeyinde nano sütunlar bulunan polistiren malzeme üzerinde fibroblast kültürü, (b) esnek poli(dimetil siloksan) sütunlar üzerinde kültüre edilen fibroblast. ....	7
<b>Şekil 2.3.</b> Malzeme yüzeyindeki farklı nanotopografik desenler.....	8
<b>Şekil 2.4.</b> Nanotopografik detaylara karşı oluşturulan hücresel cevaplar.....	13
<b>Şekil 2.5.</b> Elektroçirime işleminin şematik görüntüsü. ....	15
<b>Şekil 2.6.</b> Elektroçirime ile üretilen farklı yapılara sahip nanofiberler: (a) rastgele (b) hizalı, (c) desenli, (d) örümcek ağı şeklinde, (e) boncuklu, (f) şerit şeklinde (g) sarmal, (h) gözenekli, (i) kolye benzeri, (j) havai fişek şeklinde, (k) pirinç tanesi şeklinde, (l) çekirdek-kabuk şeklinde, (m) çok kanallı boru şeklinde, (n) çok çekirdekli kablo benzeri, (o) tüp içinde tüp şeklinde, (p) mikrotüp içinde nanotel şeklinde ve (r) içi boş nanofiberler. ....	17
<b>Şekil 2.7.</b> İyi-kötü çözücü varlığında polimer çözeltisinde meydana gelen faz ayrılması.....	18
<b>Şekil 2.8.</b> Yüzeyde nanotopografik desenlerin oluşmasına neden olan NIPS mekanizmasının şematik görüntüsü. ....	19
<b>Şekil 2.9.</b> Yüzeyde nanotopografik desenlerin oluşmasına neden olan VIPS mekanizmasının şematik görüntüsü. ....	20
<b>Şekil 2.10.</b> Nefes şekilleri mekanizması ile gözenek oluşumunun şematik görüntüsü.....	21
<b>Şekil 2.11.</b> PCL'nin sentezi ve zincir yapısı. ....	23
<b>Şekil 4.1.</b> Farklı morfolojilere sahip PCL fiber matrislerinin SEM görüntüleri; HFIP-R (a), HFIP-A (b), CF/DMF-R (c), CF/DMF-A (d), DCM/DMSO-R (e), DCM/DMSO-A (f). 38	
<b>Şekil 4.1. (Devam)</b> CF/DMSO-R (g), CF/DMSO-A (h), THF/DMSO-R (i), THF/DMSO-A (k), ACT/DMSO-R (l), ACT/DMSO-A (m) (fotoğraflar: 1µm, küçük fotoğraflar: 5 µm). ...	39
<b>Şekil 4.2.</b> PCL fiber matrislerin FTIR analizi; PCL polimeri (a), HFIP-R (b), CF/DMF-R (c) ve THF/DMSO-R (d). ....	40
<b>Şekil 4.3.</b> Farklı morfolojilere sahip PCL fiber matrislerinin XRD spektrumları. ....	41
<b>Şekil 4.4.</b> PCL polimerinin ve PCL fiber matrislerin TGA termogramları. ....	43

<b>Şekil 4.5.</b> PCL polimerinin ve PCL fiber matrikslerin DSC termogramları.....	44
<b>Şekil 4.6.</b> PCL fiber matrikslerinin lazer konfokal mikroskobu ile elde edilen üç boyutlu yüzey topografisi; HFIP-R (a), HFIP-A (b), CF/DMF-R (c), THF/DMSO-R (d), ACT/DMSO-R (e) (100X).....	46
<b>Şekil 4.7.</b> Hücrelerin optik mikroskop fotoğrafları; BJ (a) ve HS2 (b) (10X). ....	48
<b>Şekil 4.8.</b> Hücrelerin hemositometrik sayım yöntemi ile elde edilen büyüme eğrileri; BJ (a) ve HS2 (b). ....	48
<b>Şekil 4.9.</b> PCL fiber matriksler üzerindeki BJ ve HS2 hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri. ....	51
<b>Şekil 4.10.</b> PCL fiber matriksler üzerinde BJ hücrelerinin SEM fotoğrafları ve F-aktin/DAPI boyama görüntüleri (hücre iskeleti-yeşil, hücre çekirdeği-mavi). ....	53
<b>Şekil 4.11.</b> PCL fiber matriksler üzerinde HS2 hücrelerinin SEM fotoğrafları ve F-aktin/DAPI boyama görüntüleri (hücre iskeleti-yeşil, hücre çekirdeği-mavi). ....	54

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Nanotopografik detaylara sahip malzemelerin üretim yöntemleri.....	9
<b>Çizelge 2.2.</b> Biyomalzeme özellikleri. ....	22
<b>Çizelge 2.3.</b> PCL'nin fiziksel özellikleri.....	23
<b>Çizelge 3.1.</b> Çözücülerin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	26
<b>Çizelge 3.2.</b> Rastgele ve hizalı düzende üretilen PCL fiber matrikslerinin elektroçirme koşulları ve kullanılan mekanizmalar. ....	27
<b>Çizelge 4.1.</b> PCL fiber matrikslerin ImageJ ile hesaplanan fiber çapları, fiber yüzeyindeki gözenek çapları ve fiberlerin hizalanma dereceleri.....	37
<b>Çizelge 4.2.</b> Farklı morfolojilere sahip PCL fiber matrikslerinin $2\theta$ ( $^{\circ}$ ) pik ve yüzde kristalinite değerleri.....	42
<b>Çizelge 4.3.</b> PCL polimerinin ve PCL fiber matrikslerin TGA termogramlarından elde edilen $T_o$ (ilk bozunma) ve DSC termogramından elde edilen $T_e$ (erime) sıcaklıkları.....	44
<b>Çizelge 4.4.</b> PCL fiber matrikslerin yüzey pürüzlülük değerleri ( $R_a$ ).....	46
<b>Çizelge 4.5.</b> BJ ve HS2 hücrelerinin fiber matriks doku iskelelerine (%) tutunma oranları....	49

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\theta$	Teta
$\lambda$	Dalga boyu
Da	Dalton
$^{\circ}$	Derece
$\varepsilon$	Epsilon
k	Kilo
L	Litre
$\mu$	Mikro
m	Mili
M	Molar
n	Nano
Pa	Paskal
V	Volt

### Kısaltmalar

$\alpha$ -MEM	Minimum Essential Medium-Alfa Modifikasyonu
ACT	Aseton
BF	Nefes Şekilleri
BJ	İnsan Dermal Fibroblast Hücre Hattı
CF	Kloroform
DCM	Diklorometan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	N,N-Dimetilformamid

DMSO	Dimetil Sülfoksit
D-PBS	Dulbecco'nun Fosfat Tampon Çözeltisi
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
ECM	Hücre Dışı Matriks
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EtOH	Etanol
FBS	Fötal Sığır Serumumu
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi
GA	Gluteraldehit
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hekzafloro-2-Propanol
HMDS	Hekzametildisilazan
HS2	İnsan Dermal Keratinosit Hücre Hattı
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-Difenilterazolyum Bromür
NIPS	Kötü Çözücü ile İndüklenen Faz Ayrımı
PCL	$\epsilon$ -Polikaprolakton
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik asit-ko-glikolik asit
PLLA	Poli-l-laktit asit
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PRP	Trombosit Yönünden Zengin Plazma
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TCPS	Hücre Kültür Kabı
TGA	Termogravimetrik Analiz
THF	Tetrahidrofur

TIPS	Isıl Olarak İndüklenen Faz Ayrımı
UV	Ultraviyole
VIPS	Buharla İndüklenen Faz Ayrımı
XRD	X Işını Kırınımı
2B	İki Boyutlu
3B	Üç Boyutlu
v/v	Hacimce Oran
w/v	Kütle-hacim Oranı





# 1. GİRİŞ

Son yıllarda yapılan doku mühendisliği çalışmaları, doğal dokunun nanotopografik özelliklerini taklit eden malzemelerin biyouyumluluk cevabını iyileştirdiğini ve daha iyi bir malzeme-doku integrasyonu sağladığını ortaya koymaktadır [1]. Hücre tutunması doku oluşumunun en temel basamağıdır. Hücre tutunmasının özellikle hücre çoğalması, mezenkimal kök hücre farklılaşması, biyomalzeme-doku integrasyonu ve biyofilm oluşumunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Literatürde hücre tutunmasının biyomalzemenin mikro ve nano yüzey özelliklerinden etkilendiği belirtilmiş ve bu noktada nanotopografik yaklaşımlar önem kazanmıştır [2,3]. Nanofabrikasyon yöntemleri ile oluşturulan *in vivo*-benzeri mikroçevreler hücrelere fiziksel ipuçları sağlayarak hücreye özgü fonksiyonları uyarmaktadır. Isıl, optik, kimyasal ve fiziksel olmak üzere farklı yöntemler ile malzemeler üzerinde nano-çukurlar, nano-kafesler ya da nano-çıkıntılar gibi nanotopografik ayrıntılar oluşturulabilmektedir. Genellikle litografik temellere dayanan bu yöntemler dışında elektroğirme gibi elektriksel yöntemler ile de nanotopografik malzemeler geliştirilebilmektedir. Nanotopografik yüzeyler üzerinde hücrelerin tutunması, proliferasyonu, morfolojisi, göç kapasitesi ve gen ekspresyonu gibi özelliklerinin kontrol edilebildiği görülmektedir [2,4].

Vücudumuzdaki dokular pek çok hücrenin oldukça organize bir hücre dışı matriks (ECM) yapısı içerisinde yerleşmesi ile oluşur. Hücre dışı matriks, nano ölçekten makro ölçeye uzanan oldukça hiyerarşik bir yapıdır [4]. Doku iskelesi olarak kullanılan nanofibröz malzemeler hem morfolojik hem de yapısal olarak ECM'yi oldukça iyi taklit edebilecek niteliktedir. Diğer yandan nanofibröz malzemeler ile yüksek gözeneklilik ve yüksek yüzey/hacim oranı elde edilebilmektedir. Kendiliğinden düzenlenme, faz ayrılması ve elektroğirme yöntemleri nanofibröz malzemelerin üretimine olanak sağlamaktadır. Bu yöntemler arasında elektroğirme, kolay uygulanabilirlik, çok yönlü kullanım, düşük maliyet, ölçek büyütme elverişli olması gibi özellikleri nedeniyle ön plana çıkmaktadır. Elektroğirme yöntemi ile rastgele ya da düzenli olmak üzere farklı fiber organizasyonlarında matriks üretimleri gerçekleştirilebilmektedir. Aynı zamanda elektroğirme pek çok doğal ve sentetik polimer ile çalışmaya olanak sağlamaktadır.

Yapılan çalışmalarda elde edilen fiberler kullanılan malzemeye göre fonksiyonel hale getirilerek daha etkin sonuçlar elde edilebilmektedir [5].

Son yıllarda elektroğirme ile ilgili yapılan çalışmalarda yeni yaklaşımlar kullanılarak, farklı faz ayrımı mekanizmaları üzerinden, nanotopografik ayrıntılara sahip olan fiberler üretilmiştir [6–11]. Bu çalışmalarda yüksek bağıl nem (RH) ortamı [12,13] ve/veya farklı çözücülerin bir arada kullanılması, katkı maddeleri [14] ve toplayıcı olarak su banyosunun [15] kullanılması gibi çeşitli uygulamalar ile elektroğirilmiş fiberlerin yüzey topografileri değiştirilebilmektedir [16]. Fiber matriks yüzeylerinde gözenekli, buruşuk, benekli, oluklu gibi farklı fiziksel morfolojiler çeşitli faz ayrımı mekanizmalarıyla indüklenmektedir. Bu amaçla kullanılan mekanizmalardan ilki, iyi çözücü (uçucu bir çözücü) ve kötü çözücüden (uçucu olmayan bir çözücü) oluşan iki çözücü karışımının kullanıldığı, kötü çözücü ile indüklenen faz ayrımı olarak adlandırılan mekanizmadır (NIPS). Diğer bir mekanizma olan buhar ile indüklenen faz ayrımı (VIPS), nemli bir atmosferde fiber yüzeyinden su buharının yoğunlaşmasıyla faz ayrımının gerçekleştiği yöntemdir [17] Isıl olarak indüklenen faz ayrımında (TIPS) ise sıcaklık, faz ayrımı için itici bir güç oluşturmaktadır [18]. Gözenekli morfolojiye sahip polimer fiberleri elde etmek için alternatif bir mekanizma da nefes şekilleri (BF) olarak bilinmektedir. Elektroğirme sırasında BF mekanizması aracılığıyla gözenekliliğin oluşması için iki gereksinim vardır: yüksek bağıl nem ve önemli bir sıcaklık düşüşü. Bu önemli sıcaklık düşüşünü sağlamak için DCM, CF ve THF gibi uçucu çözücüler kullanılmaktadır [19,20].

Salmasi ve ark. yaptıkları çalışmada, rastgele düzende pürüzsüz morfolojiye sahip ve hizalı düzende oluklu yüzey topografisine sahip polistiren (PS) fiberler üretmiştir. Oluklu yüzey topografisinin hücre proliferasyonunu, morfolojisini ve farklılaşmasını etkilediği belirtilmiştir [2]. Zhou ve ark. sunduğu çalışmada, nanogözeneklere sahip hizalı düzende üretilmiş poli (L-laktik asit) (PLLA) fiber matriksleri ile insan vasküler düz kas (vSMC'ler) hücrelerinin etkileşimini incelenmiştir. Elde ettikleri nanotopografik desenlerin, hücrelerin tutunmasını, proliferasyonunu ve hizalanma davranışlarını iyileştirdiğini ve vasküler matriks proteinlerinin sentezini arttırdığını bildirmişlerdir [21]. Kim ve grubunun sunduğu bir çalışmada, hizalı düzende oluklu morfolojiye sahip poli (üretan akrilat) (PUA) matriksler üretilmiştir. Matriksler üzerindeki nanotopografik

yapıların, insan mezenkimal kök hücrelerinin (hMSC) göçü ve çoğalması üzerinde uyarıcı etkisi olduğu tespit edilmiştir [2,4]. Bacakova ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise nanofibröz PLA membranları üzerinde insan dermal keratinosit hücrelerinin tutunma ve büyüme davranışları incelenmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre, gözenekli nanofibröz membranlarda hücrelerin metabolik aktivitelerinin ve hücre popülasyonunun arttığı, hücre-hücre etkileşimlerinin güçlendiği bildirilmiştir [22].

Laiva ve ark. 6 farklı çözücü kullanarak yaptıkları çalışmada geniş gözenekli, dar gözenekli ve buruşuk yüzey morfolojisine sahip PCL fiberler elde etmiştir [23]. Pant ve arkadaşları gözenekli ve gözeneksiz PCL fiberleri üretmişler ve bu fiberler üzerinde osteoblast hücrelerinin kültürünü yapmışlardır. Hücrelerin gözenekli fiberler üzerinde zamana bağlı olarak daha etkin bir şekilde çoğaldıklarını ortaya koymuşlardır [24]. Diğer bir çalışmada ise hücreler gözenekli PCL fiberlerin gözenekleri içerisinde 3-boyutlu bir büyüme göstermiştir. Aynı zamanda fiberler üzerindeki nanogözeneklerin, hücre tutunması yanında epitelyal böbrek hücrelerinin ve mezenkimal kök hücrelerin (MSC'ler) proliferasyonunu desteklediği belirtilmiştir [25].

İnsan göbek kordonu endotel hücreleri (HUVEC) ile yapılan bir başka çalışmada gözenekli fiberler üzerinde hücre canlılığı ve çoğalmasının arttığı, daha etkin hücre-hücre etkileşimlerinin kurulduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar gözenekli PCL matrikslerin doku mühendisliğinde endotel tabakaları oluşturmak için kullanılabileceğini göstermektedir [26]. Anarkoli ve ark tarafından sunulan çalışmada, farklı çözücü kombinasyonları kullanılarak pürüzsüz, oluklu ve gözenekli yüzey morfolojilerine sahip rastgele ve hizalı düzende PCL fiberler üretilmiştir. Bu fiberler üzerine L929 fare fibroblastları ekilmiş ve hücre davranışları incelenmiştir. Diğer fiberler ile kıyaslandığında oluklu fiberler üzerinde hücreler, uzamış hücre iskeleti ve çekirdek morfolojisi sergilemiştir. Gözenekli fiberlerin ise diğer gruplar ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunu daha etkin uyardığı belirlenmiştir [27].

Sunulan tez çalışması kapsamında öncelikle elektroçirme ile nanotopografik fiber matriksler oluşturulmuştur. PCL, biyobozunurluğu, biyoyumluluğu, kimyasal ve ısı

kararlılığı, iyi mekanik özellikleri ile bu alanda oldukça tercih edilen bir polimerdir [28]. Aynı zamanda ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından insan uygulamalarında kullanım için onaylanmıştır [29,30]. Bu özelliklerinden dolayı yapılan çalışmada fiber matriks üretimi için PCL polimeri seçilmiştir. Tez çalışmasının temel hedefi nanotopografik özelliklere sahip fiber matrikslerin üretilmesidir. Bu hedefe yönelik olarak gözenekli fiberlerin yanında, faz ayrımı mekanizmaları aracılığıyla, farklı topografik desenlere sahip fiberler de elde edilmiştir. Aynı zamanda farklı toplayıcılar kullanılarak rastgele ve düzenli olmak üzere farklı fiber organizasyonunda matriksler üretilmiştir. Üretilen matrikslerin morfolojik, fiziksel ve kimyasal yapılarının incelenmesi amacıyla SEM, FTIR, XRD, DSC, TGA ve yüzey pürüzlülük analizleri yapılarak karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Son olarak hücrelerin nanotopografik yüzeylere verdiği cevapları değerlendirmek için fibroblastik (BJ) ve epitelyal (HS2) morfolojideki 2 farklı hücre tipi ile *in vitro* çalışmalar yürütülmüştür. Öncelikle fiberler üzerindeki hücre tutunmasının etkinliği hemositometrik sayım ile değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı MTT analizi ile takip edilmiştir. Hücrelerin morfolojik incelemeleri, hücre-hücre, hücre-malzeme etkileşimleri SEM analizi ve F-aktin/çekirdek ikili boyamaları ile ortaya koyulmuştur. Sunulan tez kapsamında, geleneksel elektroçirme yöntemlerinin yanında yenilikçi yaklaşımların bir arada kullanılmasıyla farklı topografik özelliklerde matrikslerin üretilmesi ve farklı fenotipteki hücrelerin bu nanotopografik yüzeylere cevabının değerlendirilmesi çalışmanın özgün yönünü oluşturmaktadır.

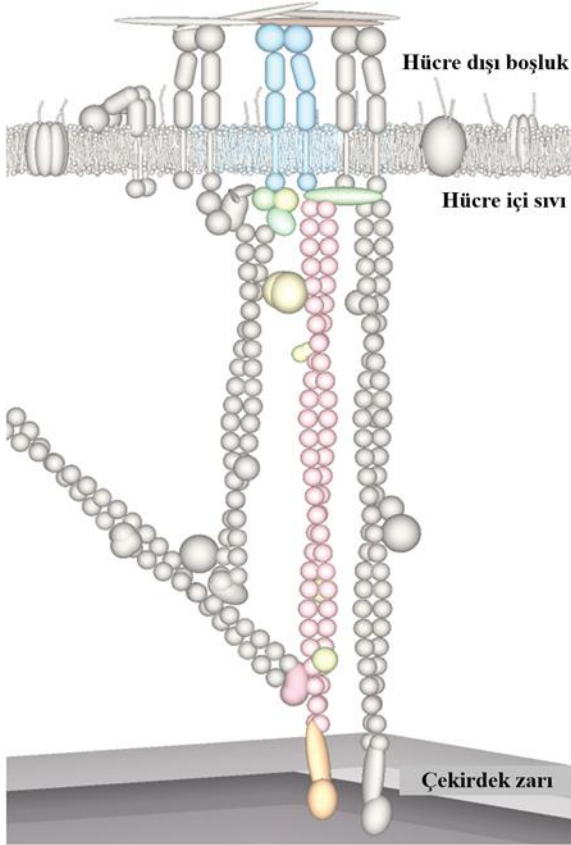
## 2. GENEL BİLGİLER

Tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili literatür bilgisine bu bölümde yer verilmiştir. Konular, nanotopografi temelli doku mühendisliği, elektroğirme yöntemi ve PCL'nin yapısı ve fiziksel özellikleri olmak üzere üç ana başlık altında toplanmıştır. İlk kısımda nanotopografi temelli doku mühendisliği yaklaşımı, nanotopografik malzemelerin karakterizasyonu, nanotopografiye karşı oluşturulan hücresel cevap ve nanotopografinin uygulama alanları ile ilgili bilgiler özetlenmiştir. İkinci kısımda, nanofiber üretim yöntemi olarak elektroğirmeden ve fiberlerin yüzeyinde topografik detaylar oluşmasını sağlayan faz ayrımı mekanizmalarından bahsedilmiştir. Üçüncü kısımda ise biyomalzeme olarak seçilen PCL'nin yapısı, fiziksel ve kimyasal özellikleri, uygulama alanları, doku mühendisliğindeki yeri ve doku iskelesi olarak kullanımının avantaj ve dezavantajları hakkında bilgi verilmiştir.

### 2.1. Nanotopografi Temelli Doku Mühendisliği

Vücudumuzdaki dokuları oluşturan hücreler oldukça karmaşık bir ECM yapısı içerisinde yer alır, bu karmaşık yapı nanodan mikro ölçeğe uzanan hiyerarşik bir düzen göstermektedir [4]. Hücreler ve ECM arasında devamlı bilgi alışverişinin olduğu oldukça dinamik bir ilişki söz konusudur. Hücresel aktiviteler ECM'den alınan bilgiler doğrultusunda düzenlenir ve bu bilgiler ışığında sentezlenen moleküller ile ECM'nin yapısı şekillenir. Hücresel aktiviteleri uyaran, bilinen iki önemli sinyal sistemi vardır. Kimyasal sinyaller yani büyüme faktörlerinin de içerisinde bulunduğu kemokinler, sitokinler ve gerilim kuvvetleri gibi mekanik sinyaller. Hücrenin içerisinde bulunduğu mikroçevrenin mikro ve nanotopografik özellikleri mekanik sinyallerin temel kaynağıdır [31]. Nanotopografi nano ölçekteki yüzey özellikleri olarak tanımlanabilir. Hücreler doku gelişimi sırasında nano ölçekteki sayısız topografik ve biyokimyasal sinyal ile etkileşim halindedir [32]. Hücre, yüzeydeki topografik detaylar ile adezyon molekülleri aracılığıyla etkileşir. Hücrede bulunan adezyon molekülleri (integrinler), ECM'nin yapısında bulunan laminin, fibronektin ve kollajen gibi proteinlere yüksek afinitede bağlanır ve fokal adezyon bölgeleri oluşur. Fokal adezyon bölgelerinin oluşumunu aktin stres fiberlerinin şekillenmesi takip eder. Son olarak mikrotübül oluşumu ile hücre-malzeme etkileşimi kararlı hale gelir. Hücrenin malzeme ile etkileşimi ve fokal adezyon bölgelerinin oluşumu filopodya, lameller yapılar ya da tüm hücre gövdesi ile

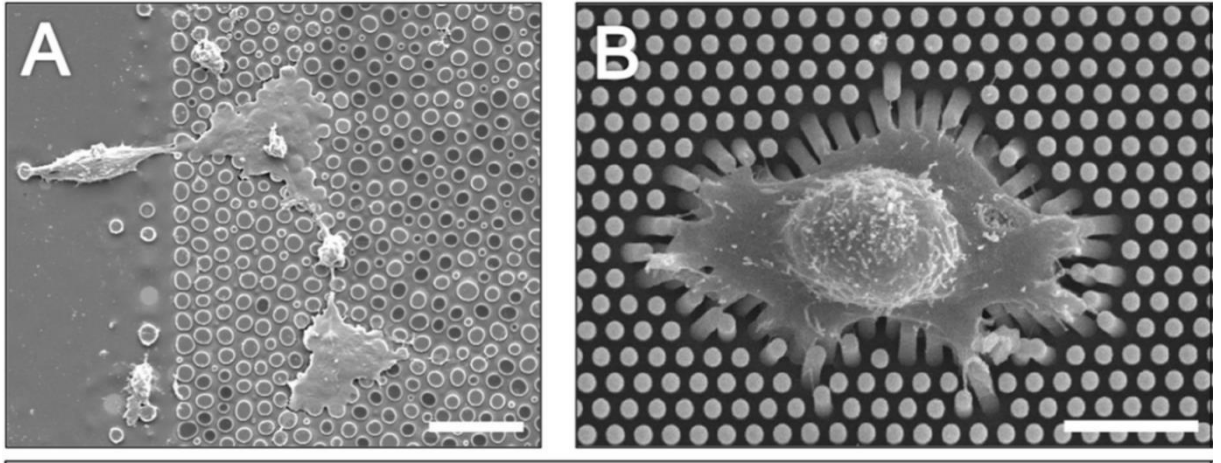
gerçekleşebilir. Hücrenin topografik yapıları algılaması, etkileşime geçmesi ve bu etkileşimin hücre içi sinyalizasyonu uyararak bir cevap oluşturması “mekanotransdüksiyon” olarak adlandırılır [33,34]. Fokal adezyon bölgeleri ile iletilen sinyal hücre iskeletinin düzenlenmesine neden olur ve bu düzenlenme gen ekspresyonu da dahil olmak üzere pek çok hücrel aktiviteyi uyarabilir [31,35] (Şekil 2. 1).



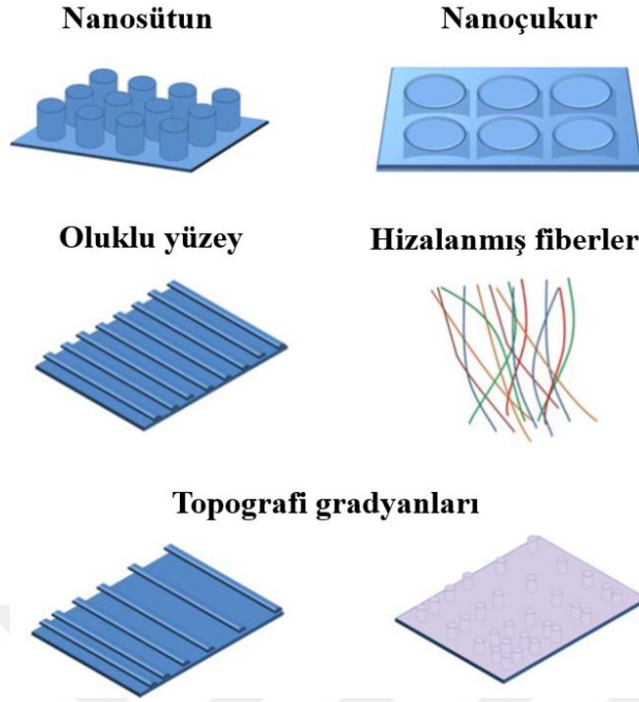
**Şekil 2.1.** Hücre-yüzey etkileşiminin (adezom) şematik görüntüsü: integrinler (mavi), ECM'deki fibronektin (kahverengi) gibi proteinler ile etkileşime girer. Bu etkileşim, hücre içi kısımda ise integrin adaptör proteinleri (yeşil), sinyal molekülleri (sarı) ve hücre iskeleti (pembe) ile ilişki içerisinde. Bu bağlanma ile mekanik etkiler hücre içi sinyallere dönüştürülür ve hücre çekirdeğine aktarılır [33].

Malzeme yüzey özelliklerinin hücrel aktiviteler üzerindeki öneminin anlaşılması ve nanoteknolojideki gelişmeler, nanotopografik detaylara sahip yüzeyler ile ilgili yapılan çalışmaları arttırmıştır (Şekil 2.2). Uzun zamandır yüzey pürüzlülüğünün hücre adezyonunu etkilediği bilinmektedir. Yüzeydeki nano detaylar, yüzey alanı yanında yüzeye adsorplanan protein miktarını da arttırmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalarda

aynı desenlerin, farklı malzeme yüzeylerinde aynı hücresel cevaplara neden olduğu, diğer yandan aynı malzeme yüzeyindeki farklı desenlerin hücre tutunması ve proliferasyonu gibi hücresel cevapları değiştirdiği görülmüş ve böylece nanotopografinin önemi vurgulanmıştır. Nanoteknolojik yöntemler ile malzeme yüzeylerinde çukur, sütun, basamak ve oluk gibi topografik desenler oluşturulabilir (Şekil 2.3). Desenin şekli, boyutu, simetrisi ve düzeni oluşacak hücresel cevap üzerinde etkilidir [31].



**Şekil 2.2.** Nanotopografik yüzeyler üzerinde kültüre edilen hücreler: (a) Yüzeyinde nano sütunlar bulunan polistiren malzeme üzerinde fibroblast kültürü, (b) esnek poli(dimetil siloksan) sütunlar üzerinde kültüre edilen fibroblast [32].



**Şekil 2.3.** Malzeme yüzeyindeki farklı nanotopografik desenler [33].

### 2.1.1. Nanotopografik Biyomalzemelerin Üretim Yöntemleri

Literatürde doku rejenerasyonu için kullanılan farklı nanoyapılar bulunmaktadır. Bunlar; anodik oksidasyon yöntemi ile elde edilen nanotüpler, koloidal litografi ile üretilen nanokolloidler, nanosütunlar, kalıplama, elektron ışını litografisi ve nanobaskılama yöntemleri ile elde edilen nanoçukurlar, nanooluklar, elektroğirme yöntemiyle üretilen nanofiberler, faz ayrımı ile elde edilen nanodotlar ve reaktif iyon aşındırma ile elde edilen nanopürüzler olarak sıralanabilir [36].

Malzeme üzerinde nanoyapılar oluşturmak için kullanılan teknikler yukarıdan aşağıya (top-down) ve aşağıdan yukarıya (bottom-up) olmak üzere iki yaklaşıma göre sınıflandırılmaktadır. Yukarıdan aşağıya yaklaşımında, yığın (bulk) olarak üretilmiş bir malzemenin yüzeyinde, üretim sonrası nano ölçekte bir yüzey organizasyonu oluşturulur. Bu yaklaşımda, fotolitografi, elektron ışını ve X ışını litografisi, reaktif iyon aşındırma, kimyasal aşındırma, anodik oksidasyon ve faz ayrımı teknikleri kullanılır. Aşağıdan yukarıya yaklaşımında ise, atomlar, moleküller veya nanoparçacıklar bir araya getirilerek istenilen nano ölçekli yüzey mimarileri elde edilir. Bu yaklaşımda, koloidal toplama, elektroğirme, nanobaskılama ve kalıplama yöntemleri kullanılmaktadır [36].

Nanotopografik malzemelerin üretiminde kullanılan yöntemler ısı, optik, fiziksel, kimyasal veya elektriksel olarak sınıflandırılabilir (Çizelge 2.1).

**Çizelge 2.1.** Nanotopografik detaylara sahip malzemelerin üretim yöntemleri [2,4].

<b>Enerji kaynağı</b>	<b>Yöntem</b>	<b>Mekanizma</b>	<b>İşlenebilir polimerler</b>
<b>Isıl</b>	Çoğaltma ile modelleme	Boşlukla doldurulmuş ön polimerin ısı çapraz bağlanmasıyla kalıbın negatif şeklinin oluşturulması	Isıl işlem görebilen polimerler (örneğin; poli dimetil siloksan)
	Nano-baskılama litografisi	Tg'nin üzerinde polimerin plastik deformasyonu ile kalıbın negatif şeklinin oluşturulması	Termoplastikler, örneğin; polistiren, poli laktik asit İletken polimerler, örneğin; polianilin ve polipirol
	Blok kopolimer litografisi	İki karışmaz polimerin mikro faz ayrımı ile nano ölçekli delik, çizgi ve katmanlı yapılar oluşturma	Blok kopolimer, örneğin polistiren-blok-poli(metil metakrilat), stirenbutadien-stiren
<b>Optik</b>	Fotolitografi	Maske tasarımına ve seçici UV maruziyetine bağlı olarak çözünürlük değişir	Işıkla sertleşebilen polimerler, örneğin fotorezist, poliüretan bazlı
	Elektron ışın litografisi	Farklı elektron ışını yolları ve odaklanmış ışınların seçici ışınlanması kullanılarak rastgele desenlerin oluşturulması	Elektron ışınlarına duyarlı polimerler, örneğin polimetil metakrilat
	Doğrudan lazer ile yazma	Lazer ışınlanması ile polimerin seçici çapraz bağlanmasıyla rastgele desenlerin oluşturulması	Işıkla sertleşebilen polimerler (foto-kürlenabilir)
<b>Kimyasal</b>	Mikro-baskılama	Malzemelerin aktarılması için gerekli olan göreceli yüzey enerjisi farkını kullanarak ekstrüde elastomerik damga desenleri oluşturma	Proteinler ve kendiliğinden oluşan tek tabakalar

**Çizelge 2.1. (Devam)**

<b>Kimyasal</b>	Dip-pen litografisi	Moleküllerin keskin bir uçla doğrudan yazılmasıyla rastgele desenlerin oluşturulması	Kendiliğinden oluşan tek tabakalar
	Tuz liçi/gaz köpürtme	Tuz parçacıklarının çözünmesi (tuz liçi) ve/veya polimer blokta kabarcık oluşumu (gaz köpüğü) ile boşluklu bir polimer bloğunun oluşumu	Çözücüde çözünebilen polimerler, örneğin termoplastik ve iletken olanlar
<b>Elektriksel</b>	Elektrokimyasal kaplama	Polimerin elektrokimyasal indirgenmesi ile negatif şekilli kalıpların oluşturulması	İletken polimerler
	Elektroçizme	Bir elektrik alanı kullanarak polimer çözeltisinden üç boyutlu bir nanofibröz ağ çizimi	Çözücüde çözünebilen polimerler
<b>Fiziksel</b>	Kılcal kuvvet litografisi	Termoplastik polimerin Tg'nin üzerinde kapilerin yükselmesiyle kalıbın kısmen doldurulmuş negatif şeklinin oluşumu	Termoplastik ve çözücüde çözünebilen polimerler
	Kılcal damarlarda mikro-kalıplama	Kapiler destekli mikro kanal dolgusu ile kalıbın negatif bir şeklinin oluşturulması	Çözücüde çözünebilen polimerler
	Buruşukluk	Mekanik bükülme kullanılarak rastgele veya hizalı düzendeki mikro-nano çizgilerin oluşumu, Elastik substrat ve sert film arasında mekanik bükülme	Elastomerik polimerler, örneğin polidimetilsiloksan

### **2.1.2. Nanotopografik Malzemelerin Karakterizasyonu**

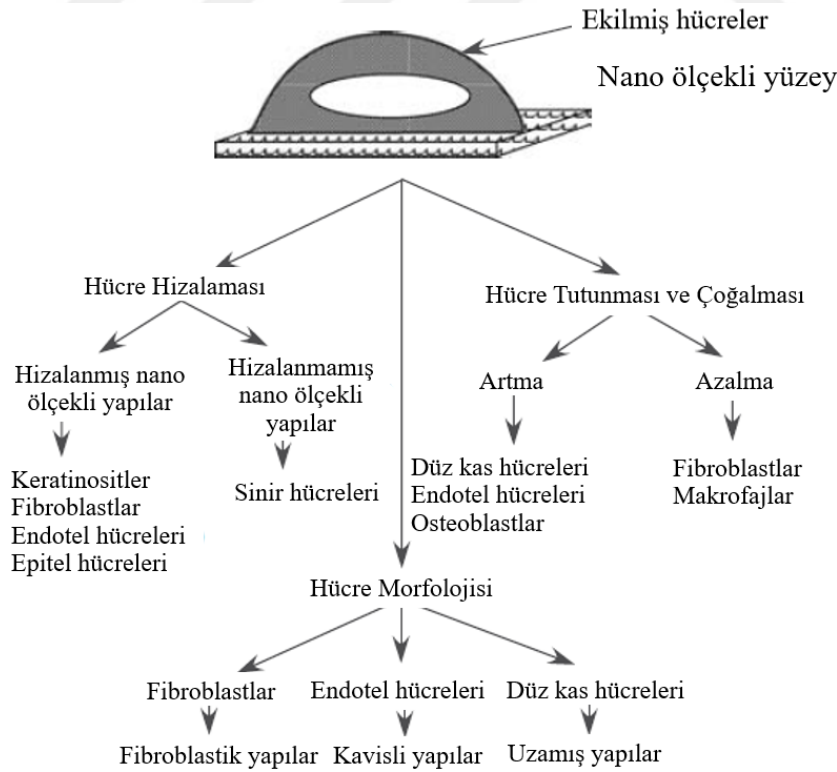
Nanotopografik malzemelerin yüzey özelliklerini belirlemek için pek çok karakterizasyon yönteminden yararlanılmaktadır. Malzeme yüzeyinin yapısını ve kimyasal özelliklerini araştırmak için X-Işınlı Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) kullanılmaktadır. Bu yöntemde elektron maruziyeti ile yüzeyin (50-100 Å derinlik) kimyasal bileşimiyle ilgili bilgi edinilir. Uçuş Zamanlı-İkincil İyon Kütle Spektrometresi (TOF-SIMS), yüksek vakum ortamında, iyonlar aracılığı ile yine yüzeyin yapısı ve kimyasal bileşimini belirtir. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Kütle Spektrometresi (MALDI-MS) protein-malzeme etkileşimi hakkında bilgi verir. Malzemenin yüzey topografisi hakkında bilgi edinmek için ise Atomik Güç Mikroskobu (AFM) kullanılır. Taramalı bir prob mikroskobu olan atomik kuvvet mikroskobu (AFM), karakterizasyon yöntemi olmasının yanında aynı zamanda yüzeylerin modifiye edilmesi için nanofabrikasyonda da kullanılır. AFM temelli nanoteknolojiler, nanomanipülasyon, nanograft oluşturma, nanooksidasyon ve dip-pen nanolitografi olarak adlandırılmaktadır. Aynı zamanda AFM'de kullanılan prob farklı fonksiyonel gruplar ile modifiye edilebilmekte ve Kimyasal Güç Mikroskobu (CFM) adını alarak yüzeyin kimyasal bileşimini incelemeye olanak vermektedir. Yüzey karakterizasyonunda X-ışını temelli mikroskoplar kullanılarak yüzeydeki moleküllerin oryantasyonu ve düzeni belirlenmektedir. Son olarak nanotopografik yüzeylerin karakterizasyonunda kullanılan en yaygın iki yöntem Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) olarak sıralanabilir. Her iki yöntemde de yüzeydeki nanotopografik detayların görüntülenmesinin yanında hücre-yüzey etkileşimlerinin belirlenmesi de gerçekleştirilir [1].

### **2.1.3. Nanotopografiye Karşı Oluşturulan Hücresel Cevap**

Nanotopografiye karşı oluşturulan hücresel cevap doku mühendisliği alanındaki en ilgi çekici konulardan biridir. Nanotopografi-hücre etkileşimi ile ilgili çalışmaların temelini doğal dokulardaki bazal membranın incelendiği çalışmalar oluşturmaktadır. Bu çalışmalarda farklı dokulardaki bazal membranlar AFM ile incelenmiş ve pek çok nanotopografik detay içerdikleri ortaya koyulmuştur. Bu noktadan yola çıkılarak malzeme yüzeylerinde oluşturulacak nano ölçekteki topografik yapılar ile hücresel aktivitelerin kontrol edilebileceği düşünülmüştür [1].

Hücrelerin nanotopografik detaylara hangi mekanizmalar ile cevap verdikleri tam olarak anlaşılacakla beraber bu yüzeylerin hücreler üzerinde doğrudan veya dolaylı etkisi olduğu düşünülmektedir. Doğrudan mekanizmada hücre fokal adezyon bölgeleri ve iyon kanalları ile topografik desenlere karşı bir cevap oluşturulmaktadır. Dolaylı mekanizmada ise malzeme yüzeyindeki topografiye bağlı olarak değişen protein adsorpsiyonuna karşı bir hücrel cevap meydana gelmektedir [1].

Nanotopografik yüzeylere karşı oluşturulan hücrel cevap hücreden hücreye farklılık gösterebilmektedir (Şekil 2. 4). Örneğin endotelial hücreler ve düz kas hücreleri pürüzlü yüzeylere düz yüzeylere nazaran daha iyi yapışırken, makrofaj-benzeri hücrelerde pürüzlülük arttıkça hücre tutunması azalmaktadır [1,34,37]. Diğer yandan topografik yapının boyutu da oluşacak hücrel cevap açısından oldukça önemlidir. Örneğin osteoblast hücreleri 5 nm'ye duyarlıyken, melanositler 50 nm'den büyük topografik detaylara karşı cevap oluşturur [1,38].



**Şekil 2.4.** Nanotopografik detaylara karşı oluşturulan hücrel cevaplar [1].

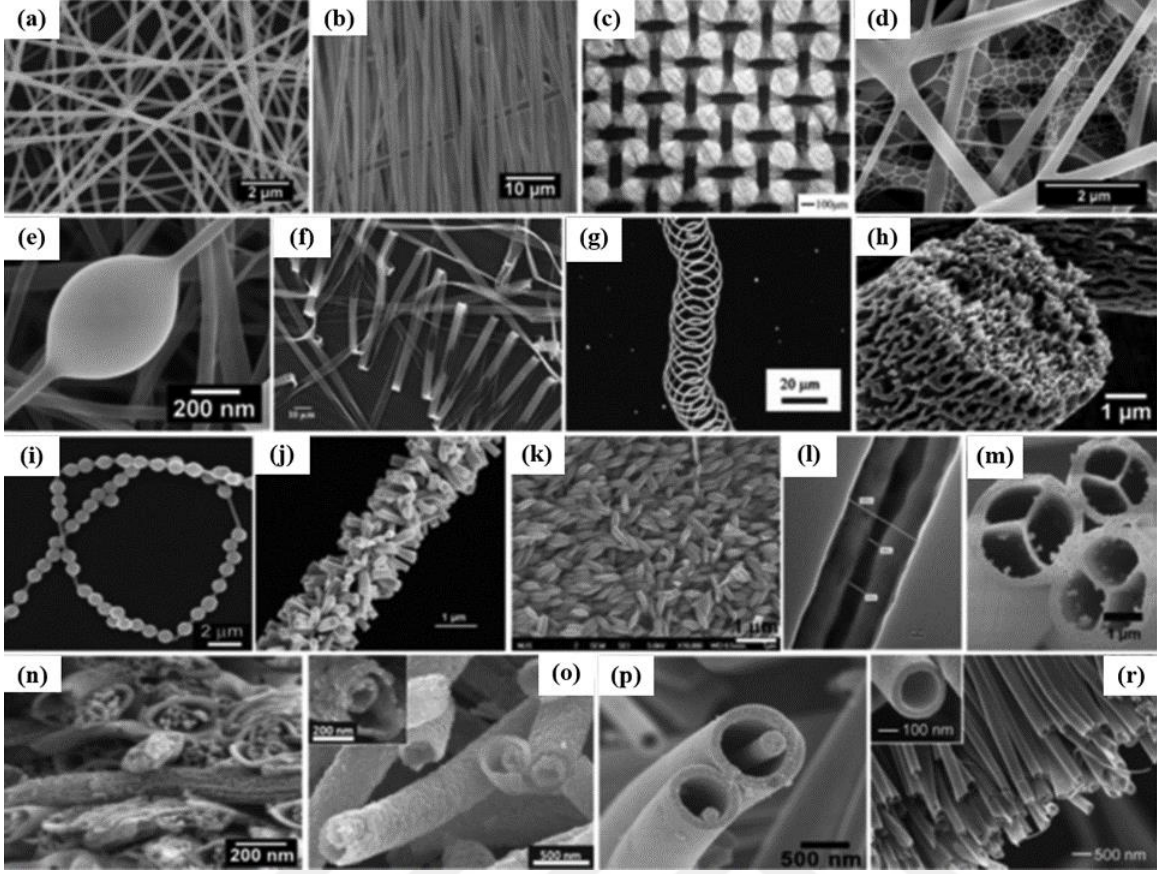
Yüzey topografisine karşı oluşturulan en temel cevap morfolojik değişimler ve hücre hizalanmasıdır. Hizalanma, hücre yüzey ile karşılaştıktan çok kısa bir süre sonra gerçekleşir. Genellikle hizalanma yüzeydeki desenin doğrultusunda, polarizasyon ve uzama ile gerçekleşir. Hücre hizalanması da hücre tipine göre farklılık göstermektedir. Fibroblastlar, endotel hücreler ve düz kas hücreleri nano ölçekteki oluklar ve çıkıntılar yönünde hizalanırken tavşanlara ait hipokampal nöronlarda böyle bir hizalanma görülmemiştir [1,39–41]. Keratinositlerin nanotopografik yüzeylerde endotel hücrelerine göre çok daha güçlü bir şekilde hizalandıkları belirlenmiştir [1]. Nanotopografiye karşı oluşturulan bir diğer cevap ise tutunma ve proliferasyondur. Bu noktada da hücre tipi ile oluşan cevap arasında güçlü bir bağ vardır. Nanoyapıların, düz kas hücrelerinde, endotellerde ve osteoblastlarda, kalın stres fiberi ve yoğun fokal adezyon oluşumu ile yüzeye tutunmayı ve proliferasyonu arttırdığı gösterilmiştir. Diğer yandan nano çukurların ve sütunların fibroblastlar ve makrofaj-benzeri hücrelerde tutunmayı azalttığı belirtilmiştir. Aynı zamanda topografinin gen ekspresyonunu ve sitokinler, büyüme faktörleri ve sinyal proteinleri gibi proteinlerin üretimini etkilediği bilinmektedir. Bu etki hücre iskeletinde meydana gelen değişikliklerin hücre içi sinyalizasyonu ve transkripsiyonu uyarması ile gerçekleşmektedir [42].

#### **2.1.4. Nanotopografinin Uygulama Alanları**

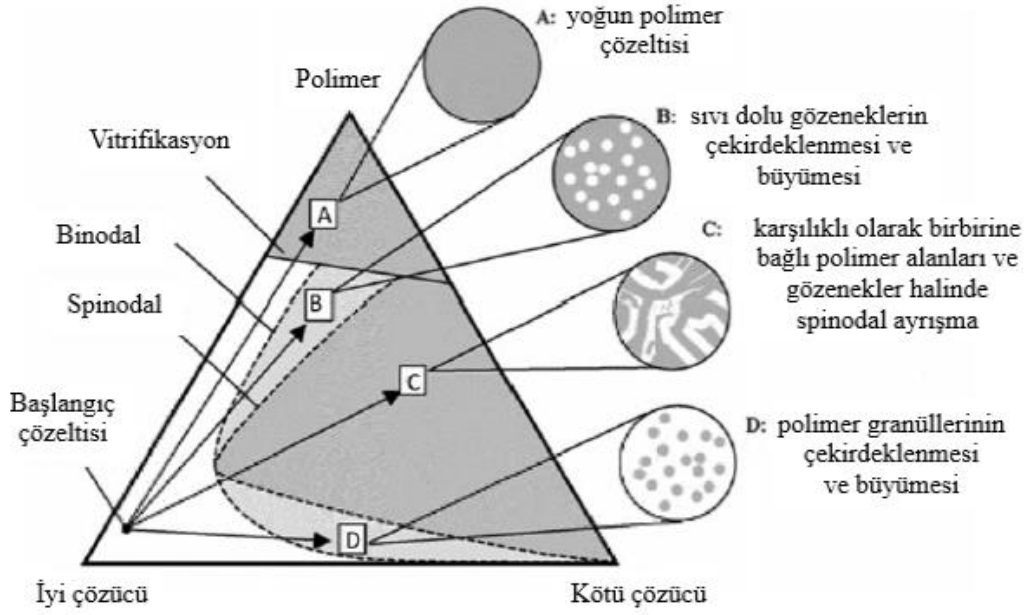
Nanoyapısal özelliklerdeki malzemeler elektronikten bilgisayar teknolojisine pek çok farklı alanda kendine yer bulmuştur. Rejeneratif tıp alanına bakıldığında ise özellikle biyosensörlerde ve doku mühendisliği uygulamalarında nano malzemeler kullanılmaktadır. Nanoyapılar aynı zamanda ilaçlarla ilgili çalışmalarda da tercih edilmektedir; kontrollü salım sistemlerinde nanopartiküller, fulleren gibi potansiyel ilaç görevi görecektir nanoyapılar, ilaç taramalarında kullanılan nanobiyosensörler ve nanobiyosensörler. Nanotopografik malzemeler ise özellikle mekanotransdüksiyonun ve hücre mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalarda kullanılmaktadır [1]. Biyomalzeme uygulamalarına bakıldığında özellikle doğal dokuya ait mikroçevrenin daha iyi taklit edilebilmesi açısından nanotopografiden yararlanılmaktadır. Oluşturulan nanoyapılar ile mekanik destek sağlayıp, besin-metabolit difüzyonuna yardımcı olunurken, hücre proliferasyonu, göçü, farklılaşması ve apoptoz kontrol edilmektedir [4].



ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.7). Bir çözücü içerisindeki polimer karışımında, çözücünün maksimum çözünürlüğü aşıldığı andan itibaren meydana gelen mekanizmalar “faz ayrımı” olarak adlandırılmaktadır. Çözelti sıcaklığı, genellikle faz ayrımı sürecinin kontrol edilmesi için kullanılmaktadır. Çözücünün buharlaşması sırasında, çözelti termodinamik olarak kararsız hale gelir ve faz ayrımı, polimerce zengin bir faz ve polimerce fakir bir faz (çözücü açısından zengin faz) olmak üzere iki kısma ayrılarak gerçekleşir. Daha sonra çözücünün buharlaşması, polimer açısından zengin fazın katılaşmasına izin verir ve matriks oluşurken polimer içermeyen faz, birbirine bağlı gözenekler içeren köpük benzeri yapıların ortaya çıkmasına yol açar. Bu durumda malzemenin yüzeyi yüksek derecede pürüzlülük içermektedir. Polimer ve çözücü seçimi, konsantrasyon ve sıcaklık gibi parametreler gözeneklerin şeklini, boyutunu, yoğunluğunu ve yüzey pürüzlülüğünü etkilemektedir [36,45]. Nanotopografik fiberlerin elde edilmesinde etkin olan faz ayrımı mekanizmaları; Isıl Olarak İndüklenen Faz Ayrımı (TIPS), Buharla İndüklenen Faz Ayrımı (VIPS), Solventle İndüklenen Faz Ayrımı (NIPS) ve Hızlı Faz Ayrımı olarak sıralanabilir [23,46]. Aşağıdaki bölümlerde bu mekanizmalar ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.



**Şekil 2.6.** Elektroçirime ile üretilen farklı yapılarına sahip nanofiberler: (a) rastgele (b) hizalı, (c) desenli, (d) örümcek ağı şeklinde, (e) boncuklu, (f) şerit şeklinde (g) sarmal, (h) gözenekli, (i) kolye benzeri, (j) havai fişek şeklinde, (k) pirinç tanesi şeklinde, (l) çekirdek-kabuk şeklinde, (m) çok kanallı boru şeklinde, (n) çok çekirdekli kablo benzeri, (o) tüp içinde tüp şeklinde, (p) mikrotüp içinde nanotel şeklinde ve (r) içi boş nanofiberler [47].



Şekil 2.7. İyi-kötü çözücü varlığında polimer çözeltilisinde meydana gelen faz ayrılması [19].

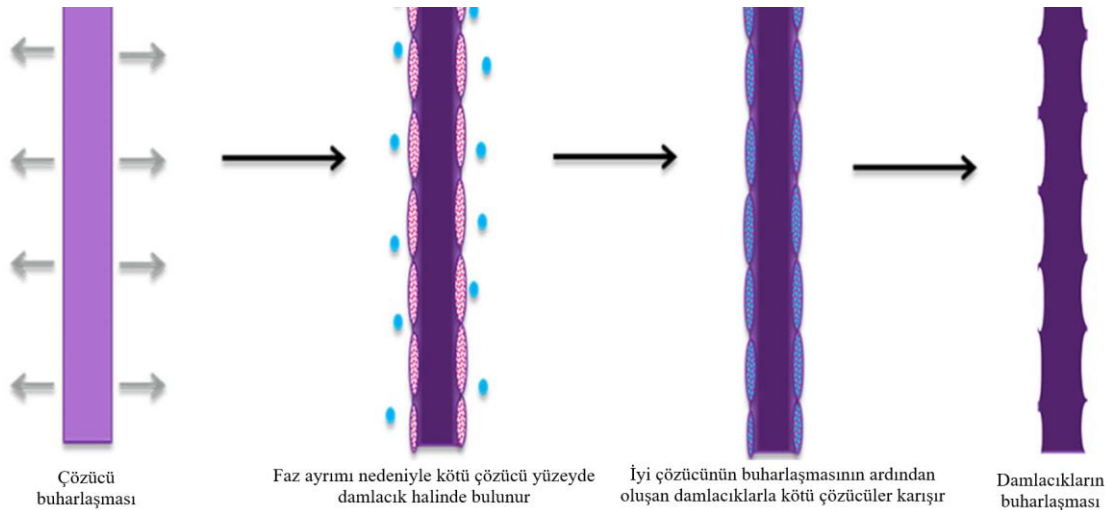
### 2.2.1.1. Isıl Olarak İndüklenen Faz Ayrımı (TIPS)

Bu mekanizmada, temelde ani bir sıcaklık düşüşü faz ayrımına yol açmaktadır. Fiber üretiminde gerçekleşen TIPS mekanizmasında itici güç fiberler ile toplayıcı arasında meydana gelen büyük bir sıcaklık farkıdır. Bu noktada polimer çözeltisi yarı kararlı bölgeye girmek için faz diyagramının binodal eğrisinden geçer. Amorf polimerlerin sıvı/sıvı faz ayrımı ve ardından polimerin jelleşmesi yoluyla mikro gözenekli yapılar oluşur [48].

Isıl olarak indüklenen faz ayrımında sıcaklık farkı, ısı transferi ile gerçekleştiğinden bu yöntem daha fazla esneklik, düşük kusur oluşumu, iyi mekanik özellikler, kontrol kolaylığı ve yüksek gözeneklilik gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Bu yöntemle, gözenek boyutunun kontrolü sağlanabilmekte ve daha da önemlisi hem izotropik hem de anizotropik yapılar oluşturulabilmektedir [49,50].

### 2.2.1.2. Kötü Çözücü ile İndüklenen Faz Ayrımı (NIPS)

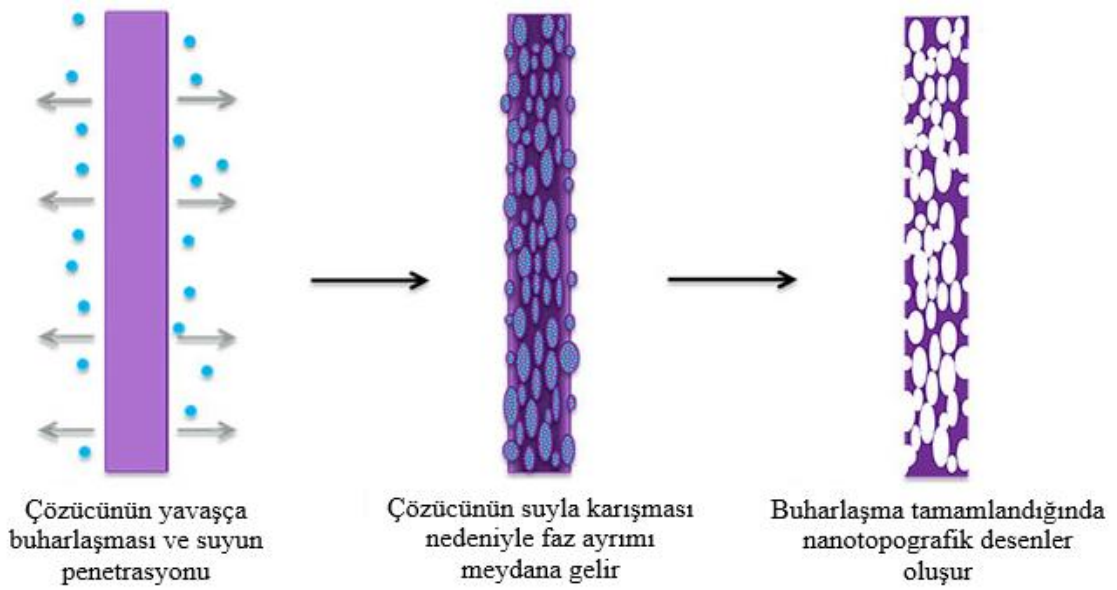
Yapılan çalışmalarda polimer/iyi çözücü karışımına kötü çözücü eklenerek gözenekliliğin indüklenebileceği gösterilmiştir. Bu mekanizma kötü çözücünden dolayı gerçekleşen faz ayrımı (NIPS) olarak bilinir (Şekil 2.8) [51]. İyi çözücü/kötü çözücü kombinasyonunun seçimi önemlidir. Faz ayrımı oluşturmak için, iyi çözücü ile kötü çözücü arasında uçuculukta bir fark olmalıdır. İyi çözücü için daha yüksek uçuculuk ve kötü çözücü için daha düşük uçuculuk gerekmektedir [19]. Elektroğirme sırasında gerçekleşen NIPS mekanizmasında polimer bakımından fakir fazın buharlaşması gözenek oluşumundan sorumludur [52]. Bu yöntem çok yönlü oluşu açısından bir avantaj sağlasa da polimerin ve 2 çözücünün kullanılması viskoelastik özellikler açısından çözücünün eğrilebilmesini zamanla değiştirmekte ve bu da kararlı yapıların elde edilmesini olumsuz olarak etkilemektedir [51,52]. Bu sistemde geleneksel elektroğirme parametrelerine ek olarak seçilecek kötü çözücünün özellikleri, iyi/kötü çözücü oranı gibi parametrelerin de dikkate alınması gerekir. Ancak bu parametreler iyi bir şekilde optimize edilirse NIPS mekanizması ile yüksek ve homojen gözenekliliğe sahip, yüzeyde ve çekirdekte birbirine bağlı açık gözenekler içeren fiberler elde etmek mümkündür [51,53]. Gözenekli nanofiberler, doku mühendisliği [51,54], yağ filtrasyonu [55], yağ emilimi ve yağ/su ayırma [19,51,56], süperhidrofobik kaplama [51,57], özel giysilerin üretimi (spor giyim) [51,58] ve lityum iyon pillerde [51,59] kullanılmaktadır.



**Şekil 2.8.** Yüzeyde nanotopografik desenlerin oluşmasına neden olan NIPS mekanizmasının şematik görüntüsü [19].

### 2.2.1.3. Buhar ile İndüklenen Faz Ayrımı (VIPS)

Buharla indüklenen faz ayrımı (VIPS) (Şekil 2.9) ve nefes şekilleri (BF) (Şekil 2.10), nanotopografik fiber üretiminde kullanılan diğer mekanizmalardır [25,60]. Bu mekanizmalarda su buharı ile faz ayrımı gerçekleşmektedir. Buharla indüklenen faz ayrımı mekanizmasında kullanılan polimer, PCL ( $\epsilon$ -polikaprolakton), PS (polistiren) veya PLA (poli-laktik asit) gibi, hidrofobik bir polimer ise, su buharı polimer için çözücü olmayan bir madde olarak hareket eder [19]. Bu mekanizmada yüksek uçuculuktaki çözücü, fiberlerin yüzeyinden hızla buharlaşır ve nemli ortamdaki su buharı soğuk fiberlerin yüzeyinde yoğunlaşır. Çözücü olmayan suyun çözeltiye nüfuz etmesi, homojen polimer/çözücü karışımının faz ayrımını indükler. Sonuç olarak, çözücünün buharlaşması ile gözenekler oluşur ve polimerce fakir bölgeler (gözenekler) polimerce zengin bölgeler etrafında dağılır [60,61].

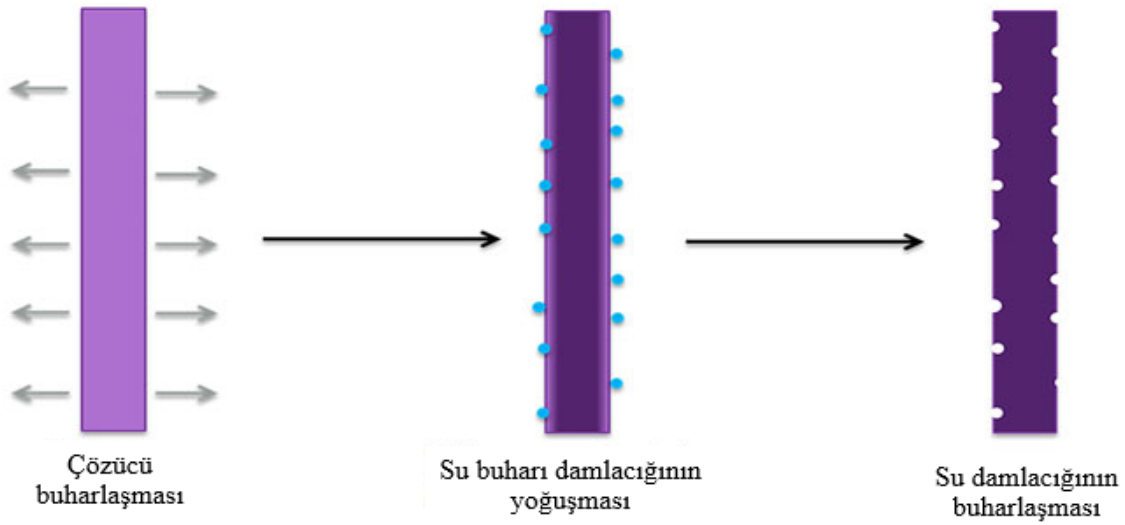


Şekil 2.9. Yüzeyde nanotopografik desenlerin oluşmasına neden olan VIPS mekanizmasının şematik görüntüsü [19].

### 2.2.1.4. Nefes Şekilleri ile İndüklenen Faz Ayrımı (BF)

Nefes şekilleri, nemli ortamda oldukça uçucu çözücüler varlığında gözenekli fiber elde edilmesinin nedenini açıklayan başka bir mekanizmadır. Çözücü, polimer/çözücü çözeltisinden buharlaştığında, fiberlerin yüzeyleri soğuma eğilimi gösterir ve yüzeyde su buharı yoğunlaşır. Fiberler kurudukça, su damlacıkları fiberlerin yüzeyinde 3 boyutlu

gözenek izleri bırakır [25,62]. Elektroğirme sırasında BF mekanizması yoluyla gözenekliliğin meydana gelmesi için iki gereklilik vardır: yüksek bağıl nem ve önemli bir sıcaklık düşüşü. Bu önemli sıcaklık düşüşünü indüklemek için DCM, CF ve THF gibi uçucu çözücüler kullanılmaktadır [19,61]. Başka bir çalışmadaki elektroğirme işlemi sırasında sıcaklık sabit tutulsa da fiber, şırınga ile toplayıcı arasındaki mesafeyi geçerken yüzeyde nem yoğuşmasına ve nefes şekillerinin oluşmasına yol açabilmektedir. Gerçekleşen nem yoğuşması, sadece fiber yüzeyinin sıcaklığını etkiliyorsa, gözenekler sadece yüzeyde oluşmaktadır [48].



**Şekil 2.10.** Nefes şekilleri mekanizması ile gözenek oluşumunun şematik görüntüsü [19].

Elektroğirme kullanarak nano gözenekli fiberlerin üretildiği birçok çalışma mevcuttur. Fibroblastlar, keratinositler, osteoblastlar ve düz kas hücreleri kullanılarak, PS, PLA, PLGA, PGA ve PCL polimerlerinin elektroğirme ile edilen, doğal ECM'yi taklit eden ve gözenekli olmak üzere çeşitli nanotopografik desenlere sahip fiber yapıdaki doku iskeleleri araştırılmış, tutunma ve çoğalma davranışlarını desteklediği gösterilmiştir [11,39,63–68]. Casper ve ark. nemli bir ortamda nanogözenekli polistiren fiberler üretmişlerdir. Ortamda bulunan, %30'dan fazla bağıl nemin (RH), hem faz ayrımı hem de nefes şekli mekanizmaları aracılığıyla fiberlerin yüzeyinde gözeneklerin oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, RH miktarının artmasıyla fiberlerin yüzeyindeki gözenek boyutu dağılımının, gözenek çapının ve gözenek sayısının arttığını göstermişlerdir [60]. Fatemeh ve ark. yaptıkları çalışmada, RH miktarının %60'a kadar

artırılmasının, faz ayrımı ve nefes şekilleri mekanizmasını uyararak, gözenekli morfolojiye sahip fiberlerin elde edilmesini sağladığını belirtmiştir [25].

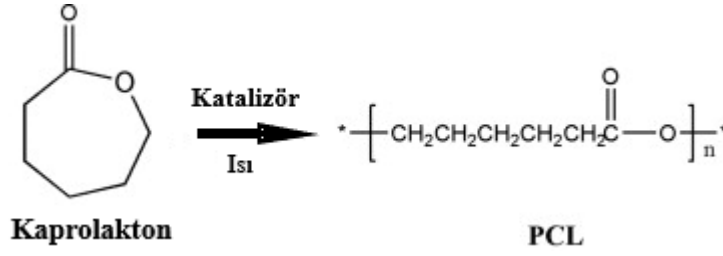
### 2.3. PCL'nin Yapısı ve Fiziksel Özellikleri

Polimerik biyomalzemeler birçok farklı parametreye (sentez şekli, molekül ağırlığı, zincir yapısı, ısıl davranışı vs.) göre sınıflandırılmaktadır. Sentez şekillerine göre polimerler, doğal, yarı sentetik ve sentetik olmak üzere üç ana başlıkta incelenmektedir. Selüloz, hyalüronik asit, kolajen, kitin-kitosan, aljinat, fibrin ve albumin doğal polimerlere örnek olarak verilebilir. Yarı sentetik polimerler ise doğal polimerlerin modifikasyonu ile elde edilmektedir. Selülozun modifikasyonu ile elde edilen selüloz asetat bu gruba örnek olarak verilebilir.

**Çizelge 2.2.** Biyomalzeme özellikleri [69].

İdeal Biyomalzeme Özellikleri	Tanımları
Biyouyumluluk	Karsinojenik, pirojenik, toksik olmayan ve alerjik yanıt oluşturmeyen
Sterillenebilirlik	Otoklav, kuru ısı, etanol, radyasyon gibi yöntemlere dayanıklı
Fiziksel Özellik	Mekanik dayanım, elastisite
İşlenebilirlik	Eritme, ekstrüzyon veya fiber üretimi gibi tekniklerde kullanılabilmesi

Poliglikolik asit (PGA), polilaktik asit (PLA) ve PCL gibi sentetik polimerler ve polilaktik asit-ko-glikolik asit (PLGA) gibi kopolimerler doku mühendisliği alanında yaygın olarak kullanılan polimerlerdir [69]. Biyomalzeme seçiminde pek çok parametre göz önünde bulundurulmaktadır (Çizelge 2.2). Bu noktada PCL toksik ve immünolojik reaksiyon oluşturmaması, mekanik dayanımının iyi olması, kontrol edilebilir hızda bozunması ve büyük ölçekte üretiminin mümkün oluşu [70] gibi avantajlarından dolayı doku mühendisliği alanında biyomalzeme olarak sıklıkla kullanılmaktadır.



**Şekil 2.11.** PCL'nin sentezi ve zincir yapısı [12].

Poli(ε-kaprolakton) (PCL), çok çeşitli biyomedikal uygulamalar için önerilen biyouyumlu, hidrofobik (çok sayıda metil grubu içerir), yarı kristalin yapıda, erime noktası ( $T_m$ ) yaklaşık  $60^\circ\text{C}$  ve camsı geçiş sıcaklığı ( $T_g$ ) yaklaşık  $-60^\circ\text{C}$  olan biyolojik olarak parçalanabilen bir polimerdir (Çizelge 2.3) [13]. Polimerin sentezi ve zincir yapısı Şekil 2.11'de verilmiştir. Molekül ağırlığı 3,000 g/mol ile 100,000 g/mol arasında değişmektedir. Molekül ağırlığı ile kristal yapısı arasında ters orantılı bir ilişki vardır; PCL % 40 kristal haldeyken molekül ağırlığı 100,000 g/mol iken, kristal yapı % 80'e yükseldiğinde molekül ağırlığı 5,000 g/mol'e düşmektedir [14,71]. PCL, kendiliğinden eriyen sütürler, ilaç salım sistemleri [13,15] ve doku mühendisliği için doku iskelesi [13,72] üretimi dahil olmak üzere pek çok alanda kullanılmaktadır. Diğer polimerlere göre ucuz oluşu, düşük hidrolitik bozunma oranı, oda sıcaklığındaki esnekliği, daha yüksek kristallinite gibi özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir [13,73]. Ayrıca elektroegirme işleminde avantaj sağlayan üstün viskoelastik ve reolojik özelliklere sahiptir [74,75].

**Çizelge 2.3.** PCL'nin fiziksel özellikleri [14].

Yoğunluk ( $60^\circ\text{C}$ )	1.1 g/cm <sup>3</sup>
Viskozite ( $100^\circ\text{C}$ )	1,500,000 mPa.s
Erime Noktası	$59^\circ\text{C}$ - $64^\circ\text{C}$
Parlama Noktası	$275^\circ\text{C}$
Bozunma Sıcaklığı	$200^\circ\text{C}$

### 2.3.1. PCL Nanofiberlerin Doku Mühendisliği Uygulamaları

Doku mühendisliği uygulamalarında, PCL nanofiberleri tek başına veya doğal polimerlerle birlikte sinir, deri ve kornea gibi çok çeşitli dokuların rejenerasyonunda doku

iskelesi olarak kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada kardiyak doku mühendisliği için hizalanmış PCL nanofiberler ile biyomimetik doku iskeleleri oluşturmuştur [4,76]. Cho ve ark. sıçan MSC'lerini elektroegirilmiş PCL-PEG nanofiberler üzerinde kültüre etmiş ve fiberlerin nöral farklılaşmayı desteklediğini belirtmiştir [4,77]. Ma ve ark. hizalanmış PCL/jelatin nanofiberler üzerinde insan koroner arter hücrelerini kültüre etmiş ve hücrelerin fenotiplerini koruduklarını, PECAM-1, ICAM-1 ve VCAM-1 gibi endotelial hücrelere ait belirteçleri eksprese etmeye devam ettiklerini göstermiştir [4,78]. Venugopal ve ark. PCL, kolajen ve PCL-kollajen fiber matrisler üzerinde insan dermal fibroblastların kültürünü gerçekleştirmiş ve yapıya kollajen katılmasının hücre proliferasyonunu desteklediğini belirtmişlerdir [4,79].



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez çalışması kapsamında kullanılan malzemelere, nanotopografik özelliklere sahip fiber matris üretiminde uygulanan yöntemlere, fiberlerin karakterizasyon çalışmalarına ve son olarak hücre kültür çalışmalarına yer verilmiştir. İlk aşamada elektroğirme sistemi ve çeşitli çözücü sistemleri kullanılmış ve faz ayrımı mekanizmaları ile farklı yüzey topografilerine sahip PCL fiberler üretilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında üretilen fiber matrislerin morfolojik, fiziksel ve kimyasal özellikleri değerlendirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları için 5 farklı yüzey morfolojisine sahip fiber matris seçilmiş ve bu malzemeler üzerinde hem insan dermal fibroblastlarının (BJ) hem de insan keratinositlerinin (HS2) kültürü gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin yüzey topografisine verdikleri cevaplar hücre tutunması, proliferasyonu ve morfolojisi açısından değerlendirilmiştir.

#### 3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Biyolojik Malzemeler

Sunulan tez çalışması kapsamında  $\epsilon$ -polikaprolakton (PCL) reçineleri ( $M_n = 80,000$  Dalton), Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir. Elektroğirme yöntemi için kullanılan çözücüler; kloroform (CF) (%99, ACS reaktif derecesi), dimetilsülfoksit (DMSO) (%99.9) ve DMF (N, N-dimetilformamid) (%99.5) Merck (Almanya) firmasından ve 1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol (HFIP), aseton (ACT) (%99.5), diklorometan (DCM) (%99.8, amilen ile stabilize edilmiştir) ve tetrahidrofuran (THF) (%99, bütillenmiş hidroksitoluen ile stabilize edilmiştir) ise Sigma-Aldrich (ABD) firmasından satın alınmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan BJ ve HS2 hücre hatları sırasıyla Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Mehtap Eren Kılıç'ın laboratuvarı ve Ege Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. İsmet Deliloğlu Gürhan'ın Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarından temin edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan Dulbecco's Modified Eagle Medium-yüksek glikoz (DMEM-High glucose), penisilin-streptomisin, Dulbecco fosfat tampon çözeltisi (DPBS) ve fetal sığır serumu (FBS) Capricorn Scientific (Almanya) firmasından ve Tripsin/EDTA (%0.01 Tripsin/10 mM EDTA) çözeltisi ve izopropanol Sigma-Aldrich (ABD) firmasından satın alınmıştır. Hücre canlılığının

belirlenmesinde kullanılan thizolyl blue tetrazolium bromide-(MTT) tuzu AppliChem (İspanya) firmasından satın alınmıştır. Hücrelerin fiksasyonu için gereken glutaraldehit (GA) ve hekzametildisilazan (HMDS) Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir. Fiber örnekler üzerindeki hücrelerin floresan boyamaları için kullanılan sığır serum albümini (BSA) Sigma-Aldrich (ABD), Tripton X-100 Merck (Almanya) firmasından, Alexa fluor 488 phalloidin Life Technologies (ABD) firmasından ve 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir.

### 3.2. PCL Fiber Matrikslerin Üretimi

PCL fiber matriksler elektroğirme yöntemiyle üretilmiştir. Çizelge 3. 1'de elektroğirme işleminde kullanılan çözücülerin özellikleri belirtilmiştir. Çözücü sistemleri 9:1 (v/v) ve 8:2 (v/v) hacim oranlarında hazırlanmıştır. PCL polimeri sırasıyla HFIP, CF/DMF:9/1, DCM/DMSO:9/1, CF/DMSO:8/2, THF/DMSO:9/1 ve ACT/DMSO:8/2 çözücü sistemlerine eklenmiş ve gece boyunca, oda sıcaklığında, manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak %11 (w/v) konsantrasyonunda PCL çözeltisi elde edilmiştir. Çözeltiler daha sonra iğne çapı 0.8 mm olan 5 mL'lik şırıngalara aktararak eğirme işlemine tabi tutulmuştur.

**Çizelge 3.1.** Çözücülerin fiziksel ve kimyasal özellikleri.

ÇÖZÜCÜ*	Çözünürlük Parametreleri (MPa) <sup>1/2</sup>	Kaynama Noktası (°C)	Dielektrik Sabiti	PCL Çözünürlüğü **	Su ile karışabilirlik
HFIP	17.9	58.2	16.7	İYİ ÇÖZÜCÜ	+
CF	18.7	61.6	4.8	İYİ ÇÖZÜCÜ	-
THF	18.5	66.0	7.6	İYİ ÇÖZÜCÜ	+
ACT	19.7	56.1	21.0	İYİ ÇÖZÜCÜ	+
DCM	20.2	40.0	9.1	İYİ ÇÖZÜCÜ	-
DMF	24.7	153.0	38.3	KÖTÜ ÇÖZÜCÜ	+
DMSO	26.4	189.0	46.6	KÖTÜ ÇÖZÜCÜ	+

\* HFIP: 1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol CF: Kloroform DMF: N,N Dimetilformamid DCM: Diklorometan DMSO: Dimetil sülfoksit THF: Tetrahydrofuran ACT: Aseton \*\* PCL'nin çözünürlük parametresi: 18.60 (MPa)<sup>1/2</sup>

Elektroeğirme işlemi için kapalı sistem elektroegirme cihazı (NSE-300, Inovenso Ltd., Türkiye) kullanılmıştır. PCL fiber matriksler metal toplayıcıya sabitlenmiş alüminyum folyo üzerine toplanmıştır. Rastgele düzende üretilen fiber matriksler metal ve düz bir toplayıcı üzerinde toplanırken, hizalı düzende üretilen fiber matriksler 2,000 rpm'de dönen bir tambur toplayıcı üzerinde toplanmıştır. ACT/DMSO çözücü sistemi (40°C) dışındaki tüm grupların elektroegirme işlemi, oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirilmiştir ve toplayıcı ile şırınga arasındaki mesafe de tüm gruplar için 23 cm olarak ayarlanmıştır. Elektroegirme işlemi sırasında üretim koşullarının optimizasyonu için 10 kV-20 kV arası voltaj değerleri ve 1 mL/saat-6 mL/saat arası akış hızı değerleri denenmiştir. Kararlı bir jet ile boncuksuz fiber morfolojilerinin elde edildiği optimum üretim koşulları belirlenmiştir. Üretilen fiber matrikslerin elektroegirme koşulları Çizelge 3.2'de belirtilmiştir. Akış hızlarına göre toplanma süreleri 2-5 saat arasında değişmektedir.

**Çizelge 3.2.** Rastgele ve hizalı düzende üretilen PCL fiber matrikslerinin elektroegirme koşulları ve kullanılan mekanizmalar.

Fiberler	Çözücü Sistemlerine göre İsimlendirme	Elektroegirme Koşulları	Mekanizma**
Rastgele Fiberler	HFIP-R	12 kV, 1 mL/saat	—
	CF/DMF-R	12 kV, 3.5 mL/saat	NIPS
	DCM/DMSO-R	12 kV, 4 mL/saat	NIPS
	CF/DMSO-R	14 kV, 4 mL/saat, %65 RH*	NIPS, VIPS
	THF/DMSO-R	15 kV, 4 mL/saat, %80 RH*	NIPS, VIPS
	ACT/DMSO-R	14 kV, 4 mL/saat, %70 RH*	BF
Hızlı Fiberler	HFIP-A	12 kV, 1 mL/saat, 2000 rpm	—
	CF/DMF-A	12 kV, 3.5 mL/saat, 2000 rpm	TIPS
	DCM/DMSO-A	12 kV, 4 mL/saat, 2000 rpm	TIPS
	CF/DMSO-A	12 kV, 3 mL/saat, 2000 rpm	TIPS
	THF/DMSO-A	12 kV, 6 mL/saat, 2000 rpm	TIPS
	ACT/DMSO-A	15 kV, 3 mL/saat, 2000 rpm, 40°C	TIPS

**NOT:** % 11(w/v) PCL, 25°C ve 23 cm koşulları tüm fiberler için aynıdır.

\* RH: Bağıl nem, R: Rastgele(random); A: Hizalı(aligned) \*\* NIPS: Kötü çözücü ile indüklenen faz ayrımı mekanizması VIPS: Buhar ile indüklenen faz ayrımı mekanizması BF: Nefes şekilleri TIPS: Isıl olarak indüklenen faz ayrımı mekanizması

### **3.2.1. Nanotopografik PCL Fiber Matrislerin Karakterizasyonu**

#### **3.2.1.1. SEM Analizi**

PCL fiber matrislerin yüzeyi SEM (Zeiss Evo 50, Almanya) ile analiz edilmiştir. Bu amaçla analiz öncesi numunelerin yüzeyi 6 nm altın-paladyum ile kaplanmıştır. Elde edilen SEM fotoğraflarındaki fiberlerin çapları, yüzeylerindeki gözeneklerin boyutu ve hizalı fiberlerin yüzde hizalanma derecesi ImageJ programı (Ulusal Sağlık Enstitüleri, ABD) ile hesaplanmıştır.

#### **3.2.1.2. FTIR Analizi**

PCL fiber matrislerin kimyasal yapılarını belirlemek için 500-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında ve 1  $\text{cm}^{-1}$  çözünürlükte FTIR (Thermo Scientific Nicolet 6700, ABD) spektroskopi analizi yapılmıştır.

#### **3.2.1.3. XRD Analizi**

PCL fiber matrislerin kristalinitesini belirlemek amacıyla XRD (Rigaku MultiFlex 2kW X-Ray Difraktometre Trim, İrlanda) analizi yapılmıştır. Analiz, 0°-80° tarama aralığında (2 $\theta$ ) CuK $\alpha$  radyasyon kaynağı kullanılarak yapılmıştır. XRD pikleri, OriginPro 8 SR0 yazılımı kullanılarak elde edilmiştir.

#### **3.2.1.4. TGA Analizi**

Üretilen fiber matrislerin ısı kararlılığını belirlemek amacıyla TGA (SII EXSTAR 6000, Woodland, CA, ABD) analizi yapılmıştır. Bu analizde numuneler azot gazı atmosfer ortamında 35°C'den 550°C'ye 10°C/dakika ısıtma hızıyla ısıtılmakta ve malzemenin ağırlık değişimi dikkate alınmaktadır.

#### **3.2.1.5. DSC Analizi**

PCL fiber matrislerin zamana karşı, sıcaklık değişimiyle birlikte fiziksel özelliklerinin değişimini tespit etmek amacıyla DSC (Perkin Elmer, ABD) analizi yapılmıştır. DSC

analizi, N<sub>2</sub> (g) atmosfer ortamında numuneler -70°C'den 150°C'ye, 10°C/dakika ısıtma hızıyla ısıtılarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.1.6. Gözeneklilik ve Pürüzlülük Analizi**

PCL fiber matrikslerin yüzey topografisi 3B Lazer Konfokal Mikroskop (Keyence VK-X 100 Laser Confocal Microscope System, Japonya) ile kamera tarafından kaydedilen optik görüntülere dayalı bir sistem ile analiz edilmiştir. Bu analiz ile PCL fiber matrikslerinin yüzey pürüzlülük değerleri elde edilmiştir.

### **3.3. Hücre Kültür Çalışmaları**

Hücre kültürü çalışmaları, BJ ve HS2 hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. BJ hücreleri, %10 (v/v) fetal sığır serumu (FBS) (Capricorn Scientific, Almanya) ve %1 (v/v) penisilin/streptomisin (P/S) içeren DMEM-HG (Capricorn Scientific, Almanya) ortamında; HS2 hücreleri ise %5 (v/v) FBS, %1 (v/v) P/S içeren (Sigma-Aldrich, ABD) DMEM-F12 (Capricorn Scientific, Almanya) ortamında çoğaltılmıştır. Malzeme üzerine hücre ekimine geçilmeden önce 1 cm x 1 cm x 0.0256 cm boyutunda kesilmiş olan fiber matriksler %70 etanol ile 30 dakika sterilize edilmiştir ve ardından 40 dakika UV ışığına maruz bırakılmıştır. Daha sonra hücre yoğunluğu  $5 \times 10^4$  hücre/nanofiber iskele olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Hücre kültür çalışması steril 24-gözlü polistiren kültür kaplarında gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamı her üç günde bir yenilenmiştir. Hücre kültürü çalışmaları için deney grupları şu şekilde adlandırılmıştır: 1) HFIP-R, 2) HFIP-A, 3) CF/DMF-R, 4) THF/DMSO-R ve 5) ACT/DMSO-R.

#### **3.3.1. Hücre Tutunma Çalışmaları**

Hücrelerin fiber matriksler üzerindeki tutunma etkinliğini belirlemek amacıyla hücre ekimi yapıldıktan 4 saat sonra hücreler tripsinizasyon ile yüzeyden kaldırılmış ve hemositometrik olarak sayılmıştır. Bu amaçla öncelikle fiber matriksler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve yüzeye tutunmayan hücreleri uzaklaştırmak için DPBS (pH 7.4) ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra her bir örnek üzerine 0.5 mL % 0.25 tripsin/1 mM EDTA koyularak 37°C'de 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Tripsinizasyon sonrası örnekler üzerine %10 FBS içeren 0.5 mL kültür ortamı eklenmiştir. Yüzeyden kaldırılan hücreler

tripan mavisi ile boyanmış ve optik mikroskop altında hematositometrik olarak sayılmıştır. Hücrelerin malzeme yüzeylerine tutunma yüzdesi Eşitlik 1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre Tutunması} = 100 \times \frac{\text{Tutunan hücre sayısı}}{\text{Hücre ekim yoğunluğu}} \quad (1)$$

### 3.3.2. Hücre Canlılığı

Hücrelerin nanofiberler üzerindeki canlılığı 10 gün boyunca MTT analizi ile takip edilmiştir. Seçilen zaman aralıklarında nanofiberler üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmıştır ve her bir numuneye 60 µL MTT çözeltisi (PBS içinde çözülmüş 2.5 mg/mL MTT) ile 600 µL önceden ısıtılmış kültür ortamı eklenmiştir. Daha sonra 37°C'de 3 saat inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyondan sonrası örnekler üzerindeki MTT içeren ortam uzaklaştırılmıştır ve formazan kristallerini çözmek için her kuyucuğa 400 µL isopropanol çözeltisi (0.04 M HCl içeren) eklenmiştir. Son olarak 200 µL isopropanol 96-gözlü kültür kaplarına koyulmuş ve mikropilaka okuyucu (ASYS Hitech UVM 340 Plate Reader, Avusturya) ile 690 nm referans alınarak 570 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

### 3.3.3. SEM Analizi

Kültürün 1. ve 4. günü nanofiberler üzerindeki hücrelerin morfolojilerini belirlemek amacıyla SEM analizi yapılmıştır. Bu amaçla belirlenen günlerde örnekler üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra DPBS (pH 7.4) ile iki kez yıkama işlemi yapılmıştır. Daha sonra %2.5 (v/v, PBS içerisinde) glutaraldehit ile oda sıcaklığında fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fiksasyondan sonra dehidrasyon işlemi için örnekler 2'şer dakika etanol serileri (%30, %50, %70, %90 ve %100 v/v) ve 5 dakika HMDS ile muamele edilmiş, ardından havada kurumaya bırakılmıştır. Örnekler tamamen kuruduktan sonra 10 nm altın-paladyum ile kaplanmış ve SEM analizine geçilmiştir.

### 3.3.4. Floresan Mikroskobu ile Görüntüleme

Fiber matriksler üzerindeki hücrelerin hücre iskeleti organizasyonunu belirlemek amacıyla 4. ve 7. günlerde F-aktin/çekirdek ikili boyamaları yapılarak floresan

mikroskobu (Olympus, ABD) ile inceleme yapılmıştır. Bu amaçla örnekler üzerindeki ortam uzaklaştırıldıktan sonra DPBS ile yıkama işlemi yapılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika boyunca %4 (v/v) paraformaldehit içerisinde fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler %0.1 (v/v) Triton X-100 içerisinde bekletilerek hücre membran geçirgenliği artırılmıştır. Son olarak örnekler, hücrelerdeki aktin filamentlerini boyamak için 20 dakika Alexa Fluor 488 phalloidin (ThermoFisher Scientific, USA) çözeltisinde ve hücre çekideğini boyamak için 5 dakika boyunca DAPI çözeltisinde bekletilmiş ve floresan mikroskop altında incelemeye geçilmiştir.

### **3.3.5. İstatistiksel Analiz**

Tez çalışması kapsamında ulaşılan veriler GraphPad Software yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Tüm analiz verileri üç paralel şekilde elde edilmiş ve değerler  $\pm$  standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir. Deney grupları arasındaki anlamlı farkların değerlendirilmesi için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Student t-test kullanılmıştır ve  $p$  değerinin 0.05'ten küçük olduğu veriler anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması iki temel aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşamada farklı nanotopografilere sahip PCL fiber matrikslerin elektroegirme ile üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle, çözücü özellikleri (dielektrik sabiti, iletkenlik, uçuculuk, iyi veya kötü çözücü olması, su ile karışma durumu), voltaj, akış hızı, toplayıcı mesafesi, polimer konsantrasyonu, sıcaklık ve nem gibi parametreler dikkate alınarak optimum üretim koşulları belirlenmiştir. Daha sonra üretilen fiber matrikslerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında ise BJ ve HS2 hücreleri kullanılarak, üretilen fiber matriksler ile hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında hücre tutunma yüzdeleri belirlenmiş, hücre proliferasyonu ve morfolojisi takip edilmiştir. Tezin bu bölümünde tez kapsamında yapılan deneysel çalışmaların ve analizlerin sonuçlarına yer verilmiş, tüm sonuçlar literatür bilgileri ışığında tartışılarak yorumlanmıştır.

### 4.1. PCL/Çözücü Seçimi ve Çözeltilerin Hazırlanması

PCL polimeri, yarı kristalin ve hidrofobik yapıda olan bir homopolimerdir. Ayrıca, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı, kolay şekil alabilir, biyolojik olarak parçalanabilir ve farklı formlarda üretilebilir olmasından ötürü, doku mühendisliği çalışmalarında oldukça sık tercih edilmektedir.

Birçok polimer gibi PCL polimeri de seçilen uygun çözücüler içerisinde çözünmektedir. Bir polimer için uygun olan çözücüler, polimerin ve çözücünün Hildebrand çözünürlük parametrelerinin incelenmesiyle belirlenmektedir. Çalışmada kullanılacak çözeltiler hazırlanırken çözücülerin ve PCL'nin Hildebrand çözünürlük parametrelerinin birbirlerine olan yakınlıkları dikkate alınmıştır. Bu bilgi ışığında THF, CF, HFIP, ACT ve DCM çözücülerini iyi çözücü olarak, diğer yandan çözünürlük parametreleri farklı olan DMF ve DMSO çözücülerini ise kötü çözücü olarak seçilmiştir.

Literatürde PCL polimerini eğirmek amacıyla pek çok farklı çözücü tek başına ya da ikili, üçlü bileşimleri şeklinde bir arada kullanılmıştır [74,80]. PCL oda sıcaklığında kloroform, diklorometan, karbon tetraklorür, benzen, toluen, sikloheksan ve 2-nitropropan gibi çözücülerde yüksek çözünürlüğe; aseton, 2-butanon, etil asetat,

dimetilformamid ve asetonitril gibi çözücülerde düşük çözünürlüğe sahipken; alkol, petrol eteri ve dietil eter gibi çözücülerde ise hiç çözünmemektedir [7]. Ayrıca yapılan çalışmalarda, diklorometan, hekzafloropropanol ve trifloroetanol gibi çözücü sistemleri de kullanılmıştır. İkili çözücü sistemlerinden DMF/THF, DCM/metanol, DMF/kloroform, DMF/DCM, metilen klorür/DMF, kloroform/metanol; üçlü çözücü sistemlerinden ise kloroform/DCM/DMF en çok kullanılan çözücü sistemleridir [81]. İkili çözücü sistemleri; iyi/iyi çözücü, iyi/kısmi çözücü ve iyi/kötü çözücü olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılmaktadır [27]. Çözücülerin iyi, kısmi ve kötü olarak nitelendirilmesi; PCL'nin bu çözücüler içerisinde çözünebilmesi (çözünürlük parametreleri) ve çözücülerin uçuculukları ile açıklanmaktadır. Çizelge 3.1'de belirtilen kaynama noktası değerlerinden hareketle çözücülerin uçuculukları şu şekilde sıralanabilmektedir: DCM >ACT >HFIP >CF >THF >DMF >DMSO. Buna göre en uçucu çözücü, diğer bir deyişle en hızlı buharlaşan çözücü DCM, en az uçucu olan çözücü ise DMSO'dur. Elektroğirme sisteminde fiber oluşumunu etkileyen tek faktör, polimerin çözücü içerisindeki çözünürlüğü değildir; çözücü dielektrik sabiti, çözelti dielektrik sabiti, kaynama noktası, su ile karışabilme durumu gibi polimere ve çözücülere ait olan karakteristik özellikler, bir polimer çözeltisinin ne ölçüde eğrilebilir olduğunu belirleyen temel faktörlerdir.

Bu bilgiler ışığında, farklı nanotopografilere sahip PCL fiberleri elde etmek amacıyla HFIP, CF/DMF:9/1, DCM/DMSO:9/1, CF/DMSO:8/2, THF/DMSO:9/1, ACT/DMSO:8/2 çözücü sistemleri kullanılmıştır. Çözücülerin hacimsel oranlarına literatürdeki araştırmalar sonucunda karar verilmiştir [82]. Polimer konsantrasyonu %11 (w/v) olarak belirlenmiş [16] ve 10 mL hacmindeki polimer çözeltileri çeker ocak içerisinde, oda sıcaklığında, 1 gece boyunca manyetik karıştırma yapılarak hazırlanmıştır. Çözeltiler hazırlanırken göz önünde bulundurulması gereken bir diğer parametre, manyetik karıştırıcının karıştırma hızıdır. Aynı zamanda hava değişimlerinden etkilenmemesi için manyetik karıştırma işlemi sıcaklık ayarı gerçekleştirilerek belli bir sıcaklıkta yapılmıştır. Çözücü uçuculuklarından dolayı karıştırma işlemi ışık geçirmeyen şişelerde, ağızları parafilm ile sıkıca kapatılarak gerçekleştirilmiştir.

Elektroğirme yöntemiyle elde edilen fiber matrikslerin yüzeylerinde, farklı çözücü kombinasyonları kullanılarak, nanotopografik desenler oluşturulabilir. Bu nanotopografik desenler, kötü çözücü varlığında NIPS (Çözücü ile İndüklenen Faz

Ayırma), yüksek sıcaklık farkının olduğu durumda TIPS (Isıl Olarak İndüklenen Faz Ayırma), yüksek bağıl nem varlığında ise VIPS (Buharla İndüklenen Faz Ayırma) ve BF (Nefes Şekilleri) mekanizmalarının gerçekleşmesiyle oluşmaktadır. İyi/kötü çözücü sistemlerinin kullanıldığı ve NIPS mekanizmasının gerçekleşmesinin öngörüldüğü çalışmalarda, kullanılan iyi çözücünün uçuculuğunun, kötü çözücünün uçuculuğundan daha yüksek olması gerekmektedir. Bu çalışmada kullanılan CF/DMF, CF/DMSO, DCM/DMSO ve THF/DMSO çözücü sistemlerinde, kötü çözücü karakterindeki DMF ve DMSO'nun etkisiyle NIPS mekanizması gerçekleşmiştir. Diğer yandan CF/DMSO ile THF/DMSO gruplarında sırasıyla %65 ve %80 bağıl nem ortamında çalışılarak NIPS mekanizmasıyla beraber VIPS mekanizmasının da oluşması sağlanmıştır. Ayrıca ACT/DMSO grubunda, %70 bağıl nem ile çalışılmış ve BF faz ayrımı gerçekleşmiştir. Hizalı düzende üretilen tüm fiber matriks gruplarında ise döner tamburun etkisiyle ortaya çıkan yüksek sıcaklık farkından ötürü TIPS mekanizmasının gerçekleştiği görülmektedir. Son olarak HFIP'nin çözücü olarak kullanıldığı gruplarda tek çözücü varlığından dolayı herhangi bir faz ayrımı gerçekleşmemiştir.

#### **4.2. PCL Fiber Matrikslerin Üretim Koşullarının Belirlenmesi**

Sunulan tez çalışması kapsamında farklı nanotopografik desenlere sahip PCL fiber matriksler, elektroğirme yöntemi kullanılarak üretilmiştir. Elektroğirme yönteminin avantajlarından biri, elde edilen fiberlerin boyutunun ayarlanabilmesi ve nano/mikrometre aralığında çaplara sahip fiberler elde edilebilmesidir. Bu noktada, elektroğirme ile elde edilen doku iskeleleri, hücre dışı matrikste (ECM) bulunan kollajen gibi proteinleri ve diğer biyolojik ajanları ölçek olarak oldukça iyi taklit edebildikleri için ön plana çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar biyomalzemelerin nanoboyutlarının ve yüzey özelliklerinin hem hücre tutunmasında hem de proliferasyonda önemli rol oynadığını göstermektedir [83]. Elektroğirme yöntemindeki en önemli basamak üretim koşullarının optimize edilmesidir. Üretimi etkileyen parametreler; uygulanan voltaj, akış hızı, şırınga iğnesinin ucu ile metal toplayıcı arasındaki mesafe, polimer çözeltisinin iletkenliği ve polimer derişimi olarak sıralanabilir. Üretim, kapalı bir sistemde gerçekleştiğinden içerideki sıcaklık ve nem değişimi de süreci etkileyen çevresel parametreler olarak tanımlanabilir. Yapılan çalışmada sıcaklık 25°C ve şırınga ile metal toplayıcı arasındaki mesafe 23 cm olarak belirlenmiştir. Fiber jetin ortaya çıkışı ile jetin kararlılık düzeyine ulaşması zaman alabilmektedir. Voltaj kaynağı açıldıktan sonra Taylor konisi görülünceye dek beklenmiştir ve jetteki kararlılık haline göre 12 kV -15 kV arasındaki

voltaj değerlerinde çalışılmıştır (Çizelge 3.2). Diğer yandan akış hızı da 1-6 mL/saat arasında değişmektedir (Çizelge 3.2). Fiberleri hizalı düzende üretebilmek için toplayıcı olarak, 2000 rpm dönme hızındaki tambur kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan rastgele düzende doku iskelelerinin kalınlıkları 183  $\mu\text{m}$ -450  $\mu\text{m}$  ve hizalı düzende doku iskelelerinin kalınlıkları ise 120  $\mu\text{m}$ -320  $\mu\text{m}$  aralığındadır.

### **4.3. PCL Fiber Matrislerin Karakterizasyon Sonuçları**

Elektroçirime yöntemiyle üretilmiş olan PCL fiber matrislerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla SEM, FTIR, XRD, DSC, TGA ve yüzey pürüzlülük analizleri yapılmıştır.

#### **4.3.1. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Analiz Sonuçları**

Üretilen fiber matrislerin yüzey morfolojileri SEM analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.1). Fiber matrislerin çapları, fiberlerin yüzeylerinde bulunan gözeneklerin çapları ve hizalı düzende fiber matrislerin hizalanma dereceleri, SEM analizinden elde edilen fotoğraflar kullanılarak ImageJ programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

Fiberlere ait fotoğraflar, fiberlerin yönlenmesine göre, rastgele/hizalı (R/A) şeklinde adlandırılarak sıralanmıştır. SEM fotoğrafına bakıldığında, iyi çözücü olan HFIP, çözüldükten homojen olarak buharlaştığı için faz ayrımının gerçekleşmediği görülmektedir. Buna bağlı olarak bu gruptaki hem rastgele hem de hizalı fiberlerin pürüzsüz bir yüzey morfolojisine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1-a ve b).

Hizalı fiberlerde TIPS mekanizmasının baskın olduğu görülmektedir. İyi çözücü/kötü çözücü olarak CF/DMF (Şekil 4.1-c) ve DCM/DMSO (Şekil 4.1-e) çözücü sistemlerinin kullanıldığı gruplarda ise faz ayrımının NIPS mekanizması ile sağlandığı düşünülmektedir [82]. SEM fotoğraflarından görüldüğü üzere bu gruptaki fiberlerin buruşuk bir yüzey topografisine sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan CF/DMF çözücü sistemi ile hizalı fiberler üretildiğinde, dönen tamburun etkisiyle yüzeydeki buruşuk morfolojinin hizalanarak oluklu (groove) morfolojiyi oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1-d). Oluklu morfolojinin oluşmasında dönme hareketinin yanında dönen tamburun yarattığı sıcaklık farkı da rol oynamaktadır [19]. Çözücü olarak

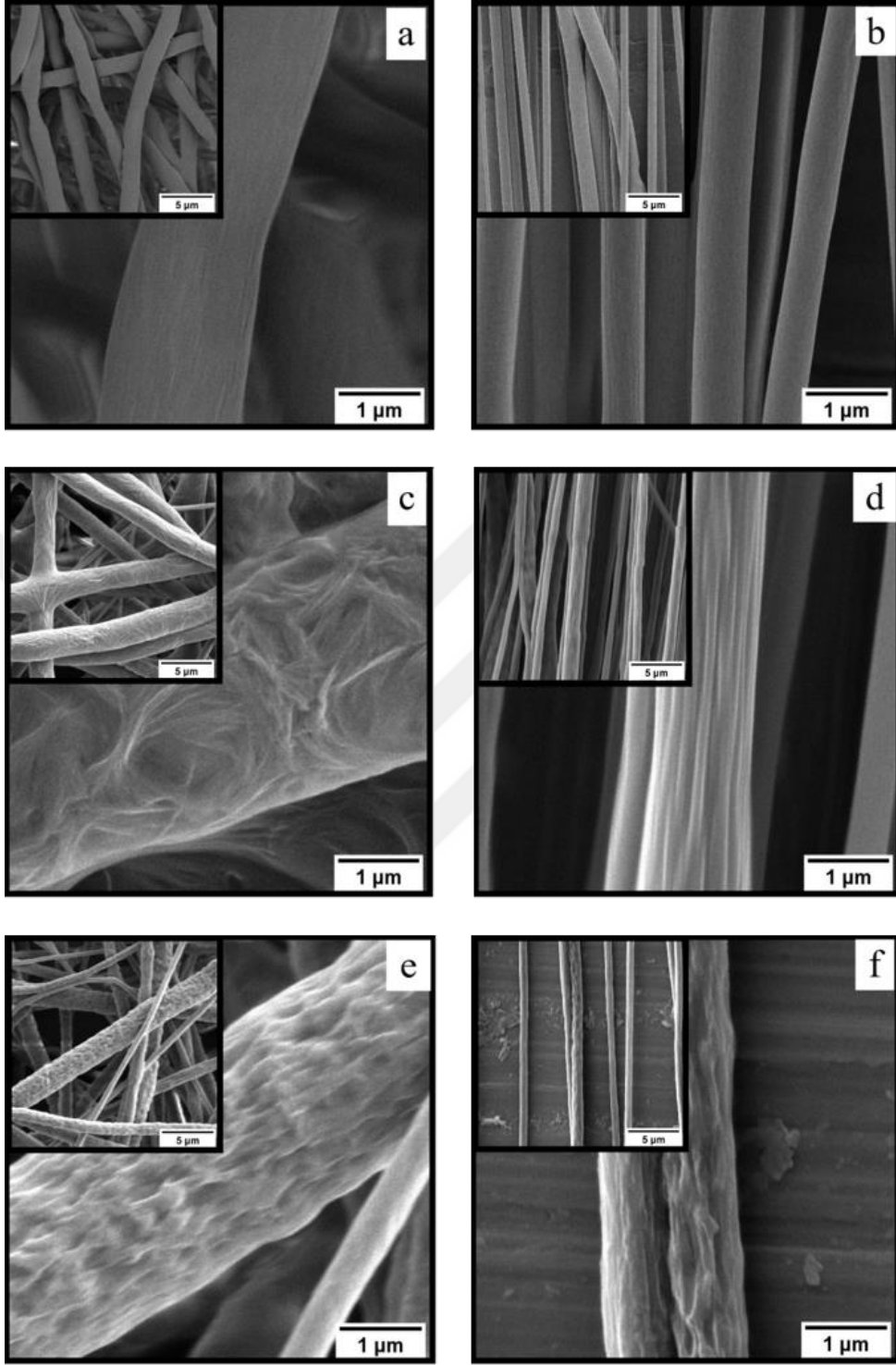
CF/DMSO (Şekil 4.1-g) ve THF/DMSO'nun (Şekil 4.1-i) kullanıldığı örneklerde eğirme işlemi iyi çözücü/kötü çözücü varlığı yanında, %65-80 RH (bağıl nem) etkisi ile gerçekleştirilmiştir. Dolayısı ile bu gruplarda NIPS ve VIPS olmak üzere iki faz ayrımı mekanizması gözlemlenmiş ve gözenekli bir yüzey topografisi elde edilmiştir [84]. SEM görüntüleri doğrultusunda Şekil 4.1-g'deki fiberlerin düşük gözenek yoğunluğuna sahip olduğu, diğer yandan Şekil 4.1-i'de fiberlerin homojen yapıda yüksek gözenekliliğe sahip olduğu görülmektedir. Bunun nedeni iki sistemde farklı çözücüler kullanılmasının yanında farklı nem oranlarında çalışılmasıdır. Düşük nem oranında (%65) çalışılan grupta daha düşük bir gözeneklilik varken, nem oranının yükselmesi (%80) gözenekliliği artırmıştır [16]. Gözenekli örneklerin hizalı gruplarında nem kullanılmamıştır. Nem olmaksızın, sadece çözücülerin ve yüksek hızda kullanılan döner tamburun kullanılması ile o gruplarda TIPS mekanizmasının gerçekleştiği ve buruşuk yüzey topografisinin olduğu söylenebilir (Şekil 4.1-h ve k). Son olarak, ACT/DMSO'nun çözücü olarak kullanıldığı grupta yüksek nem (%70) ile çalışılmıştır. Bu sistemde çözücünün uzaklaştırılması ile yüzeyde ani bir sıcaklık düşüşü gerçekleşmiştir. Aynı zamanda suyun yüzeyde yoğunlaşması ile yüzeyde nefes figürleri (BF) oluşmuş ve benekli topografide fiberler elde edilmiştir (Şekil 4.1-l ve m) [85].

Üretim parametrelerinin her birinin fiber morfolojisi yanında çapı üzerinde de farklı etkileri vardır (Çizelge 4.1). Üretimde kullanılan voltaj değerindeki artış, fiber çapında artışa neden olmuştur [83]. Rastgele düzende üretilen gruplar arasında, uygulanan en yüksek voltaj değeri, THF/DMSO-R (15 kV) ve sonrasında CF/DMSO-R (14 kV), ACT/DMSO-R (14 kV) gruplarındadır. Bu gruplarda fiber çapları sırasıyla  $2152 \pm 416$ ,  $2140 \pm 617$  ve  $2579 \pm 1128$  nm olarak bulunmuştur. Uygulanan voltajın 12 kV'a düştüğü HFIP-R, CF/DMF-R ve DCM/DMSO-R gruplarında ise fiber çapları yaklaşık 1.5 kat azalmıştır. Hizalı fiberlerde de benzer şekilde voltajın azalması ile fiber çapı bir miktar düşmüştür. Şırınga içerisindeki polimer çözeltisinin akış hızı da fiber çapı üzerinde etkilidir, genellikle akış hızı arttığında fiber çapının arttığı belirtilmiştir [83]. Rastgele düzende üretilen fiberlere bakıldığında en düşük akış hızının (1 mL/saat) kullanıldığı HFIP-R grubunda en düşük fiber çapının olduğu görülmektedir. Akış hızının 4 mL/saat değerine çıktığı CF/DMSO-R, THF/DMSO-R ve ACT/DMSO-R gruplarında ise fiber çapı artmıştır. Diğer yandan yine 4 mL/saat akış hızının kullanıldığı DCM/DMSO-R grubunda ise fiber çapı artmamıştır. Burada fiber çapı üzerinde voltaj ve akış hızı dışında çözücünün özellikleri gibi farklı parametrelerin etkisi de olmuş olabilir. Ayrıca Çizelge

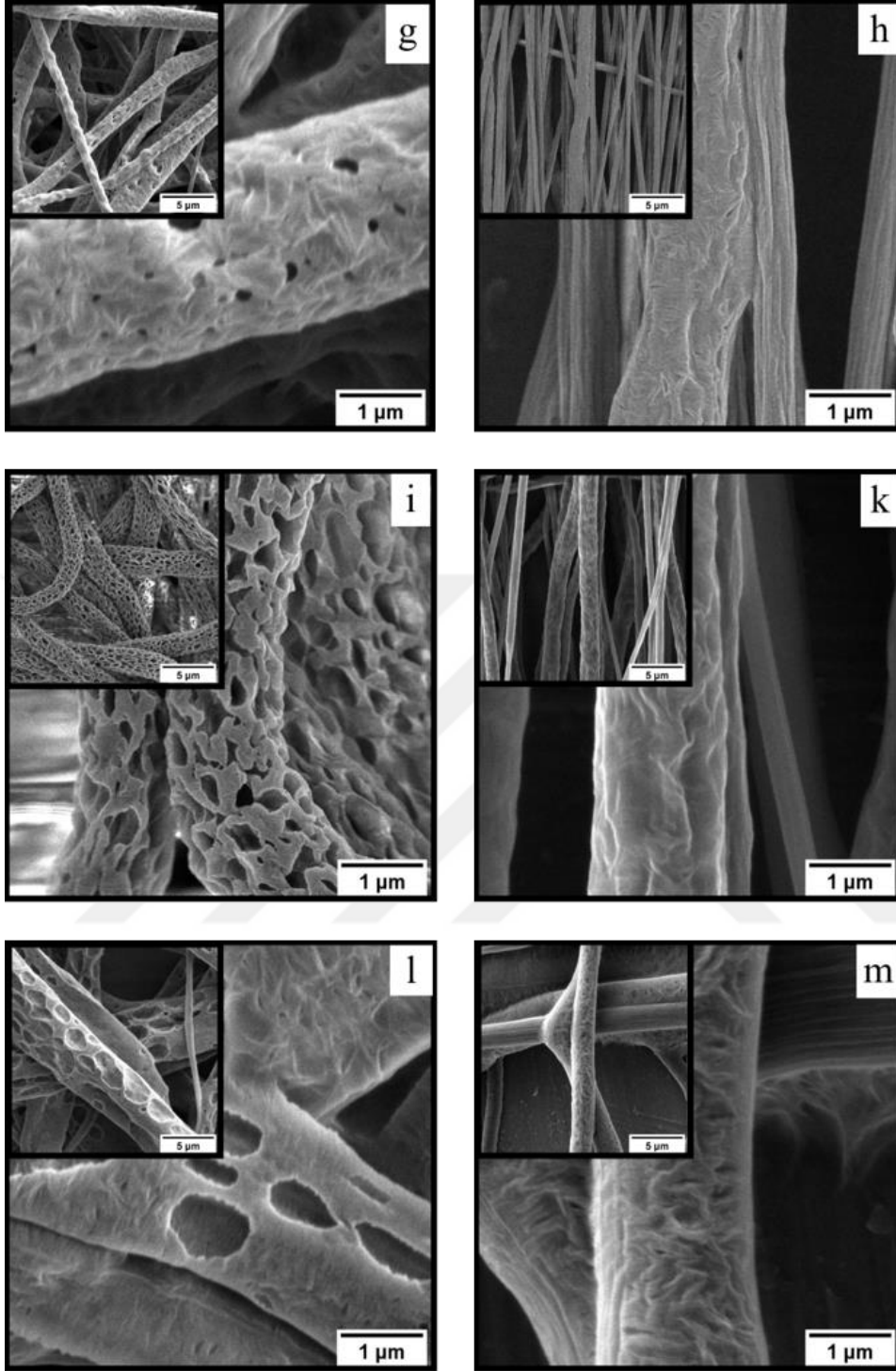
4.1'e bakıldığında fiberlerin hizalı düzende üretilmesi ile çaplarının azaldığı görülmektedir. Burada hızla dönen bir tamburun polimer çözeltisinden fiberleri çekmesi ile daha ince fiberler elde edilmiştir. Fiber matrikslerin yüzeylerinde bulunan gözenek çapları da ImageJ programı kullanılarak belirlenmiştir. Sırasıyla %65 ve %80 bağıl nemin kullanıldığı CF/DMSO-R ve THF/DMSO-R grubunda gözenek çapları  $479\pm 311$  ve  $334\pm 125$  nm olarak bulunmuştur. Diğer yandan, VIPS mekanizması yanında BF mekanizması ile de faz ayrımının gerçekleştiği ACT/DMSO-R grubunda ise fiber matriks yüzeylerinde krater benzeri (benekli) daha büyük yapılar oluşmuştur ve gözenek çapı  $857 \pm 362$  nm olarak hesaplanmıştır. Son olarak Çizelge 4.1'den örneklerin hizalanma derecelerine bakıldığında, hizalanmanın HFIP-A grubunda %85, CF/DMF-A grubunda %88, DCM/DMSO-A grubunda %83, CF/DMSO-A grubunda %77, ACT/DMSO-A grubunda %64 ve THF/DMSO-A grubunda ise %73 olduğu görülmektedir. Tüm gruplarda hizalanma dereceleri oldukça yüksek iken ACT/DMSO-R grubunda hizalanma derecesi nispeten düşmüştür. Bu grupta çalışma sıcaklığı  $40^{\circ}\text{C}$  olduğu için, çözücünün uçuculuğu etkilenmiş ve bu durum hizalanma derecesini kısıtlamış olabilir.

**Çizelge 4.1.** PCL fiber matrikslerin ImageJ ile hesaplanan fiber çapları, fiber yüzeyindeki gözenek çapları ve fiberlerin hizalanma dereceleri.

Gruplar	Fiber Çapı (nm)	Gözenek Çapı (nm)	Hizalanma Derecesi (%)
HFIP-R	$1484\pm 382$	—	—
CF/DMF-R	$1849\pm 449$	—	—
DCM/DMSO-R	$1459\pm 475$	—	—
CF/DMSO-R	$2140\pm 671$	$479\pm 311$	—
ACT/DMSO-R	$2579\pm 1128$	$857\pm 362$	—
THF/DMSO-R	$2152\pm 416$	$334\pm 125$	—
HFIP-A	$895\pm 382$	—	85
CF/DMF-A	$906\pm 337$	—	88
DCM/DMSO-A	$857\pm 338$	—	83
CF/DMSO-A	$834\pm 317$	—	77
ACT/DMSO-A	$927\pm 413$	—	64
THF/DMSO-A	$839\pm 379$	—	73



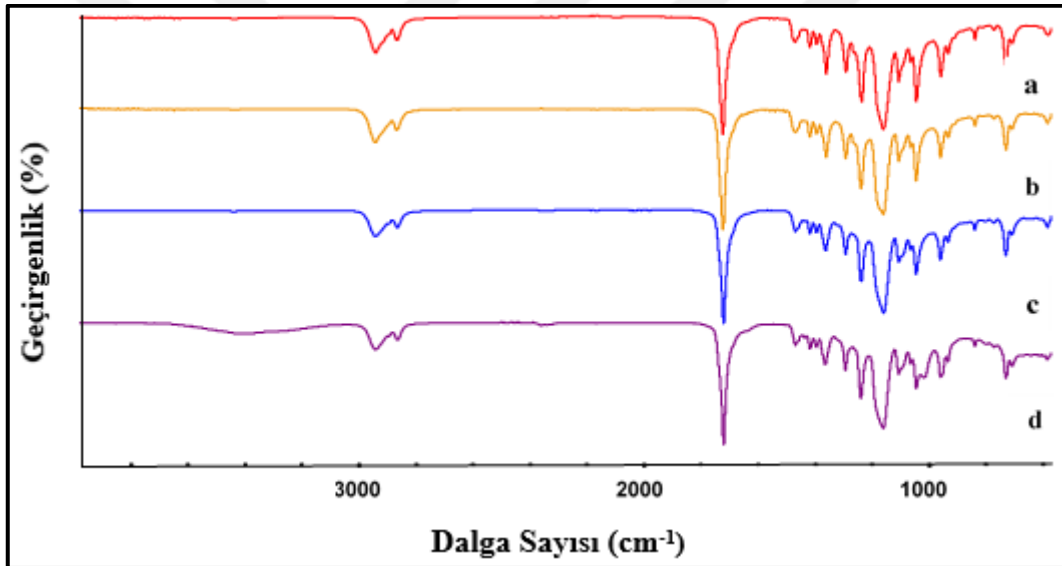
**Şekil 4.1.** Farklı morfolojilere sahip PCL fiber matrislerinin SEM görüntüleri; HFIP-R (a), HFIP-A (b), CF/DMF-R (c), CF/DMF-A (d), DCM/DMSO-R (e), DCM/DMSO-A (f) (fotoğraflar: 1 µm, küçük fotoğraflar: 5 µm).



**Şekil 4.1. (Devam)** CF/DMSO-R (g), CF/DMSO-A (h), THF/DMSO-R (i), THF/DMSO-A (k), ACT/DMSO-R (l), ACT/DMSO-A (m) (fotoğraflar: 1 $\mu$ m, küçük fotoğraflar: 5  $\mu$ m).

#### 4.3.2. FTIR (Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi) Analiz Sonuçları

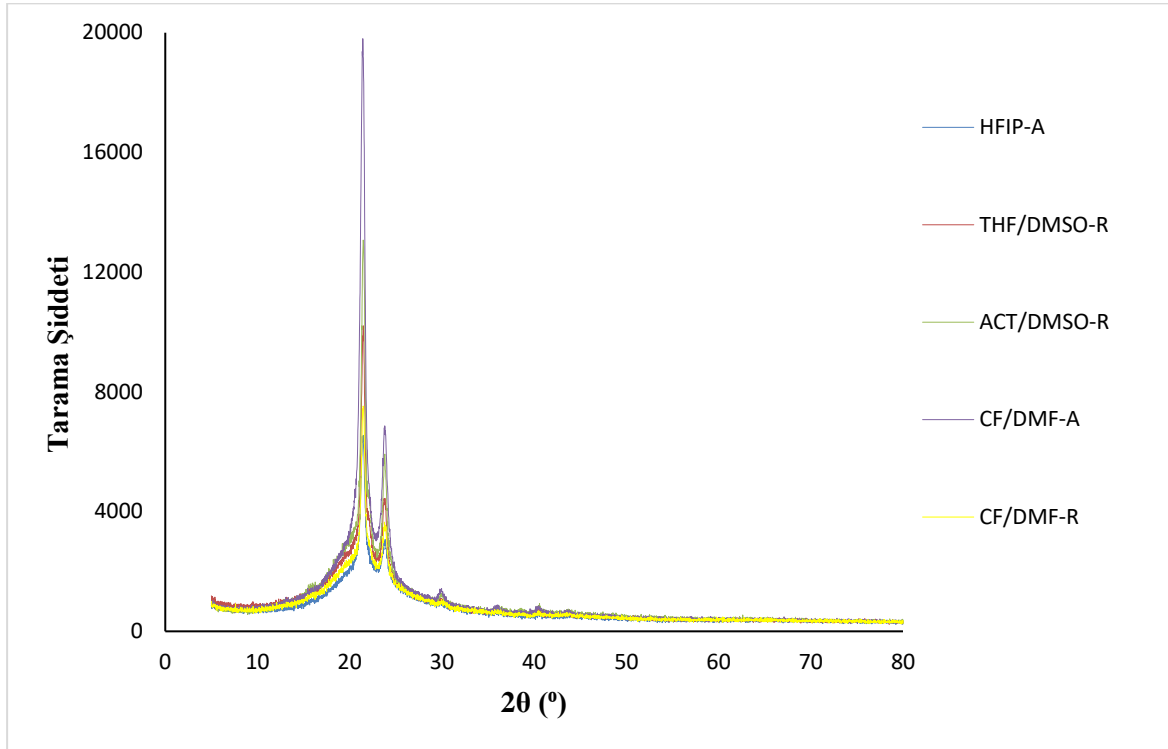
PCL polimerinin ve farklı çözücü sistemleri ile elde edilen PCL fiber matrikslerin kimyasal yapılarını incelemek amacıyla FTIR analizi, ATR tekniği kullanılarak yapılmış ve elde edilen spektrum Şekil 4.2'de verilmiştir. PCL fiber matrikslerin, literatürde de PCL'nin karakteristik pikleri olarak tanımlanan bölgelerde pikler verdiği görülmüştür. Bu pikler, simetrik CH<sub>2</sub> gerilmesine karşılık gelen pik 2866 cm<sup>-1</sup>, asimetrik CH<sub>2</sub> gerilmesine karşılık gelen pik 2943 cm<sup>-1</sup>, C=O gerilmesine karşılık gelen pik 1722 cm<sup>-1</sup>, C-C, C-O ve asimetrik C-O-C gerilmesine karşılık gelen pik ise 1238 cm<sup>-1</sup> dalga boyunda görülmüştür [86]. PCL polimerinin ve farklı çözücü sistemleri ile elde edilen PCL fiber matrikslerin aynı bölgelerde pikler vermesi, çözücülerin PCL'nin yapısında herhangi bir kimyasal değişikliğe yol açmadığını göstermektedir.



Şekil 4.2. PCL fiber matrikslerin FTIR analizi; PCL polimeri (a), HFIP-R (b), CF/DMF-R (c) ve THF/DMSO-R (d).

#### 4.3.3. XRD (X Işını Kırınımı) Analiz Sonuçları

PCL fiber matrikslerinin XRD analizi,  $2\theta = 0^\circ$ - $80^\circ$  tarama aralığında gerçekleştirilmiştir. Rastgele ve hizalı düzende üretilen PCL fiber matrikslerinin XRD spektrumları Şekil 4.3'de gösterilmektedir. Fiber matrikslerin XRD verilerinden hesaplanan kristalinite yüzdeleri ise Çizelge 4.2'de verilmiştir.



**Şekil 4.3.** Farklı morfolojilere sahip PCL fiber matrikslerinin XRD spektrumları.

Elde edilen sonuçlar kullanılan çözücü sistemlerinin fiber matrikslerin kristalinitelerini etkilediğini göstermektedir. Kristalinite dereceleri HFIP-A grubunda %60, THF/DMSO-R grubunda %57, ACT/DMSO-R grubunda %37, CF/DMF-A grubunda %72 ve CF/DMF-R grubunda ise %62 olarak hesaplanmıştır. Elektroğrılmış fiber yapıların kristaliniteleri, kullanılan çözücülerin buharlaşma hızlarına, kullanılan voltaj değerine ve ortam koşullarına oldukça bağlıdır. Literatürdeki benzer çalışmalarda da fiberlerin kristalinitelerinin kullanılan çözücülerin buharlaşma oranlarından büyük oranda etkilendiğine vurgu yapılmıştır [87]. Ayrıca, literatürde elektroğirmede yüksek camsı geçiş sıcaklığına ( $T_g$ ) sahip rijit polimerlerin kullanılmasının elde edilen matrikslerin kristalinitelerinin artmasını engellediği, PCL gibi daha düşük  $T_g$  değerlerine sahip ( $T_g \sim 60^\circ\text{C}$ ) esnek polimerlerin ise kristalize olma süresinin uzadığı ve buna bağlı olarak kristalinitenin arttığı belirtilmiştir. Lee ve arkadaşları, esnek polimerlerin jet çekim/uzama işlemi esnasında ve hatta fiberler katılaştıktan sonra bile kristallenme ihtimaline sahip olabileceğini vurgulamıştır [88].

Literatürdeki çalışmalara göre PCL polimerinin kristalinite yüzdesi yaklaşık olarak %39.1'dir [89]. Bu çalışmada ACT/DMSO'nun çözücü olarak kullanıldığı grupta kristalinite yüzdesinin, PCL polimerinin kristalinitesine benzer şekilde % 37 olduğu görülmektedir. Burada kullanılan ACT çözücüsünün uçuculuğu, DMSO çözücüsünden daha yüksektir ve yüksek nem ortamında (%70 RH) çalışılması, çözeltilinin buharlaşma hızında artışa neden olmuştur. Bu duruma ek olarak, ACT çözücüsünün dielektrik sabitinin yüksek olmasının, üretilen fiberlerde kristalinite oluşumunu sınırlandırdığı düşünülebilir [90]. Diğer gruplarda ise kullanılan kötü çözücüler kristalinite artışa neden olmuştur. Düşük uçuculuk oranına sahip olan kötü çözücülerin kullanılması durumunda yüzeyde nanotopografik yapılar oluşması yanında, çekirdeklenme hızı ve kristalizasyon süresi artıracığından, kristalinite yüzdesi artmaktadır [91,92].

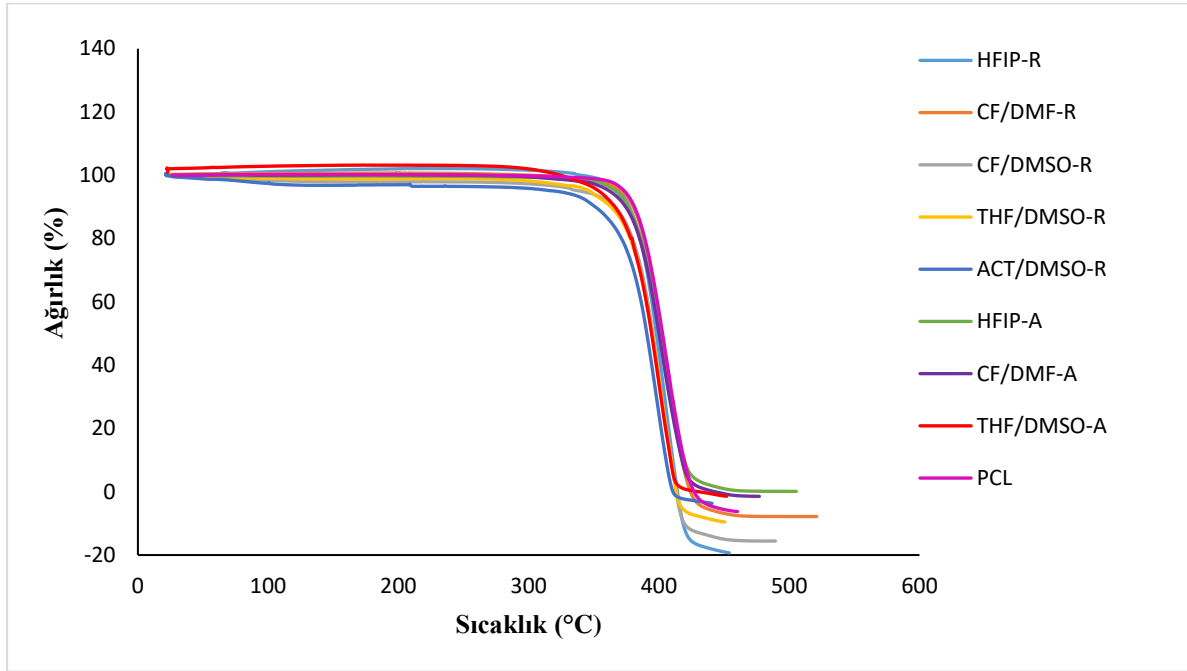
**Çizelge 4.2.** Farklı morfolojilere sahip PCL fiber matrikslerinin  $2\theta$  ( $^{\circ}$ ) pik ve yüzdede kristalinite değerleri.

Gruplar	$2\theta$ ( $^{\circ}$ )	% Xc
HFIP-A	21.42, 23.80	60
THF/DMSO-R	21.46, 21.92, 23.75	57
ACT/DMSO-R	12.85, 15.56, 21.46, 22.06, 23.78, 29.91, 40.38	37
CF/DMF-A	21.42, 23.73, 29.80, 40.46, 43.33	72
CF/DMF-R	21.46, 23.77	62

#### 4.3.4. TGA (Termogravimetrik) ve DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre) Analiz Sonuçları

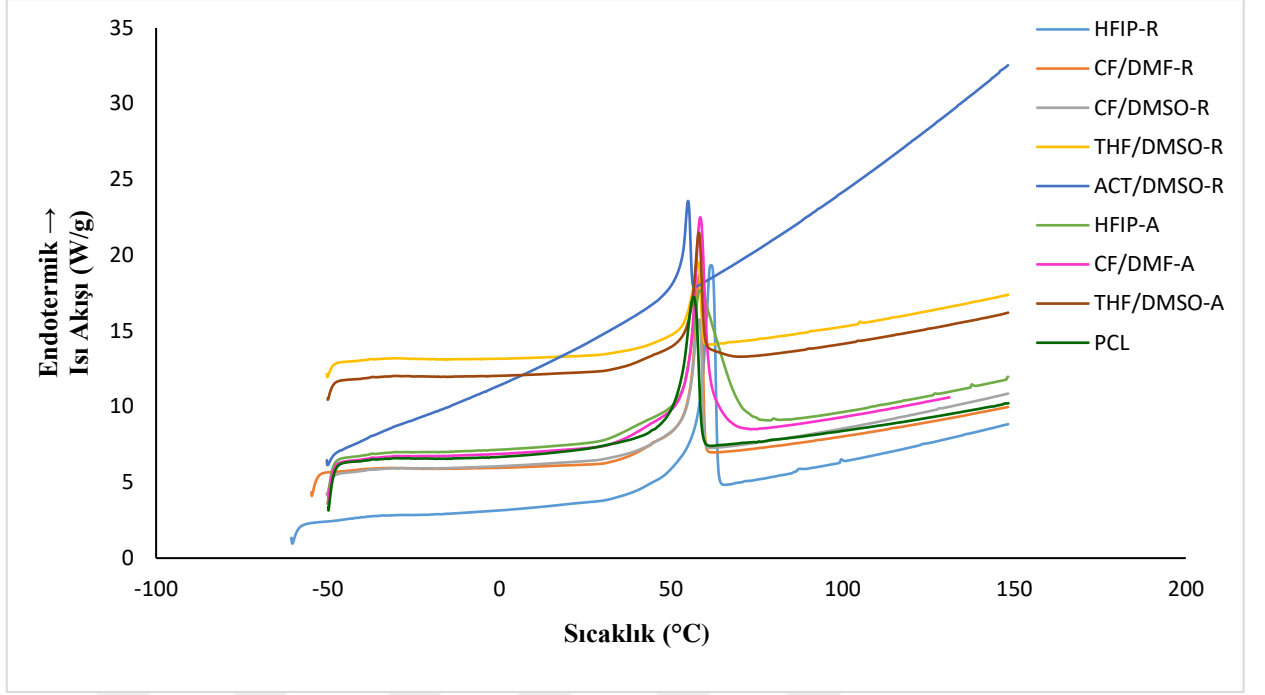
PCL polimeri ve PCL fiber matrikslerinin ısıl bozunma davranışı,  $N_2$  (g) atmosferinde gerçekleştirilen TGA analizi ile araştırılmış ve Şekil 4.4'de TGA termogramları verilmiştir.

Analize başlama sıcaklığı  $35^{\circ}C$ 'ye ayarlanmıştır ve fiber matriksler, dakikada  $10^{\circ}C$ 'lik kademeli bir sıcaklık artışıyla  $550^{\circ}C$ 'ye kadar ısıl işleme tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar PCL polimeri ve PCL fiber matrikslerin  $375-387^{\circ}C$ 'de ısıl bozunmaya uğradığını göstermektedir. Prabu ve ark. PCL ve PCL-kolajen ile yapmış oldukları çalışmada da PCL'nin bozunma sıcaklığının  $388^{\circ}C$  olduğunu belirtmiştir [93]. Çizelge 4.3'de örneklerin ( $T_0$ ) ilk bozunma sıcaklıkları verilmiştir.



**Şekil 4.4.** PCL polimerinin ve PCL fiber matrislerin TGA termogramları.

PCL polimeri ve PCL fiber matrislerinin ısıl özellikleri, TGA analizinin yanı sıra DSC analizi ile de araştırılmıştır (Şekil 4.5). Bu analiz kapsamında,  $N_2$  (g) atmosferinde,  $-70^\circ C$ 'den başlanarak  $150^\circ C$ 'ye kadar, dakikada  $10^\circ C$ 'lik kademeli bir sıcaklık artışıyla analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DSC termogramlarından PCL polimeri ve PCL fiber matrislerinin erime sıcaklıkları ( $T_e$ ) belirlenmiştir. Ancak yüksek sıcaklıklarda ısıtma ve soğutma yapılması nedeniyle,  $-60^\circ C$ 'lik bir camsı geçiş sıcaklığı ( $T_g$ ) değerine sahip olduğu bilinen PCL'nin bu değeri termogramda görülememiştir (Şekil 4.5). Yarı kristalin yapıdaki PCL'nin DSC termogramında,  $56^\circ C$ - $61^\circ C$ 'de karakteristik erime piki gözlemlenmiştir. Literatüre göre de PCL'nin erime noktası  $59^\circ C$ - $64^\circ C$  arasındadır [13,94]. Woo ve ark. tarafından sunulan çalışmada DSC termogramı ile PCL'in erime sıcaklığı  $57^\circ C$  olarak belirlenmiştir ve endotermik pik değerinin polimerin kristalin yapısından kaynaklandığı vurgulanmıştır [95]. Fonseca ve ark. PCL'in kristalin erime pik değerinin  $55.7^\circ C$ 'de olduğunu tespit etmiştir [95,96]. Sonuç olarak ısıl analizlerdeki yüksek erime sıcaklığı, yüksek oranda kristaliniteyi işaret etmektedir. Çizelge 4.3'de grupların ( $T_e$ ) erime sıcaklıkları verilmiştir.



Şekil 4.5. PCL polimerinin ve PCL fiber matrikslerin DSC termogramları.

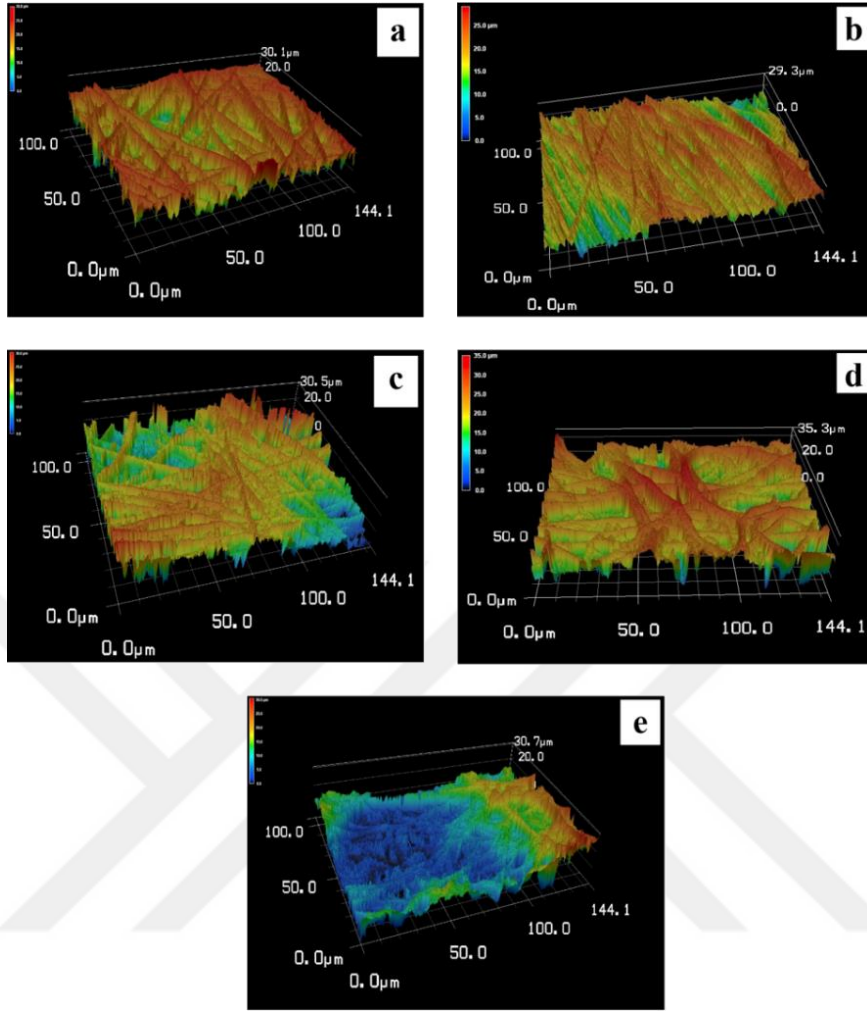
Çizelge 4.3. PCL polimerinin ve PCL fiber matrikslerin TGA termogramlarından elde edilen  $T_o$  (ilk bozunma) ve DSC termogramından elde edilen  $T_e$  (erime) sıcaklıkları.

Gruplar	$T_o$ (°C)	$T_e$ (°C)
HFIP-R	383.14	61.72
CF/DMF-R	385.14	58.19
CF/DMSO-R	380.43	58.21
THF/DMSO-R	375.54	54.98
ACT/DMSO-R	378.57	57.88
HFIP-A	382.14	58.55
CF/DMF-A	381.89	58.54
THF/DMSO-A	376.83	58.21
PCL polimeri	387.37	56.52

#### 4.3.5. Gözeneklilik ve Pürüzlülük Analizi

Nanotopografik fiber matrikslerin yüzey pürüzlülüğünün belirlenebilmesi amacıyla 3B lazer konfokal mikroskobu kullanılmıştır ve örneklerin 3B yüzey profilleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Örneklerin pürüzlülük ( $R_a$ ) değerleri ve gözenek çapları da Çizelge 4.4'de verilmiştir. Ölçümlerin eşik değerleri, ISO 4288-1966 standartlarına göre,  $\lambda_c$  (mm) değeri 2.5 ve  $R_a$  ( $\mu\text{m}$ ) aralığı ise  $2 < R_a < 10$  olarak seçilmiştir.  $\lambda_c$  değeri, bir filtrenin etkin hale geldiği dalga boyunu ifade etmektedir. Yüzey parametreleri için bir üst ve alt değer

arasındaki dalga boyları analiz edilmektedir: bunlar  $\lambda_s$  (en kısa) ve  $\lambda_c$  (en uzun) olarak adlandırılır. Profil özelliklerinin (tümsek veya çukur) aralıkları dikkate alındıktan sonra yapılmalıdır [97]. Fiber matrikslerin Ra değerlerinin 3.061 ile 5.062  $\mu\text{m}$  arasında değiştiği görülmektedir. En düşük Ra değeri HFIP'nin çözücü olarak kullanıldığı fiber matrikslerde gözlemlenmiştir. Bu örneklerde çözücü olarak sadece HFIP'nin kullanılması ve faz ayrımının gerçekleşmemesi nedeniyle, yüzeylerinin pürüzsüz olduğu daha önce de açıklanmıştır. Bu fiberlerdeki düşük Ra değeri de bu durumu desteklemektedir. Diğer yandan üretiminde NIPS mekanizmasının gerçekleştiği düşünülen gözenekli, benekli ve buruşuk yüzey topografisine sahip fiber matrikslerin Ra değerleri, artan yüzey pürüzlülüğüne bağlı olarak artmıştır [98]. Yüzey pürüzlülük değerleri ile 3B profil görüntüleri uyumludur. Bu profillerde, tek çözücü ile üretilen fiberlerde daha düz bir yüzey profili varken, faz ayrımı gerçekleşen örneklerde nanotopografik desenlerin yarattığı pürüzlülük dikkat çekmektedir.



**Şekil 4.6.** PCL fiber matrislerinin lazer konfokal mikroskobu ile elde edilen üç boyutlu yüzey topografisi; HFIP-R (a), HFIP-A (b), CF/DMF-R (c), THF/DMSO-R (d), ACT/DMSO-R (e) (100X).

**Çizelge 4.4.** PCL fiber matrislerin yüzey pürüzlülük değerleri (Ra).

Gruplar	Ra ( $\mu\text{m}$ )
a: HFIP-R	3.342
b: HFIP-A	3.061
c: CF/DMF-R	5.062
d: THF/DMSO-R	4.108
e: ACT/DMSO-R	5.326

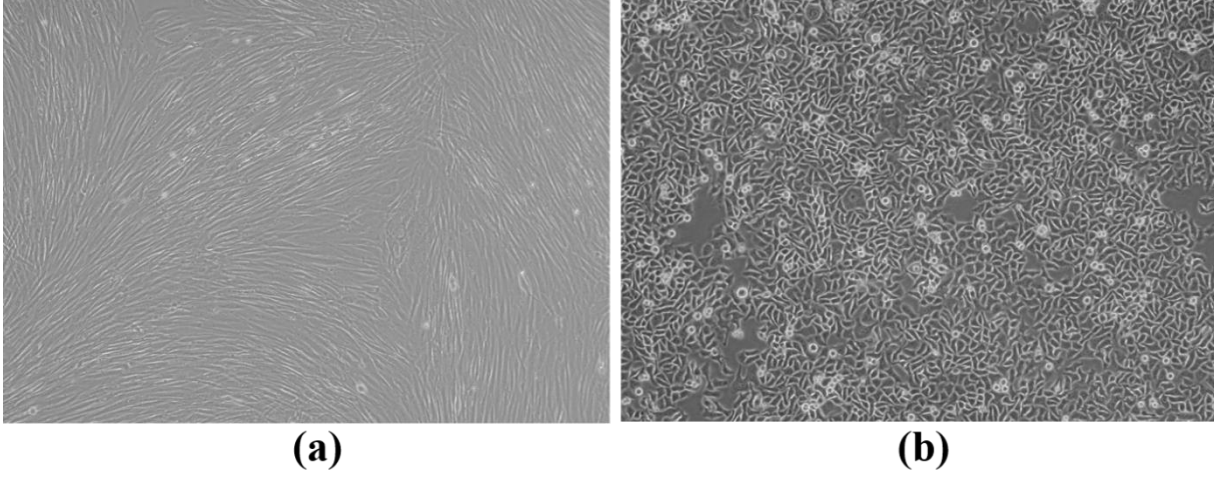
Fiber matrikslerin yüzey pürüzlülüğü üzerinde birçok parametre etkilidir. Öncelikle fiber üretim yöntemi olan elektroçirme işlem parametreleri (voltaj, akış hızı, toplayıcı mesafesi, polimer konsantrasyonu, çözücü iletkenliği ve uçuculuğu gibi), ortam sıcaklığı ve kapalı sistem içerisindeki bağıl nem miktarı, fiber morfolojileri üzerinde etkili olacaktır pürüzlülük ile doğrudan ilişkilendirilebilir [99–101].

#### **4.4. Hücre Kültür Çalışmalarının Sonuçları**

Fiber matriksler üzerindeki farklı topografik detayların hücreler üzerindeki etkisini incelemek amacıyla hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla BJ ve HS2 hücreleri ile çalışılmış ve deneysel gruplar şu şekilde belirlenmiştir; 1) rastgele düzende üretilen pürüzsüz (HFIP-R), 2) hizalı düzende üretilen pürüzsüz (HFIP-A), 3) rastgele düzende üretilen buruşuk (CF/DMF-R), 4) rastgele düzende üretilen gözenekli (THF/DMSO-R) ve 5) rastgele düzende üretilen benekli (ACT/DMSO-R) topografiye sahip fiberler.

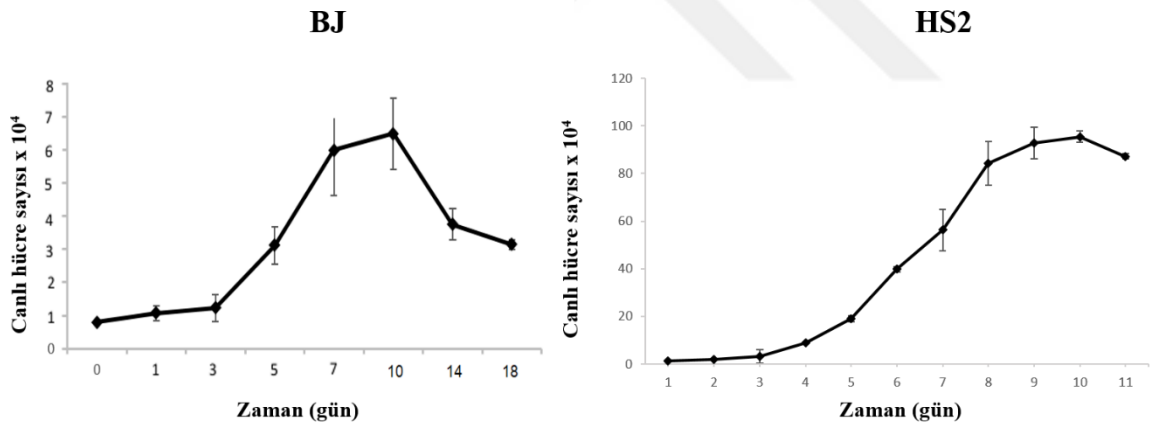
##### **4.4.1. Hücrelerin Karakterizasyonu**

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında insan dermal fibroblastları (BJ) ve insan keratinositleri (HS2) olmak üzere 2 farklı hücre tipi ile çalışılmasına karar verilmiştir. Hücrelerin optik mikroskop görüntüleri Şekil 4.7’de verilmiştir. Bu görüntülerde BJ hücrelerinin, fibroblastların karakteristik özelliğini gösteren iğsi morfoloji sergiledikleri ve uzayıp yayılarak hücre kültür kabının yüzeyini homojen bir şekilde kapladıkları belirlenmiştir. Diğer yandan HS2 hücreleri keratinositlere özgü kaldırım taşı morfolojisi sergilemiş ve önce küçük hücre grupları şeklinde çoğalmış, daha sonra bu grupların birleşmesi ile kültür kabının yüzeyini kaplamıştır.



**Şekil 4.7.** Hücrelerin optik mikroskop fotoğrafları; BJ (a) ve HS2 (b) (10X).

Aynı zamanda hemositometrik sayım ile hücrelerin büyüme eğrileri elde edilmiştir (Şekil 4.8). Büyüme eğrilerinden BJ hücrelerinin ikilenme süresi 42 saat ve HS2 hücrelerinin ikilenme süresi ise 34.5 saat olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.8.** Hücrelerin hemositometrik sayım yöntemi ile elde edilen büyüme eğrileri; BJ (a) ve HS2 (b).

#### 4.4.2. Fibröz Doku İskelelerine BJ ve HS2 Hücrelerinin Tutunması

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında öncelikle fiber matriksler üzerindeki hücre tutunmasına bakılmıştır (Çizelge 4.5). Bu amaçla ekimden sonraki 4. saatte hücre ekilen matriksler, hücrelerin yüzeyden kaldırılması için tripsine maruz bırakılmış ve elde edilen

hücreler hemositometrik olarak sayılmıştır. Son olarak başlangıç hücre sayısı göz önünde bulundurularak yüzde hücre tutunma değerleri hesaplanmıştır. BJ hücreleri ile yapılan hücre tutunma çalışmasına bakıldığında TCPS yüzeylerde tutunma yüzdesi yaklaşık %75 olarak hesaplanmıştır. En etkin hücre tutunmasının buruşuk ve benekli morfolojideki fiberler üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu malzemeler üzerindeki hücre tutunmasının TCPS ile benzer olduğu görülmektedir. İki grup kendi arasında değerlendirildiğinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). Pürüzsüz yüzeyli rastgele düzende üretilen fiberler ( $*p<0.05$ ), hizalı düzende üretilen fiberler ( $**p<0.01$ ) ve gözenekli fiberlerde ( $**p<0.01$ ) hücre tutunması diğer gruplara göre anlamlı derecede düşüktür. Rastgele ve hizalı düzende üretilen fiberler kendi aralarında değerlendirildiğinde hücre tutunmasında bir fark görülmemiştir ( $p>0.05$ ).

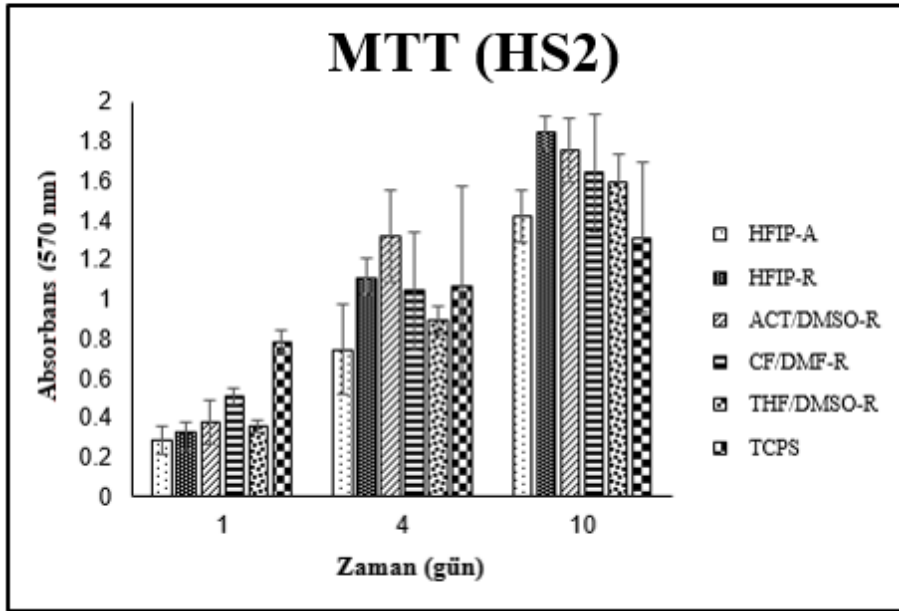
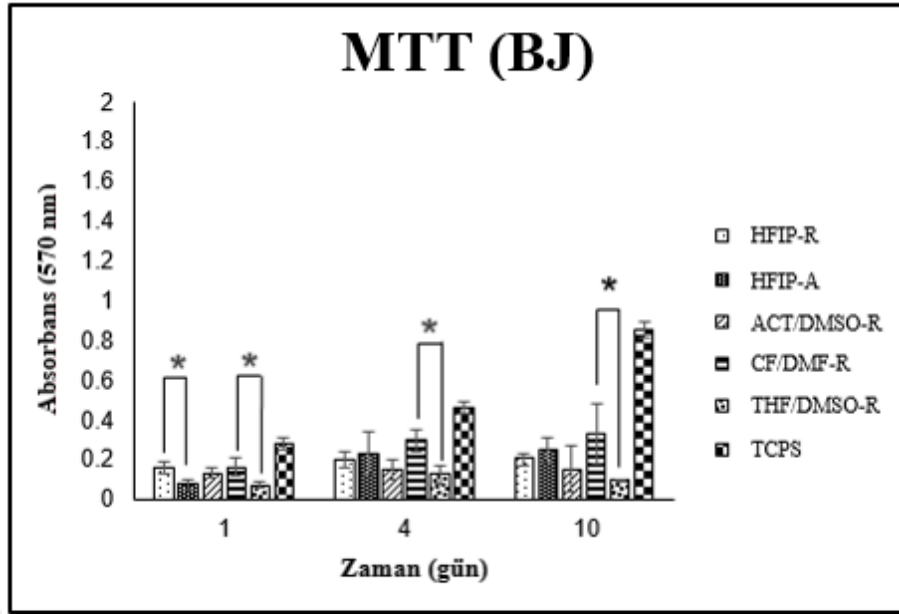
**Çizelge 4.5.** BJ ve HS2 hücrelerinin fiber matris doku iskelelerine (%) tutunma oranları.

Hücreler	Gruplar	4. saatteki % Tutunma
BJ	TCPS	75±13
	HFIP-R	33±5
	HFIP-A	15±5
	CF/DMF-R	71±20
	THF/DMSO-R	25±5
	ACT/DMSO-R	61±18
HS2	TCPS	78±2
	HFIP-R	41±11
	HFIP-A	58±5
	CF/DMF-R	77±3
	THF/DMSO-R	40±8
	ACT/DMSO-R	41±7

HS2 hücreleri ile yapılan çalışmaya bakıldığında ise benzer şekilde en iyi hücre tutunması buruşuk morfolojideki fiber yüzeylerinde olmuştur ve bu malzemedeki hücre tutunmasının TCPS yüzeylerdeki tutunmayı yakaladığı görülmektedir. Benekli morfolojideki fiber yüzeyleri, keratinosit tutunmasını fibroblastlar kadar desteklememiştir. Yine fibroblastlar ile benzer şekilde keratinosit hücreleri de pürüzsüz yüzeyli rastgele fiberler ( $***p<0.001$ ), hizalı fiberler ( $*p<0.05$ ) ve gözenekli fiberlere ( $***p<0.001$ ) diğer gruplara göre anlamlı derecede az tutunmuştur. Fiberlerin hizalanması, rastgele düzende üretilen fiberler ile karşılaştırıldığında, hücre tutunmasını etkilememiştir ( $p>0.05$ ).

#### 4.4.3. BJ ve HS2 Hücrelerinin MTT Analizi Sonuçları

Fiber matrisler üzerindeki hücre canlılığını belirlemek amacıyla belirlenen günlerde MTT analizi yapılmıştır (Şekil 4.9). BJ hücreleri ile yapılan çalışmada hücre canlılığı TCPS yüzeylerde kültürün başlangıcından 10. güne gelindiğinde önemli derecede artış göstermiştir ( $***p<0.001$ ). Fiber yüzeylerde ise hücre canlılığının kültür boyunca sabit kaldığı belirlenmiştir. Birinci gün MTT değerlerine bakıldığında pürüzsüz yüzeylerde rastgele düzende üretilen fiberlerdeki hücre canlılığının hizalı düzende üretilen fiber yüzeylerine göre daha fazla olduğu görülmektedir ( $*p<0.05$ ). Pürüzlü morfolojiye sahip fiberler incelendiğinde benekli ve buruşuk morfolojiye sahip fiberlerdeki hücre canlılığı benzer bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Kültürün 4. gününde buruşuk morfolojiye sahip yüzeylerdeki hücre canlılığının TCPS yüzeylerdeki canlılığı yakaladığı görülmektedir. Diğer fiberlerdeki hücre canlılıkları ise TCPS yüzeylerden anlamlı derecede düşüktür. Ayrıca kültür boyunca buruşuk morfolojiye sahip fiberler üzerindeki hücre canlılığının gözenekli yüzeylere göre anlamlı derecede fazla olduğu belirlenmiştir ( $*p<0.05$ ). HS2 hücreleri ile yapılan çalışmada TCPS de dahil tüm gruplarda hücre canlılığının artış gösterdiği görülmektedir ( $***p<0.001$ ). Kültürün ilk günü en yüksek hücre canlılığı TCPS yüzeylerdeki canlılığı yakalamıştır. Ayrıca fiberler arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ).



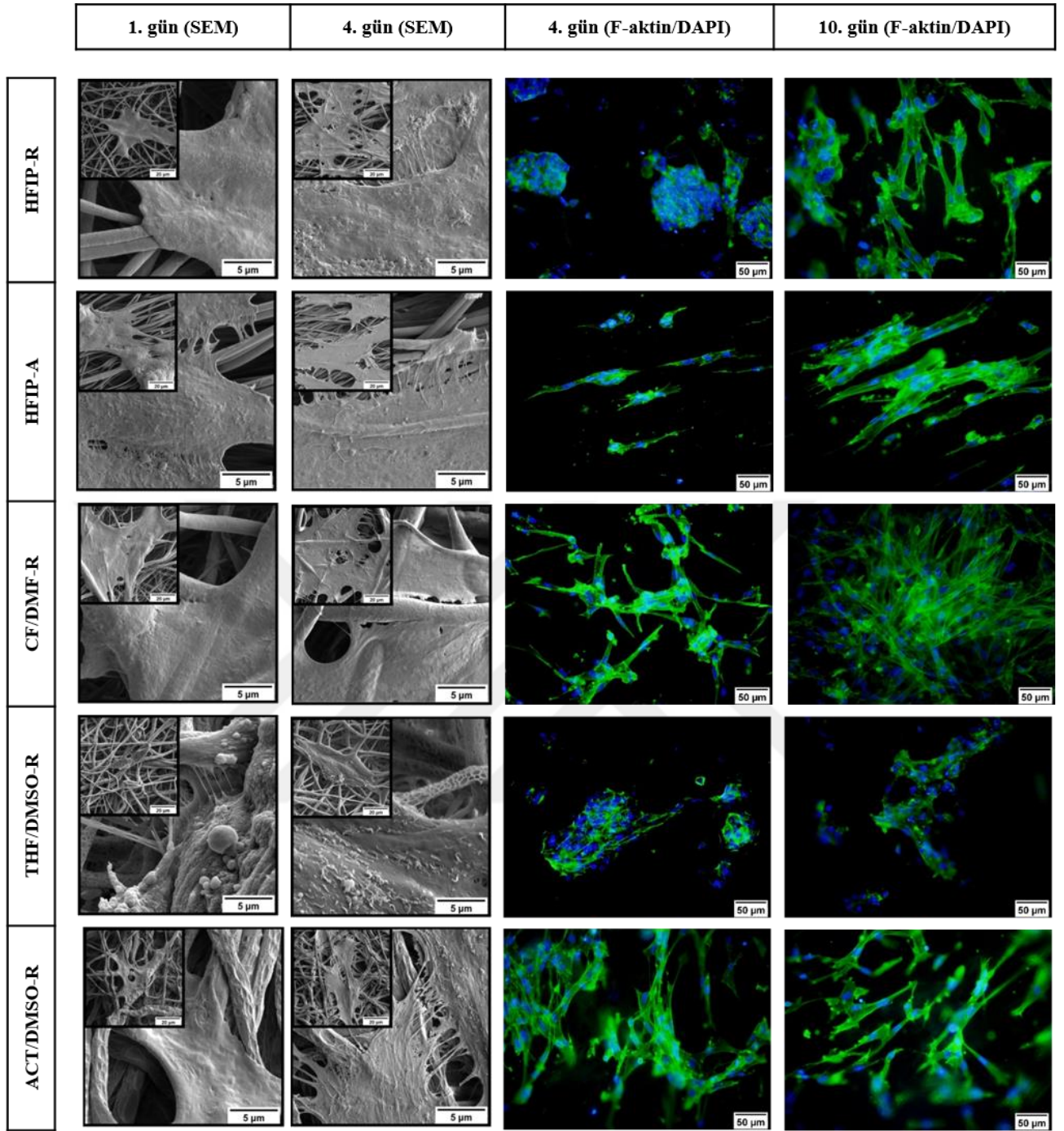
**Şekil 4.9.** PCL fiber matrisler üzerindeki BJ ve HS2 hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri.

#### 4.4.4. BJ ve HS2 Hücrelerinin Morfolojik İncelemesi

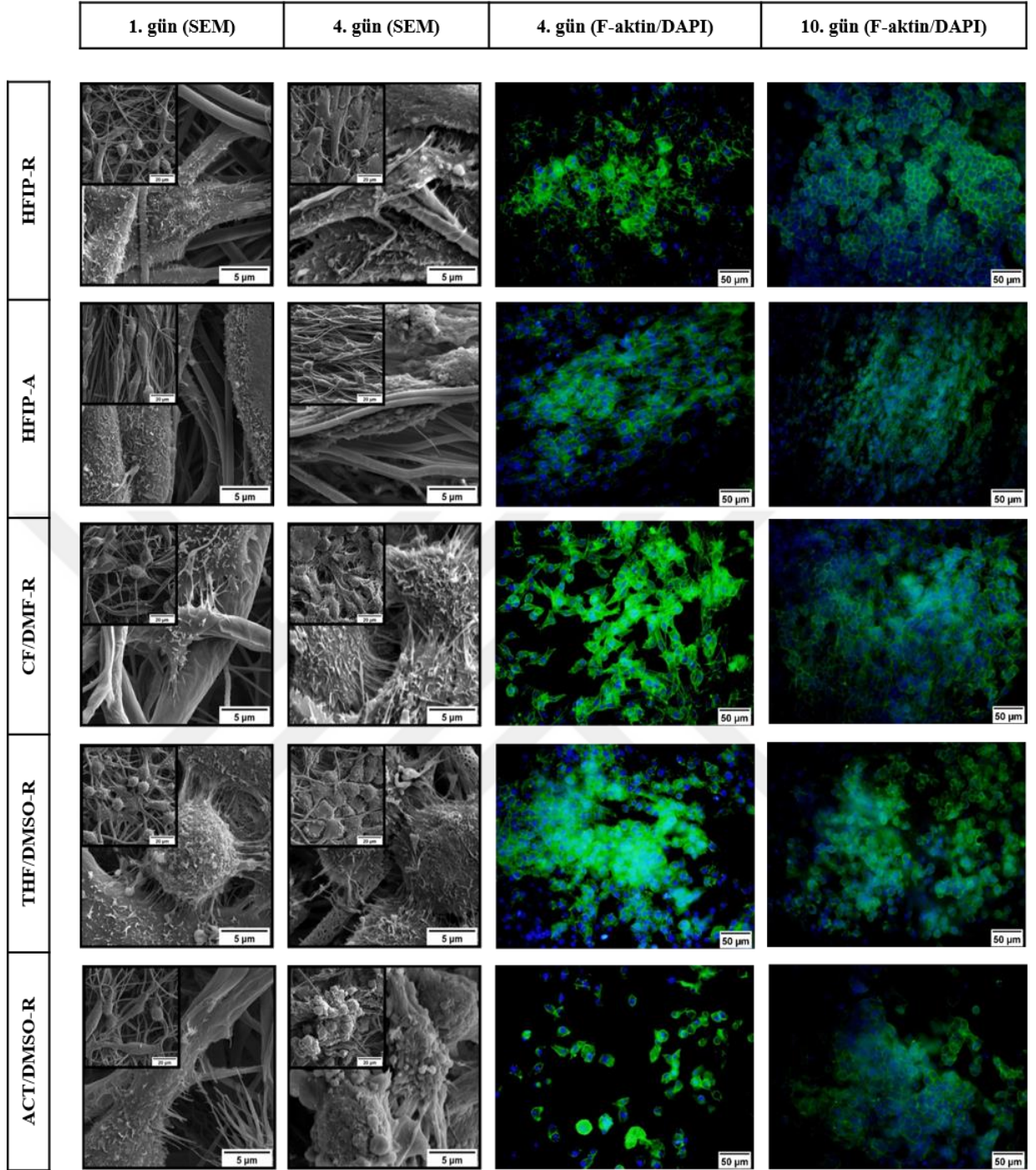
Hücrelerin fiber matrisler üzerindeki tutunması, yayılması, hücre-hücre ve hücre-biyomalzeme etkileşimleri kültürün 1. ve 4. günü SEM analizi ile görüntülenmiştir. Aynı zamanda kültürün 4. ve 10. günü çekirdek/F-aktin ikili floresan boyaması yapılmış ve malzemeler üzerindeki hücrelerin iskelet organizasyonu ortaya koyulmuştur. BJ hücreleri ile yapılan çalışmaya bakıldığında hücrelerin tüm malzemelerin yüzeyine etkin bir şekilde

tutunup yayıldıkları gözlenmektedir (Şekil 4.10). Pürüzsüz fiberlerin görüntüleri incelendiğinde, rastgele düzende üretilen fiberler üzerinde hücre tutunması her yöne doğruyken, hizalı düzende üretilen fiberlerde ise hücrelerin fiber boyunca yayıldıkları belirlenmiştir. Özellikle floresan görüntülerine bakıldığında F-aktin filamentlerinin hizalı fiberlerde fiberlerin yönü doğrultusunda uzadığı belirlenmiştir. Fiberler üzerindeki topografik yapılar bakıldığında ise hücrelerin buruşuk morfolojideki fiberler üzerinde oldukça etkin bir şekilde yayıldıkları görülmüştür. Bu sonuçlar hemositometrik sayım sonuçları ile de uyumludur. Diğer yandan buruşuk morfolojideki fiberler üzerinde hücreler oldukça düz bir morfoloji sergilemektedir. SEM görüntülerinde gözenekli fiberler üzerinde hücrelerin malzemeye başarılı şekilde tutundukları görülmektedir, ancak floresan görüntülerine bakıldığında hücre iskeletinin çekirdek etrafında lokalize olduğu ve diğer örneklere göre daha az F-aktin filamentinin bulunduğu belirlenmiştir. Son olarak benekli fiberler üzerinde hücrelerin oldukça iyi bir şekilde tutunup yayıldıkları ve diğer örnekler ile karşılaştırıldığında çok daha etkin hücre-hücre etkileşimlerinin kurulduğu görülmektedir. Floresan görüntülerinde de bu örneklerdeki hücrelerde yoğun bir hücre iskeleti ve daha karakteristik bir fibroblastik morfoloji belirlenmiştir.

HS2 hücreleri ile yapılan çalışmalarda ise benzer şekilde yüzeyleri pürüzsüz rastgele düzende üretilen fiberlerde hücre yayılması açısından herhangi bir düzen söz konusu değildir (Şekil 4.11). Diğer yandan hem SEM hem de floresan görüntülerinde hizalı düzende üretilen fiberler üzerinde hücrelerin fiberler yönünde uzadıkları görülmektedir. Fiberler üzerindeki topografik detayların (buruşuk, gözenekli ve benekli fiberler) ise hücre-hücre bağlantılarını artırdığı, hücrelerin yoğun hücresele uzantılar ile hem fiberler hem de diğer hücreler ile bağlantılar kurdukları belirlenmiştir. Aynı zamanda özellikle gözenekli fiberler üzerinde hücrelerin bir araya gelerek keratinositlere özgü kaldırım taşı benzeri morfolojiyi sergiledikleri görülmektedir. Her iki hücre grubu birbirleri ile kıyaslandığında, beklendiği üzere fiberler üzerinde keratinosit hücrelerinin gruplar halinde çoğaldığı, dermal fibroblastların ise daha yoğun bir iskelet organizasyonu ile yüzeyde daha geniş alanlara yayıldıkları tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. PCL fiber matrisler üzerinde BJ hücrelerinin SEM fotoğrafları ve F-aktin/DAPI boyama görüntüleri (hücre iskeleti-yeşil, hücre çekirdeği-mavi).



**Şekil 4.11.** PCL fiber matrisler üzerinde HS2 hücrelerinin SEM fotoğrafları ve F-aktin/DAPI boyama görüntüleri (hücre iskeleti-yeşil, hücre çekirdeği-mavi).

Hayvansal hücrelerde hücrel aktivitelere ilk basamağı hücrenin yüzeye adezyonudur. Hücreler integrin reseptörleri aracılığı ile yüzey ile etkileşime geçer ve bu etkileşim sonucunda hücre içi sinyal yolları aktive olarak hücre yayılması, proliferasyon, göç ve farklılaşma gibi hücrel cevaplar meydana gelir [102]. Hücrelerin malzeme yüzeyine

adezyonu şu basamakları içerir: 1) tutunma, 2) yayılma, 3) aktin filamentlerinin organizasyonu ve 4) fokal adezyonun oluşması [26]. PCL, doku mühendisliği çalışmalarında oldukça sık kullanılan biyouyumlu, biyobozunur bir polimerdir. Ancak yüksek hidrofobisitesi nedeniyle PCL yüzeylere etkin bir hücre adezyonu sağlanamamaktadır. Bu durumda PCL yüzeyler çeşitli modifikasyonlara tabi tutulmaktadır. Yapılan bir çalışmada PCL nanofiber yüzeylerine kovalent olarak EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) bağlanmış ve keratinosit hücrelerinin yayılmasının, proliferasyonunun ve farklılaşmasının arttığı belirlenmiştir [5]. Gomez ve ark. PCL nanofiberleri PRP (Trombosit Yönünden Zengin Plazma) ile kaplayarak çok daha etkin bir hücre tutunması ve proliferasyonu elde etmiştir [103]. Sahrifi ve ark. PCL nanofiberleri oksijen plazma ile muamele ederek nanotopografik yapılar oluşturmuş ve hücrel aktiviteyi uyarmıştır [104]. Tez çalışması kapsamında yüzey özellikleri açısından farklı PCL nanofiberler kullanılmıştır. Her iki hücre hattı içinde en iyi hücre tutunmasının buruşuk yüzeyler üzerinde olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan nanofiberler üzerindeki hücre çoğalması benzerdir ve proliferasyon açısından çarpıcı bir sonuç elde edilememiştir. Ancak hücre morfolojilerinin yüzey özelliklerine göre önemli farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Öncelikle pürüzsüz yüzeyli PCL nanofiberler rastgele ve hizalı olarak üretilmiştir. Rastgele düzende üretilen fiberler üzerinde hücreler her yöne büyürken, hizalı fiber yüzeylerinde hem fibroblast hem de keratinositlerin fiber boyunca uzandıkları belirlenmiştir. Hizalı fiberler hücre membranına, integrinin sadece bir yönde diffüze olmasına yönelik sürekli bir ipucu verirler ve böylece hücrenin lateral olarak yayılması engellenir. Hizalı nanofiberlerde hücrelerin uzamasına çekirdek deformasyonu eşlik eder. Çekirdekdeki deformasyon F-aktin filamentlerindeki çekmeye bağlı stresin çekirdeğe iletilmesi ile gerçekleşir. Böylece floresan görüntülerinde belirlendiği üzere düzenlenmiş fiberlerdeki boy/en oranı artar [56]. Ayrıca yapılan çalışmada PCL nanofiberlerin yüzeylerinde çeşitli teknikler ile buruşukluk, benek ve gözenek gibi topografik detaylar oluşturulmuştur. Nanofiber organizasyonuna ve yüzey özelliklerine göre hücrelerin morfolojik bir adaptasyona gittiği ve hücrel aktivitelerin fiber düzenlenmesinden etkilendiği bilinmektedir [105]. Topografik yapılar hücrelerden uzanan filopodiyalar için ekstra bir tutunma ve yayılma noktası olabilir. SEM görüntülerinden de görüldüğü üzere özellikle benekli ve gözenekli fiberler üzerinde her iki hücre hattının da yoğun hücrel uzantılar ile hem fiberler hem de diğer hücreler ile bağlantı kurduğu görülmektedir. Düz yüzeylerde hücreler her yöne doğru uzamaktadır. Ancak topografik yapıların olduğu yüzeylerde mikrofilament oluşumu mekanik olarak

sınırlandığından hücreler belli bir yöne doğru daha polarize büyümektedir [27]. Özellikle fibroblastlar ile yapılan çalışmada hücrelerin benekli yüzeylerde fiberler boyunca oldukça uzayarak yüzey üzerindeki topografik detaylara cevap verdiği görülmektedir. Ayrıca fiberler üzerindeki topografik yapıların hücresel mekanotransdüksiyonu değiştirdiği düşünülmektedir. Hücreler topografik yüzeyler ile etkileşime geçtiklerinde bir mekanoduyarlı protein olan YAP (yes-associated protein) sitoplazmadan çekirdeğe geçmektedir. YAP'in çekirdekte lokalize olması hücre yayılmasını, çekirdeğin yassılaşmasını ve nükleer gözeneklerin genişlemesini sağlamaktadır [105]. İleriki çalışmalarda bu yüzey özelliklerinin hücre farklılaşması üzerindeki etkileri araştırılacak ve morfolojik değişimlerin hücresel fonksiyonlar ile ilişkisi ortaya koyulacaktır.



## 5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında, PCL polimeri kullanılarak, tekli ve ikili (iyi-kötü) çözücüler varlığında, elektroğirme yöntemiyle, rastgele ve hizalı düzende, farklı nanotopografik yüzey detaylarına sahip fiber matriksler elde edilmiştir. Elde edilen fiber matrikslerin fiziksel, kimyasal ve morfolojik özelliklerinin incelenmesi amacıyla karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Aynı zamanda insan dermal fibroblast ve keratinosit hücreleri kullanılarak fiberler üzerinde hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiş ve farklı topografik yüzeylerin hücre tutunması, proliferasyonu, morfolojisi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

- Farklı çözücü sistemleri (HFIP, CF/DMF, DCM/DMSO, CF/DMSO, THF/DMSO, ACT/DMSO) kullanılarak elektroğirme yöntemi ile rastgele ve hizalı düzende nanofiber matriksler üretilmiştir.
- Rastgele fiberlerde toplama işlemi sabit bir toplayıcı üzerinde yapılırken toplayıcı olarak döner tamburun kullanıldığı gruplarda yüksek hizalanma derecesine sahip fiberler oldukça başarılı bir şekilde elde edilmiştir.
- İkili çözücü sistemlerinde, seçilen iyi/kötü çözücüler varlığında ve ortamdaki bağıl neme bağlı olarak, meydana gelen farklı mekanizmalar ile (NIPS, VIPS, TIPS, BF) fiberlerin yüzeyinde buruşukluk, gözenek, oluk ve benek gibi farklı nanotopografik ayrıntılar oluşmuştur.
- PCL fiber matrikslerin kimyasal yapısını ortaya koymak için yapılan FTIR analizinde, fiberler PCL polimeri ile aynı dalga boylarında pik vermiştir. Bu durum kullanılan çözücülerin polimerin kimyasal yapısını bozmadığını ve fiber oluşumu sonrası yapıdan tamamen uzaklaştıklarını göstermektedir.
- Fiber matrikslerin faz analizi XRD ile gerçekleştirilmiş ve genelde kullanılan çözücülerin buharlaşma hızının, eğirme sırasında kristalinitenin artışına olanak verdiği tespit edilmiştir.
- Fiber matrikslerin ısıl davranışları DSC ve TGA analizleri ile incelenmiş ve fiber matrikslerin literatür ile uyumlu biçimde 375-387°C'de bozunmaya uğradıkları, 56°C-61°C arasında da karakteristik erime piklerinin olduğu görülmüştür.
- Yüzey pürüzlülük analiz sonucunda elde edilen Ra değerleri ve 3B yüzey pürüzlülük profilleri, sadece HFIP'nin çözücü olarak kullanıldığı gruplarda yüzey pürüzlülüğünün düşük olduğunu, iyi/kötü çözücü sistemlerinin kullanıldığı

gruplarda ise gerçekleşen faz ayırımına bağlı yüzey pürüzlülüğünün arttığını göstermektedir.

- Nanotopografik fiber yüzeyleri üzerinde BJ ve HS2 hücreleri ile yapılan hücre kültür çalışmalarına göre, her iki hücre hattı için de en etkin hücre tutunmasının buruşuk morfolojideki fiberler üzerinde gerçekleştiği görülmüştür.
- Hücre proliferasyonuna bakıldığında ise BJ hücrelerinin canlılığının kültür boyunca çok fazla değişmediği belirlenmiştir. Diğer yandan, HS2 hücrelerinin canlılığının tüm fiberler üzerinde zamana bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir.
- Morfolojik değerlendirmeler doğrultusunda her iki hücre tipi için de hücreler rastgele fiberler üzerinde her yöne yayılırken, düzenli fiberler üzerinde hücre uzamasının fiber yönünü takip ettiği belirlenmiştir. Diğer yandan fiberler üzerindeki topografik yapıların, yine her iki hücre için, hücre-hücre ve hücre-yüzey etkileşimlerini arttırdığı görülmüştür. Aynı zamanda bu sonuç floresan boyamaları ile desteklenmiş ve özellikle buruşuk ve benekli morfolojinin aktin filamentlerinin sayısını artırdığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda her iki hücre grubu birbiri ile kıyaslandığında, beklendiği üzere fiberler üzerinde keratinosit hücrelerinin gruplar halinde çoğaldığı, dermal fibroblastların ise daha yoğun bir iskelet organizasyonu ile yüzeyde daha geniş alanlara yayıldıkları belirlenmiştir.

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, doku mühendisliği uygulamalarında ihtiyaç duyulan, farklı çözücüler kullanılarak faz ayırımı mekanizmalarının etkisiyle elde edilen, çeşitli nanotopografik desenlere sahip doku iskelelerinin, BJ ve HS2 hücreleri ile etkileşimleri sonucunda hücrelerin tutunma, çoğalma ve yayılma davranışlarını desteklediği tespit edilmiştir. Bu nanotopografik desenlerin, hücre-hücre ve hücre-malzeme iletişimini oldukça iyi sağladığı söylenebilir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Kriparamanan R, Aswath P, Zhou A, Tang L, Nguyen KT. Nanotopography: Cellular responses to nanostructured materials. *J Nanosci Nanotechnol.* 6 (2006) 1905–19.
2. Salmasi S. Role of nanotopography in the development of tissue engineered 3D organs and tissues using mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 7 (2015) 266.
3. Decuzzi P, Ferrari M. Modulating cellular adhesion through nanotopography. *Biomaterials.* 31 (2010) 173–9.
4. Kim HN, Jiao A, Hwang NS, Kim MS, Kang DH, Kim DH, et al. Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 65 (2013) 536–58.
5. Gümüşderelioglu M, Dalkiranoğlu S, Aydın RST, Çakmak S. A novel dermal substitute based on biofunctionalized electrospun PCL nanofibrous matrix. *J Biomed Mater Res - Part A.* 98 (2011) 461–72.
6. Heidari M, Bahrami SH, Ranjbar-Mohammadi M, Milan PB. Smart electrospun nanofibers containing PCL/gelatin/graphene oxide for application in nerve tissue engineering. *Mater Sci Eng C.* 103 (2019) 109768.
7. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci.* 35 (2010) 1217–56.
8. Beşkardeş IG, Gumusderelioglu M. Biomimetic apatite-coated PCL scaffolds: Effect of surface nanotopography on cellular functions. *J Bioact Compat Polym.* 24 (2009) 507–24.
9. Gerçek I, Tiğli RS, Gumusderelioglu M. A novel scaffold based on formation and agglomeration of PCL microbeads by freeze-drying. *J Biomed Mater Res - Part A.* 86 (2008) 1012–22.
10. Amato I, Ciapetti G, Pagani S, Marletta G, Satriano C, Baldini N, et al. Expression of cell adhesion receptors in human osteoblasts cultured on biofunctionalized poly-( $\epsilon$ -caprolactone) surfaces. *Biomaterials.* 28 (2007) 3668–78.
11. Norman JJ, Desai TA. Methods for fabrication of nanoscale topography for tissue engineering scaffolds. *Ann Biomed Eng.* 34 (2006) 89–101.
12. Labet M, Thielemans W. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 3484–3504.
13. Más Estellés J, Vidaurre A, Meseguer Dueñas JM, Castilla Cortázar I. Physical characterization of polycaprolactone scaffolds. *J Mater Sci Mater Med.* 19 (2008) 189–95.
14. E. Özsağiroğlu, Enzimatik Polimerizasyon ile Sentezlenen Polikaprolaktona Reaksiyon Koşullarının Etkisinin ve Polikaprolaktonun Biyobozunurluğunu İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2011.
15. Chew SY, Hufnagel TC, Lim CT, Leong KW. Mechanical properties of single electrospun drug-encapsulated nanofibres. *Nanotechnology.* 17 (2006) 3880–91.

16. Şimşek M. Tuning surface texture of electrospun polycaprolactone fibers: Effects of solvent systems and relative humidity. *J Mater Res.* 35 (2020) 332–42.
17. Jung JT, Kim JF, Wang HH, di Nicolo E, Drioli E, Lee YM. Understanding the non-solvent induced phase separation (NIPS) effect during the fabrication of microporous PVDF membranes via thermally induced phase separation (TIPS). *J Memb Sci.* 514 (2016) 250–63.
18. Ye X-Y, Lin F-W, Huang X-J, Liang H-Q, Xu Z-K. Polymer fibers with hierarchically porous structure: combination of high temperature electrospinning and thermally induced phase separation. *RSC Advances.* 3 (2013) 13851–13858.
19. Huang C, Thomas NL. Fabrication of porous fibers via electrospinning: strategies and applications. *Polym Rev.* 60 (2020) 595–647.
20. Li L, Jiang Z, Li M, Li R, Fang T. Hierarchically structured PMMA fibers fabricated by electrospinning. *RSC Adv.* 5 (2014) 52973–52985.
21. Zhou Q, Xie J, Bao M, Yuan H, Ye Z, Lou X, et al. Engineering aligned electrospun PLLA microfibers with nano-porous surface nanotopography for modulating the responses of vascular smooth muscle cells. *J Mater Chem B.* 3 (2015) 4439–50.
22. Bacakova M, Lopot F, Hadraba D, Varga M, Zaloudkova M, Stranska D, et al. Effects of fiber density and plasma modification of nanofibrous membranes on the adhesion and growth of HaCaT keratinocytes. *J Biomater Appl.* 29 (2015) 837–53.
23. Luwang Laiva A, Venugopal JR, Sridhar S, Rangarajan B, Navaneethan B, Ramakrishna S. Novel and simple methodology to fabricate porous and buckled fibrous structures for biomedical applications. *Polymer.* 55 (2014) 5837–42.
24. Pant HR, Neupane MP, Pant B, Panthi G, Oh HJ, Lee MH, et al. Fabrication of highly porous poly( $\epsilon$ -caprolactone) fibers for novel tissue scaffold via water-bath electrospinning. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 88 (2011) 587–92.
25. Abadi FJH, Tehran MA, Zamani F, Nematollahi M, Mobarakeh LG, Nasr-Esfahani MH. Effect of nanoporous fibers on growth and proliferation of cells on electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds. *Int J Polym Mater Polym Biomater.* 63 (2013) 57–64.
26. Chen S, Cui S, Zhang H, Pei X, Hu J, Zhou Y, et al. Cross-Linked Pectin Nanofibers with Enhanced Cell Adhesion. *Biomacromolecules.* 19 (2018) 490–8.
27. Omidinia-Anarkoli A, Rimal R, Chandorkar Y, Gehlen DB, Rose JC, Rahimi K, et al. Solvent-Induced Nanotopographies of Single Microfibers Regulate Cell Mechanotransduction. *ACS Appl Mater Interfaces.* 11 (2019) 7671–85.
28. Suwantong O. Biomedical applications of electrospun polycaprolactone fiber mats. *Polymers for Advanced Technologies.* 27 (2016) 1264–73.
29. Tiğli RS, Kazaroğlu NM, Maviş B, Gumusderelioglu M. Cellular behavior on epidermal growth factor (EGF)-immobilized PCL/gelatin nanofibrous scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed.* 22 (2011) 207–23.
30. Choi JS, Leong KW, Yoo HS. In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). *Biomaterials.* 29 (2008) 587–96.
31. Curtis ASG, Dolby M, Gadegaand N. Cell signaling arising from nanotopography:

- Implications for nanomedical devices. *Nanomedicine*. 1 (2006) 67–72.
32. Park S, Im G II. Stem cell responses to nanotopography. *J Biomed Mater Res - Part A*. 103 (2015) 1238–45.
  33. Turner LA, J. Dalby M. Nanotopography-potential relevance in the stem cell niche. *Biomater Sci*. 2 (2014) 1574–94.
  34. Gallagher JO, McGhee KF, Wilkinson CDW, Riehle MO. Interaction of animal cells with ordered nanotopography. *IEEE Trans Nanobioscience*. 1 (2002) 24–8.
  35. Kulangara K, Yang Y, Yang J, Leong KW. Nanotopography as modulator of human mesenchymal stem cell function. *Biomaterials*. 33 (2012) 4998–5003.
  36. Chen Z, Bachhuka A, Wei F, Wang X, Liu G, Vasilev K, et al. Nanotopography-based strategy for the precise manipulation of osteoimmunomodulation in bone regeneration. *Nanoscale*. 9 (2017) 18129–52.
  37. Thapa A, Miller DC, Webster TJ, Haberstroh KM. Nano-structured polymers enhance bladder smooth muscle cell function. *Biomaterials*. 24 (2003) 2915–26.
  38. Washburn NR, Yamada KM, Simon CG, Kennedy SB, Amis EJ. High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: Influence of nanometer-scale roughness on proliferation. *Biomaterials*. 25 (2004) 1215–24.
  39. Gu HY, Chen Z, Sa RX, Yuan SS, Chen HY, Ding YT, et al. The immobilization of hepatocytes on 24 nm-sized gold colloid for enhanced hepatocytes proliferation. *Biomaterials*. 25 (2004) 3445–51.
  40. Yim EKF, Reano RM, Pang SW, Yee AF, Chen CS, Leong KW. Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells. *Biomaterials*. 26 (2005) 5405–13.
  41. Clark P, Connolly P, Curtis ASG, Dow JAT, Wilkinson CDW. Cell guidance by ultrafine topography in vitro. *J Cell Sci*. 99 (1991) 73–7.
  42. Dalby MJ, Riehle MO, Yarwood SJ, Wilkinson CDW, Curtis ASG. Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: Response to a micro-grooved topography. *Exp Cell Res*. 284 (2003) 272–80.
  43. Xu G, Blum FD. Surfactant-enhanced free radical polymerization of styrene in emulsion gels. *Polymer*. 49 (2008) 3233–3238.
  44. Jung YC, Bhushan B. Contact angle, adhesion and friction properties of micro-and nanopatterned polymers for superhydrophobicity. *Nanotechnology*. 17 (2006) 4970–80.
  45. Smith LA, Liu X, Ma PX. Tissue engineering with nano-fibrous scaffolds. *Soft Matter*. 4 (2008) 2144–9.
  46. Khajavi R, Abbasipour M. Electrospinning as a versatile method for fabricating coreshell, hollow and porous nanofibers. *Sci Iran*. 19 (2012) 2029–34.
  47. Yasin H, Mousa HM, Abd El-sadek MS, Abdel-Jaber GT. Membrane Technology for Groundwater Purification : A review. *SVU-International J Eng Sci Appl*. 1 (2020) 8–21.
  48. Megelski S, Stephens JS, Bruce Chase D, Rabolt JF. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules*. 35 (2002) 8456–66.
  49. Ye XY, Lin FW, Huang XJ, Liang HQ, Xu ZK. Polymer fibers with hierarchically

- porous structure: Combination of high temperature electrospinning and thermally induced phase separation. *RSC Adv.* 33 (2013) 13851–8.
50. Roh IJ, Ramaswamy S, Krantz WB, Greenberg AR. Poly(ethylene chlorotrifluoroethylene) membrane formation via thermally induced phase separation (TIPS). *J Memb Sci.* 362 (2010) 211–20.
  51. Rezabeigi E, Demarquette NR, Rezabeigi E, Demarquette NR. Ultraporous Membranes Electrospun from Nonsolvent-Induced Phase-Separated Ternary Systems. *Macromol. Rapid Commun.* 40 (2019) 1800880.
  52. Rezabeigi E, Wood-Adams PM, Drew RAL. Isothermal ternary phase diagram of the polylactic acid-dichloromethane-hexane system. *Polymer.* 55 (2014) 3100–3106.
  53. Qi Z, Yu H, Chen Y, Zhu M. Highly porous fibers prepared by electrospinning a ternary system of nonsolvent/solvent/poly(L-lactic acid). *Mater Lett.* 63 (2008) 415–8.
  54. Schaub NJ, Britton T, Rajachar R, Gilbert RJ. Engineered Nanotopography on Electrospun PLLA Microfibers Modifies RAW 264.7 Cell Response. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 5 (2013) 10173–10184.
  55. Agyemang FO, Li F, Momade FWY, Kim H. Effect of poly(ethylene oxide) and water on electrospun poly(vinylidene fluoride) nanofibers with enhanced mechanical properties as pre-filter for oil-in-water filtration. *Materials Chemistry and Physics.* 182 (2016) 208–218.
  56. Huang CY, Hu KH, Wei ZH. Comparison of cell behavior on pva/pva-gelatin electrospun nanofibers with random and aligned configuration. *Sci Rep.* 6 (2016):1–8.
  57. Gao J, Song X, Huang X, Wang L, Li B, Xue H. Facile preparation of polymer microspheres and fibers with a hollow core and porous shell for oil adsorption and oil/water separation. *Applied Surface Science.* 439 (2018) 394–404.
  58. Fashandi H, Ghomi A. Interplay of Phase Separation and Physical Gelation in Morphology Evolution within Nanoporous Fibers Electrospun at High Humidity Atmosphere. *Ind. Eng. Chem. Res.* 54 (2015) 240–253.
  59. Sabetzadeh N, Gharehaghaji AA, Javanbakht M. Porous PAN micro/nanofiber separators for enhanced lithium-ion battery performance. *Solid State Ionics.* 325 (2018) 251–257.
  60. Casper CL, Stephens JS, Tassi NG, Chase DB, Rabolt JF. Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process. *Macromolecules* 37 (2004) 573-578.
  61. Fatt Leong M, Sin Chian K, Mhaisalkar PS, Feng Ong W, Ratner BD. Effect of electrospun poly(D,L-lactide) fibrous scaffold with nanoporous surface on attachment of porcine esophageal epithelial cells and protein adsorption. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 89 (2008) 1040-1048.
  62. Luo CJ, Nangrejo M, Edirisinghe M. A novel method of selecting solvents for polymer electrospinning. *Polymer (Guildf).* 51 (2010) 1654–1662.
  63. Li W-J, Tuli R, Okafor C, Derfoul A, Danielson KG, Hall DJ, et al. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human

- mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 26 (2005) 599–609.
64. Bhattarai SR, Bhattarai N, Yi HK, Hwang PH, Cha D Il, Kim HY. Novel biodegradable electrospun membrane: Scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*. 13 (2004) 2595–602.
  65. Fujihara K, Kotaki M, Ramakrishna S. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. *Biomaterials*. 19 (2005) 4139–47.
  66. Gadegaard N, Thoms S, Macintyre DS, Mcghee K, Gallagher J, Casey B, et al. Arrays of nano-dots for cellular engineering. *Microelectron Eng*. 67–68 (2003) 162–8.
  67. Kenawy ER, Layman JM, Watkins JR, Bowlin GL, Matthews JA, Simpson DG, et al. Electrospinning of poly(ethylene-co-vinyl alcohol) fibers. *Biomaterials*. 6 (2003) 907–13.
  68. Min BM, You Y, Kim JM, Lee SJ, Park WH. Formation of nanostructured poly(lactic-co-glycolic acid)/chitin matrix and its cellular response to normal human keratinocytes and fibroblasts. *Carbohydr Polym*. 57 (2004) 285–92.
  69. Shick TM, Abdul Kadir AZ, Ngadiman NHA, Ma'aram A. A review of biomaterials scaffold fabrication in additive manufacturing for tissue engineering. *J Bioact Compat Polym*. 34 (2019) 415–35.
  70. Arslan A, Poli(Bütülenadipat-ko-Tereftalat) (PBAT) Bazlı Doku İskeleleri: Sentez, Karakterizasyon ve Osteoblastik Aktivite, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2015.
  71. Khor HL, Ng KW, Htay AS, Schantz JT, Teoh SH, Hutmacher DW. Preliminary study of a polycaprolactone membrane utilized as epidermal substrate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 14 (2003) 113–20.
  72. Prabu P, Kim KW, Dharmaraj N, Park JH, Khil MS, Kim HY. Antimicrobial drug release scaffolds of natural and synthetic biodegradable polymers. *Macromol Res*. 16 (2008) 303–7.
  73. Ghobeira R, Asadian M, Vercruyssen C, Declercq H, De Geyter N, Morent R. Wide-ranging diameter scale of random and highly aligned PCL fibers electrospun using controlled working parameters. *Polymer*. 157 (2018) 19–31.
  74. Ghobeira R, De Geyter N, Morent R. Plasma surface functionalization of biodegradable electrospun scaffolds for tissue engineering applications. *Biodegrad Polym Recent Dev New Perspect*. (2017) 191–236.
  75. Liu Tsang V, Bhatia SN. Three-dimensional tissue fabrication. *Adv Drug Deliv Rev*. 56 (2004) 1635–47.
  76. Cho Y Il, Choi JS, Jeong SY, Yoo HS. Nerve growth factor (NGF)-conjugated electrospun nanostructures with topographical cues for neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Biomate*. 6 (2010) 4725–33.
  77. Ma Z, Ph D, Kotaki M, Ph D, Inai R. Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds. *Tissue Eng*. 11 (2005) 101–9.
  78. Venugopal J, Ma LL, Ramakrishna S. Biocompatible nanofiber matrices for the engineering of a dermal substitute for skin regeneration. *Tissue Eng*. 11 (2005) 847–54.

79. Van Der Schueren L, De Schoenmaker B, Kalaoglu ÖI, De Clerck K. An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone. *Eur Polym J.* 47 (2011) 1256–63.
80. Suwantong O. Biomedical applications of electrospun polycaprolactone fiber mats. *Polym. Adv. Technol.* 27 (2016) 1264–1273.
81. Katsogiannis KAG, Vladislavljević GT, Georgiadou S. Porous electrospun polycaprolactone fibers: Effect of process parameters. *J Polym Sci Part B Polym Phys.* 54 (2016) 1878–88.
82. Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials.* 29 (2008) 1989–2006.
83. Yang Y, Centrone A, Chen L, Simeon F, Alan Hatton T, Rutledge GC. Highly porous electrospun polyvinylidene fluoride (PVDF)-based carbon fiber. *Carbon N Y.* 49 (2011) 3395–403.
84. Huang C, Thomas NL. Fabricating porous poly(lactic acid) fibres via electrospinning. *European Polymer Journal* 99 (2018) 464–476.
85. Dalkıranoğlu S, EGF ile Desteklenmiş PCL/Kollajen Bazlı Nanofibröz Doku İskeleleri ile Deri Doku Mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2011.
86. Kaya A, Nanolifli Yüzeylerde Polimer Yapısındaki Değişimlerin Mekanik ve Isıl Özelliklere Etkisinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 2018.
87. Lee SJ, Kim HJ, Heo M, Lee HR, Choi EJ, Kim H, et al. In vitro and in vivo assessments of an optimal polyblend composition of polycaprolactone/gelatin nanofibrous scaffolds for Achilles tendon tissue engineering. *J Ind Eng Chem.* 76 (2019) 173–80.
88. Castilla-Cortázar I, Vidaurre A, Marí B, Campillo-Fernández AJ. Morphology, crystallinity, and molecular weight of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/graphene oxide hybrids. *Polymers.* 11 (2019) 1099.
89. Yang Z, Peng H, Wang W, Liu T. Crystallization behavior of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/layered double hydroxide nanocomposites. *J Appl Polym Sci.* 116 (2010) 2658–67.
90. Liu J, Lin DY, Wei B, Martin DC. Single electrospun PLLA and PCL polymer nanofibers: Increased molecular orientation with decreased fiber diameter. *Polymer.* 118 (2017) 143–149.
91. Kaya FB, Mikro/Nanotopografik PCL Membranların Hazırlanması ve Antibakteriyal/Hüresel Özelliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2011.
92. Prabu P, Kim KW, Dharmaraj N, Park JH, Khil MS, Kim HY. Antimicrobial Drug Release Scaffolds of Natural and Synthetic Biodegradable Polymers. *Macromolecular Research.* 16 (2008) 303–307.
93. Gümüşderelioglu M, Betül Kaya F, Beşkardeş IG. Comparison of epithelial and fibroblastic cell behavior on nano/micro-topographic PCL membranes produced by crystallinity control. *J Colloid Interface Sci.* 358 (2011) 444–53.
94. Woo HJ, Majid SR, Arof AK. Effect of ethylene carbonate on proton conducting

- polymer electrolyte based on poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL). *Solid State Ionics*. 252 (2013) 102–8.
95. Fonseca CP, Rosa DS, Gaboardi F, Neves S. Development of a biodegradable polymer electrolyte for rechargeable batteries. *J Power Sources*. 155 (2006) 381–4.
  96. Li G, Sankaran A, Yarin AL, Pourdeyhimi B. Hydroentangled polymer nonwovens: Prediction of jet streaks and surface roughness. *Polymer*. 180 (2019) 121731.
  97. Sun W, Giusca C, Lou S, Yang X, Chen X, Fry T, Jiang X, Wilson A, Brown S, Boulter H. Establishment of X-ray computed tomography traceability for additively manufactured surface texture evaluation. *Additive Manufacturing*. 50 (2021) 102558.
  98. Sadeghi P, Tavanai H, Khoddami A. Hydrophobicity of fluorocarbon-finished electrospun poly (acrylonitrile) nanofibrous webs. *J Text Inst*. 108 (2017) 189–95.
  99. Bhushan B, Jung YC. Wetting, adhesion and friction of superhydrophobic and hydrophilic leaves and fabricated micro/nanopatterned surfaces. *J Phys Condens Matter*. 20 (2008) 225010.
  100. Zhan N, Li Y, Zhang C, Song Y, Wang H, Sun L, et al. A novel multinozzle electrospinning process for preparing superhydrophobic PS films with controllable bead-on-string/microfiber morphology. *J Colloid Interface Sci*. 345 (2010) 491–5.
  101. Joddar B, Ito Y. Biological modifications of materials surfaces with proteins for regenerative medicine. *J Mater Chem*. 21 (2011) 13737–55.
  102. Diaz-Gomez L, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Silva M, Dominguez F, Sheikh FA, et al. Biodegradable electrospun nanofibers coated with platelet-rich plasma for cell adhesion and proliferation. *Mater Sci Eng C*. 40 (2014) 180–8.
  103. Sharifi F, Irani S, Zandi M, Soleimani M, Atyabi SM. Comparative of fibroblast and osteoblast cells adhesion on surface modified nanofibrous substrates based on polycaprolactone. *Prog Biomater*. 5 (2016) 213–22.
  104. Yu D, Wang J, Qian K jia, Yu J, Zhu H yong. Effects of nanofibers on mesenchymal stem cells: environmental factors affecting cell adhesion and osteogenic differentiation and their mechanisms. *J Zhejiang Univ Sci B*. 21 (2020) 871–84.
  105. Elosegui-Artola A, Andreu I, Beedle AEM, Lezamiz A, Uroz M, Kosmalska AJ, et al. Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell*. 171 (2017) 1397-1410.