

**NANOFİBRİLER YAPIDA BİYOPOLİMERİK DOKU
İSKELELERİNİN HAZIRLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF
BIOPOLYMERIC SCAFFOLDS IN NANOFIBRILLAR
STRUCTURE**

ZEYNEP KARAHALİLOĞLU

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Ana Bilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

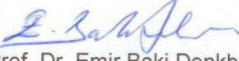
olarak hazırlanmıştır.

2009

ANKARA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan (Danışman) : 
Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

Üye : 
Prof. Dr. Mehmet Ali Onur

Üye : 
Prof. Dr. Üner Çolak

Üye : 
Yrd. Doç. Dr. Mesut Şam

Üye : 
Dr. Eylem Öztürk Güven

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Erdem YAZGAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

NANOFİBRİLER YAPIDA BİYOPOLİMERİK DOKU İSKELELERİNİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

ZEYNEP KARAHALİLOĞLU

Öz

Doku mühendisliği, hasarlı doku onarımı ve rejenerasyonu amacıyla dokuya fonksiyonelliğini tekrar kazandırmak için kimya, mühendislik ve biyoloji prensiplerini birleştiren multidisipliner bir alandır. Doku mühendisliğinin bileşenleri, rejenerasyonun olması beklenen dokuya özgü hücreler, hücrelerin üzerinde büyüyeceği yapay bir ekstraselüler matriks olan polimerik doku iskelesi, hücrelerin doğal ortamlarındaki mekanik kuvveti simüle eden biyoreaktörler ve biyosinyal molekülleridir. Bu bileşenlerin en önemlisi doku iskelesidir. Doku iskelesi doku bütünleşmesine ve vaskülarizasyonuna izin verecek birbiriyle bağlantılı por yapısına, istenen hücrelerin yapışması, büyümesi ve farklılaşması için uygun yüzey kimyasına, implantasyon bölgesine uygun mekanik özelliklere, doku oluşumuna paralel bir şekilde degrade olabilme ve kolay üretilebilme özelliğine sahip olmalıdır. Bu açıdan bakıldığında nanofiberler yüksek yüzey alan/hacim oranı ve birbirleri ile bağlantılı, gayet güzel bir por yapısına sahiptir. Bu özellikler ileri doku mühendisliği uygulamaları için, polimerin yüzey kimyasını ve fonksiyonelliğini olumlu yönde değiştirerek, hücre yapışması, proliferasyonu, göçü ve farklılaşması açısından nanofiberleri ayrıcalıklı hale getirir. Nanofiberler kas, kemik, kıkırdak, ligament, iskelet-kas, deri, vasküler sistem, nöral doku mühendisliğinde; protein ve DNA taşıyıcısı olarak aynı zamanda kontrollü ilaç salımı için de kullanılabilir.

Doku mühendisliğinde doku iskelesi materyali olarak doğal ve sentetik polimerler, seramikler, metaller ve bu materyallerin kombinasyonları kullanılmaktadır. Polihidroksialkanoatlar (PHA) biyoyumluluk ve biyodegradasyon özellikleriyle doku iskelesi materyali olarak iyi bir alternatiftir. PHB ise polihidroksialkanoat ailesinin bir üyesi olarak in- vitro ve in-vivo çalışmalarda sıklıkla kullanılan eşsiz özelliklere sahip bir biyomateryaldir.

Sunulan çalışma kapsamında; öncelikle doku iskelesi hazırlanmasında kullanılacak olan bakteriyel polyesterler üretildi ve saflaştırıldı. Bu aşamada bakteriyel polyesterlerin hazırlanmasında “*Alcaligenes eutrophus*” adlı mikroorganizma hattı kullanıldı. Elde edilen polimerin molekül yapısı NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) kullanılarak karakterize edildi.

Çalışmanın sonraki aşamasında ticari ve bakteriyel PHB kullanılarak karşılaştırmalı olarak dondurularak kurutma ve elektrospinning yöntemi ile doku iskeleleri hazırlandı. Hazırlanan doku iskeleleri modifiye edildikten sonra fizikokimyasal testler (mekanik test cihazı) yapıldı. Morfolojik yapısının incelenmesi için SEM ve optik mikroskoptan faydalanıldı. Ayrıca hazırlanan doku iskelelerinin biyolojik uyumluluğu (direkt ve indirekt yöntemler) mesane kanser hücresi kullanılarak test edildi.

Anahtar Sözcükler: PHB, doku iskelesi, nanofiber, elektrospinning

Danışman: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BIOPOLYMERIC SCAFFOLDS IN NANOFIBRILLAR STRUCTURE

ZEYNEP KARAHALİLOĞLU

Abstract

Tissue engineering is a multidisciplinary field which combines chemistry, engineering and biology principles with the aim of tissue repair and regeneration. Components of tissue engineering include; cells of tissue to be regenerated, polymeric scaffold, an artificial extracellular matrix to host cells, bioreactors which simulate mechanical forces of cells in their native medium and biosignal molecules. Scaffold is the most important component among others. A scaffold must have properties such as interconnected pore structure which allows vascularization, suitable surface chemistry which allows attachment, proliferation and differentiation of cells, mechanical properties which are suitable for implantation site, biodegradation properties which is appropriate with tissue regeneration and easy fabrication. In this respect, nanofibers have high surface/volume ratio and suitable pore structure. These properties make nanofibers special for cell attachment, proliferation, migration and differentiation for advanced tissue engineering applications. Nanofibers can be used for muscle, bone, cartilage, skeleton-muscle, skin, vascular system, neural tissue engineering, as protein and DNA carriers as well as controlled drug release.

Natural and synthetic polymers, ceramics, metals and combination of these materials are used for the preparation of tissue engineering scaffolds. Polyhydroxyalkanoates (PHA) are good alternatives for the preparation of scaffolds due to their biocompatibility and biodegradation. Polyhydroxybutyrate (PHB) which is widely used for *in vitro-in vivo* studies and has unique properties is a member of polyhydroxyalkanoate family.

In this presented study; firstly bacterial polyesters which was used for the preparation of scaffolds were produced and purified. "*Alcaligenes eutrophus*" was

used for the production of bacterial polyesters. Molecular structure of obtained polymer was determined by using nuclear magnetic resonance (NMR).

Next, scaffolds were prepared from commercial and bacterial PHB by using freeze-drying and electrospinning methods. After modification of prepared scaffolds physicochemical tests (mechanical test instrument) were performed. For the investigation of morphological structure scanning electron microscopy (SEM) and optical microscope were used. Biocompatibility of prepared scaffolds were tested by using bladder cancer cells.

Keywords: PHB, scaffold, nanofiber, electrospinning

Advisor: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ, Hacettepe University, Chemistry Department, Biochemistry Division.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında bana yol gösteren; akademik ve sosyal anlamda maddi, manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş'a; çalışma ortamında bile bir aile olmamızı sağlayan değerli eşi ve çocuklarına,

Desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocam, sayın rektörüm Prof. Dr. Necdet Sağlam'a,

Çalışmalarım sırasında bir an bile yardımını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle daha başarılı olmamda payı bulunan Murat Demirbilek'e ve eşi Melike Erol Demirbilek'e,

Tez çalışmamda fikirleri ve önerileriyle bana yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet Ali Onur, Prof. Dr. Üner Çolak, Yrd. Doç Dr. Mesut Şam, Dr. Eylem Öztürk Güven'e,

Lisans eğitiminden sonra yüksek lisansta da beraber yola çıktığımız sevgili arkadaşım Ebru Erdal'a, çalışmalarım sırasında verdiği moralle beni yalnız bırakmayan Öznur Özsoy'a,

Birlikte çalışırken aynı zamanda aile olmanın da tadını yaşatan Biyopolimerik Sistemler Araştırma Grubu üyeleri, Cem Bayram, Tamer Çırak, Burcu Aslan, Osman Kazak, Doğa Kavaz, Tayfun Vural, Betül Bozdoğan Pala, Merve Gültekinöglü, Funda Budak' a;

Çalışmalarım sırasında büyük katkıları olan Doç. Dr. Ahmet Çabuk ve öğrencileri Pınar, Gökhan'a; Vedat Mutlu, Pervin Dağ, Koray Mızrak, Damla Türkay, Soner Çakmak, Anıl Sera Kahraman'a,

Onu tanımaktan ve hayatımda bir dost olarak yer almasından büyük mutluluk duyduğum Songül Durak'a,

Hayatımın her anında sevgi, sabır ve güvenleriyle beni destekleyen değerli aileme sonsuz teşekkürler...İyi ki varsınız☺

İÇİNDEKİLER DİZİNİ**Sayfa No**

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Doku Mühendisliği Nedir?.....	3
2.2. Doku İskelesi Tanımı ve Özellikleri.....	5
2.3. Doku İskelesi Materyalleri.....	7
2.4. Mikroporöz Doku İskelesi Fabrikasyonu	8
2.5. Doku İskelesi Yüzey Modifikasyonu	9
2.5.1 Plazma Modifikasyonu.....	11
2.6. Nanoteknoloji Nedir?	12
2.6.1. Doku Mühendisliğinde Nanoteknoloji.....	13
2.7. Nanofiber Tanımı.....	13
2.7.1 Nanofiber Üretiminde Kullanılan Polimerler.....	14
2.7.2 Mikro-nanofiber Fabrikasyon Yöntemleri	15
2.7.2.1. Self-assembly	15
2.7.2.2 Faz Separasyonu	17
2.7.2.3. Elektrospinning Yöntemi ile Nanofiber Üretimi	18
2.7.2.4 Elektrospin Parametreleri	20
2.7.2.4.1 Solüsyon Parametreleri	21
2.7.2.4.2. Proses Parametreleri.....	24
2.7.2.4.3. Çevresel Parametreler.....	26
2.8. Nanofiber Uygulama Alanları.....	28
2.8.1 Doku Mühendisliğinde Nanofiber Uygulama Alanları	28
2.9. Polihidroksialkanoatlar(PHA).....	29

2.9.1. PHB (Poli-3-hidroksibitürat)	32
2.10. Doku Mühendisliğinde PHA.....	34
2.11. Nanofiber Üretiminde PHB	35
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	36
3.1. Kimyasallar	36
3.2 PHB (Poli-3-hidroksibitürat) Sentezi	36
3.3. PHB (Poli-3-hidroksibitürat) Karakterizasyonu	39
3.4. Geleneksel Doku İskelelerinin Hazırlanması	39
3.5. Nanofibriler Yapıların Hazırlanması.....	40
3.6. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi	41
3.7. Doku İskelelerinin Yüzey Modifikasyonu	42
3.8. Mekanik Testler	43
3.9. Biyolojik Uyum Testleri	43
3.9.1 Mesane Epitel Hücrelerinin İzolasyonu.....	43
3.9.2. Hücrelerin Hazırlanması	46
3.9.3. Sitotoksikite Testi (MTT).....	46
3.9.4. Hücre Çoğalma Oranı Testi.....	47
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMALAR	49
4.1. Bakteriyel Esaslı PHB Polimerinin Sentezi	49
4.1.1. Bakteriyel Esaslı PHB Polimerinin Karakterizasyonu	49
4.2. Ticari PHB'den Doku İskelesi Hazırlanması	52
4.2.1. Dondurarak Kurutma Yöntemiyle Doku İskelesi Hazırlanması	52
4.2.2. Nanofibriler Yapıda Doku İskelelerinin Hazırlanması	53
4.3. Ticari PHB'den Hazırlanan Nanofibriler Doku İskelelerinin Mekanik Dayanıklılığı	62
4.4. Ticari PHB'den Hazırlanan Doku İskelelerinin Biyouyumluluk Testleri ..	63
4.4.1. Dondurarak Kurutma Yöntemiyle Hazırlanan Doku İskelelerinin Sitotoksikitesi (MTT).....	63
4.4.2. Nanofibriler Yapıda Hazırlanan Doku İskelelerinin Sitotoksikitesi.....	64
4.4.3. Dondurarak Kurutma ve Elektrospinning Yöntemiyle Hazırlanan Doku İskelelerinde Hücre Çoğalma Oranı	65
4.5. Bakteriyel PHB'den Doku İskelesi Hazırlanması	69
4.5.1. Dondurarak Kurutma Yöntemiyle Doku İskelesi Hazırlanması	69
4.5.2. Nanofibriler Yapıda Doku İskeleleri Hazırlanması	69

4.6. Bakteriyel PHB'den Hazırlanan Nanofibriler Doku İskelelerinin Mekanik Dayanıklılığı.....	71
4.7. Bakteriyel PHB'den Hazırlanan Doku İskelelerinin Biyouyumluluk Testleri	72
4.7.1. Dondurarak Kurutma Yöntemiyle Hazırlanan Doku İskelelerinin Sitotoksitesisi (MTT).....	72
4.7.2. Nanofibriler Yapıda Hazırlanan Doku İskelelerinin Sitotoksitesisi (MTT).....	73
4.7.3. Dondurarak Kurutma ve Elektrosponning Yöntemiyle Hazırlanan Doku İskelelerinde Hücre Çoğalma Oranı	74
5. SONUÇLAR	77
6. YARARLANILAN KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Doku mühendisliği bileşenleri	4
Şekil 2.2 Doku mühendisliğinin temel konsepti.....	5
Şekil 2.3. Plazma reaktörü ile plazma yüzey modifikasyonunun şeması.....	11
Şekil 2.4. Nanofiber ile insan saçının karşılaştırılması.	12
Şekil 2.5. Self-assembly nanofiber oluşumu.....	16
Şekil 2.6. Faz separasyonu ile nanoyapıların üretimi	18
Şekil 2.7. Kılcal Boru Ucundaki Damlanın İlerleyerek Artan Voltaj Etkisiyle Taylor Konisi ve Jet Oluşumu.....	20
Şekil 2.8. Elektrospın parametreleri.....	21
Şekil 2.9. Polimer konsantrasyonunun fiber oluşumuna etkisi.....	22
Şekil 2.10. Farklı polimer konsantrasyonlarında boncuksu yapılı elektrospın nanofiberlerin SEM görüntüleri.....	23
Şekil 2.11. Uygulanan voltajın fibere etkisi	24
Şekil 2.12. Farklı voltaj değerlerinin Taylor koni formasyonunda etkisi	25
Şekil 2.13. Doku iskelesi yapısının hücre yapışması ve çoğalması üzerindeki etkisi.....	28
Şekil 2.14. Polihidroksialkanoatların (PHA) genel yapısı.....	30
Şekil 3.1. Geleneksel PHB doku iskelesi hazırlama basamakları.....	40
Şekil 3.2. Nanofibriler PHB doku iskelesi hazırlanmasında kullanılan düzenek.....	41
Şekil 3.3. Basit bir elektrospın düzeneği.....	41
Şekil 3.4. Plazma polimerizasyon sisteminin şematik gösterimi	42
Şekil 3.5. İzole edilmiş mesane epitel hücreleri.....	44

Şekil 3.6. Hematoksilen-eozin ile boyanmış mesane epitel hücreleri	45
Şekil 3.7. Kültüre edilen mesane epitel hücreleri.....	45
Şekil 4.1. PHB moleküler yapısı	49
Şekil 4.2. Ticari PHB (polihidroksibütirat) ¹ H-NMR spektrumu	50
Şekil 4.3. Sentezlenen PHB (polihidroksibütirat) polimerinin ¹ H-NMR spektrumu.....	51
Şekil 4.4. Dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanan doku iskeleleri.....	52
Şekil 4.5. %3 polimer konsantrasyonunda PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü	52
Şekil 4.6. %3 polimer konsantrasyonunda PHB doku iskelesinin SEM görüntüsü a) yandan b) yüzeyden	53
Şekil 4.7. %7 polimer konsantrasyonunda, %100 CHCl ₃ , 0,5 ml/dk, 20 cm, 15kV parametrelerinde elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü.....	54
Şekil 4.8. %5 polimer konsantrasyonunda, %100 CHCl ₃ , 0,5 ml/dk, 20cm, 17kV parametrelerinde elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü.....	55
Şekil 4.9. %5 polimer konsantrasyonunda, 15 kV, 0,7 ml/dk, 20 cm, %20 DMF/%80 CHCl ₃ parametrelerinde elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü.....	57
Şekil 4.10. %5 polimer konsantrasyonunda, 21 kV, 12 ml/sa, 20 cm, %5 DMF/%95 CHCl ₃ parametrelerinde elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü.....	58
Şekil 4.11. %5 polimer konsantrasyonunda, 17 kV, 20 ml/sa, 15 cm, %25 CHCl ₃ /%75 etanol parametrelerinde elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü	60
Şekil 4.12. % 5 polimer konsantrasyonunda, 9 kV, 20 ml/sa, 20 cm, %35 etanol/%65 CHCl ₃ parametrelerinde elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü	61

Şekil 4.13. Ticari PHB'den Hazırlanan Nanofibriler Doku İskelelerinin çekme-uzama grafiği	62
Şekil 4.14. Hücre yapışmış modifiye edilmemiş geleneksel PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü	66
Şekil 4.15. Hücre yapışmış EDA ile modifiye edilmiş geleneksel PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü	67
Şekil 4.16. Hücre yapışmış PEG ile modifiye edilmiş geleneksel PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü	67
Şekil 4.17. Hücre yapışmış ticari PHB nanofibriler doku iskelesinin SEM görüntüsü.....	68
Şekil 4.18. Geleneksel yöntemle hazırlanan bakteriyel doku iskeleleri.....	69
Şekil 4.19. Bakteriyel geleneksel PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü	69
Şekil 4.20. %5 polimer konsantrasyonunda,17 kV, 20 ml/sa, 15 cm %25 etanol/%75 CHCl ₃ parametrelerinde elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü	70
Şekil 4.21. Bakteriyel PHB'den Hazırlanan Nanofibriler Doku İskelelerinin çekme-uzama grafiği	71
Şekil 4.22. Hücre yapışmış modifiye edilmemiş geleneksel bakteriyel PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü	75
Şekil 4.23. Hücre yapışmış EDA ile modifiye edilmiş geleneksel bakteriyel PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü	75
Şekil 4.24. Hücre yapışmış PEG ile modifiye edilmiş geleneksel bakteriyel PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü	76
Şekil 4.25. Hücre yapışmış bakteriyel PHB nanofibriler doku iskelesinin SEM görüntüsü	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Doku mühendisliğine yönelik, doku iskelesi olarak ideal yapısal parametreler	6
Çizelge 2.2. Biyomedikal uygulamalar için onaylanmış bazı biyobozunur polimerler.....	7
Çizelge 2.3. Farklı metotlarla üretilen polimerik doku iskelesi özellikleri.....	9
Çizelge 2.4. Biyomateryallere farklı yüzey özellikleri kazandırmak için yüzey modifikasyon teknikleri	10
Çizelge 2.5. Nanofiber üretim yöntemlerinin karşılaştırılması.....	15
Çizelge 2.6. Elektrospin solüsyon ve proses parametreleri.....	27
Çizelge 2.7. PHA biriktiren bakteri cinsleri.....	32
Çizelge 2.8. Poli (3HB) Özellikleri.....	34
Çizelge 3.1. <i>Alcaligenes eutrophus</i> için zenginleştirilmiş besiyeri	37
Çizelge 3.2. <i>Alcaligenes eutrophus</i> için polimer ortamı	37
Çizelge 3.3. Eser element çözeltisi.....	38
Çizelge 3.4. Mesane epitel hücrelerinin hücre kültür ortamında çoğaltılması	46
Çizelge 4.1. Modifiye edilmiş (EDA-PEG) ve modifiye edilmemiş dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan ticari PHB doku iskelelerinin mesane epitel hücreleri üzerine etkileri.....	63
Çizelge 4.2. Modifiye edilmiş (EDA-PEG) ve modifiye edilmemiş nanofibriler ticari PHB doku iskelelerinin mesane epitel hücreleri üzerine etkileri	64
Çizelge 4.3. Mesane epitel hücreleri ile etkileştirilen ticari geleneksel ve	

nanofibriler doku iskelelerinin hücre çoğalma oranına etkisi	65
Çizelge 4.4. Modifiye edilmiş (EDA-PEG) ve modifiye edilmemiş dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan bakteriyel PHB doku iskelelerinin mesane epitel hücreleri üzerine etkileri	72
Çizelge 4.5. Modifiye edilmiş (EDA-PEG) ve modifiye edilmemiş nanofibriler bakteriyel PHB doku iskelelerinin mesane epitel hücreleri üzerine etkileri ...	73
Çizelge 4.6. Mesane epitel hücreleri ile etkileştirilen bakteriyel geleneksel ve nanofibriler doku iskelelerinin hücre çoğalma oranına etkisi	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PHA	-	Polihidroksialkanoat
PHB	-	Poli(3-hidroksibütirat)
EDA	-	Etilendiamin
PEG	-	Polietilenglikol
DMF	-	Dimetilformamid
SEM	-	Taramalı Elektron Mikroskobu
¹ H-NMR	-	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
CHCl ₃	-	Kloroform
NMR	-	Nükleer Manyetik Rezonans
RFGD	-	Radyo Frekans Yük Boşalımı
ELISA	-	Enzim Bağlı İmmunolojik Ölçüm

1. GİRİŞ

Yaralanma ya da çeşitli hastalıklara bağlı organ yetmezlikleri/kaybı insanoğlunun yaşamını tehdit eden unsurların başında gelmektedir. Doku rejenarasyonu açısından otolog hücre/doku transplantasyonu en umut vaat eden tekniklerden biridir. Ancak otogreftlerin donör bölgede morbiditeye neden olması ve istenilen miktarda bulunmaması gibi dezavantajlardan dolayı otogreftlere alternatif olarak allogreftler ortaya çıkmıştır. Allogreftler ise tedarik edilmesindeki kısıtlamalar, hastalık taşıyıcısı olabileceği riski ve immun cevap oluşturmaları nedeniyle tercih edilmemektedir. Hasarlı dokunun onarımı ve rejenerasyonu için otolog ve allojenik doku onarımındaki kısıtlamaları ortadan kaldıracak "doku mühendisliği" yaklaşımı ortaya çıkmıştır (Vasita, 2006).

Doku mühendisliği yaklaşımında genel olarak hastadan sağlıklı hücreler alınıp in-vitro koşullarda büyütülür. Büyüme faktörü gibi biyoaktif molekülleri barındıracak üç boyutlu biyobozunur doku iskelesi aynı zamanda hücreler için yapısal bir destek görevi görerek doku oluşumuna yardımcı olur. Zamanla bozulan doku iskelesi yerine geçen yeni doku, hastadaki hasarlı bölgeye implante edilir. Bu süreçte en önemli bileşen, yeni doku oluşumunu sağlayacak bir destek malzemesi olan doku iskelesidir.

Ekstraselüler matriksin temsilcisi olarak bir doku iskelesi genel olarak üç boyutlu bir geometriye, uygun mekanik özelliklere, hücre yapışması ve fonksiyonel doku oluşumuna olanak tanınmalıdır. Mikroskopik açıdan yüksek porozite, besinlerin ve atık ürünlerin doku iskelesi boyunca difüzyonu için gereklidir. Doku iskelesi yüzey yapısı ve kimyası da hücre göçüne izin verecek nitelikte olmalıdır. Son olarak doku iskelesinin degradasyon ürünleri hücreler üzerinde toksik etki oluşturmamalıdır (Laurencin, 2008).

Poröz doku iskelesi fabrikasyonunda membran laminasyonu, çözücü dökümü, partikül uzaklaştırma, faz separasyonu, gaz köpükleştirme, eriyik kalıplama gibi birçok teknik geliştirilmiştir (Ikada, 2006). Bu tekniklerin temel kısıtlaması por boyutu, biçimi, dağılımı ve porlar arası bağlantı gibi doku iskelesi özelliklerinin kesin bir

şekilde belirlenememesidir. Doku iskelesi üzerine bir hücrenin yapışma ve çoğalmasında por boyutu önemlidir. Son zamanlarda doku mühendisliğine yönelik olarak nanofiber bazlı doku iskeleleri keşfedilmiştir (Ma ve Zhang, 1999; Ksiday ve arkadaşları, 2002; Li ve arkadaşları, 2002). Nano boyuttaki insan dokusunu taklit etmesi açısından büyük potansiyele sahip olan nanofiberlerin geliştirilmesi doku iskelesi fabrikasyonu açısından önemli hale gelmiştir. Elektrospin doku iskeleleri yüksek yüzey alanı/hacim oranı ile hücre yapışması, ilaç yüklenmesi ve kütle transfer özelliklerini iyileştirebilir. Elektrospin fiberler, doku iskelesinin biyolojik cevabını ve yığın mekanik özelliklerini düzenlenmeleri sayesinde kontrol edebilirler. Farklı materyaller; biyobozunur, biyobozunur olmayan ve doğal polimerler elektrospinlenebilirler (Travis, 2008).

Doku mühendisliğinde kullanılması için bir polimerik malzemenin 5 anahtar özelliğe sahip olması gerekmektedir; biyouyumluluk, hücre büyümesini destekleme, hücreleri organize etme ve yönlendirme, doku oluşumuna izin verme ve son olarak toksik olmayan ürünlere parçalanabilme. Polihidroksialkanoatlar sözü edilen özelliklere sahip olmalarından dolayı doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilen malzemelerdendir (Williams, 1999).

Sunulan çalışma kapsamında biyoparçalanabilir, yenilenebilir, biyouyumlu ve doğayla dost plastiklerin bakterilerde sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen polimer çeşitli yöntemlerle karakterize edildi. Ticari ve bakteri orjinli polimerlerden literatürdeki geleneksel PHB doku iskelesi (freeze drying) hazırlama yöntemi ve son yıllarda oldukça popüler hale gelen elektrospinning yöntemi ile nano boyutta fibriler doku iskeleleri hazırlandı. Hazırlanan doku iskelelerinin biyouyumluluğunu artırmak için çeşitli yöntemler kullanılarak yüzey modifikasyonu yapıldı. PHB yapısının ve doku iskelesi hazırlama yönteminin hücre ve doku büyümesi, farklılaşması üzerindeki etkisini karşılaştırmalı olarak görmek için biyouyumluluk testleri yapılarak matrikslerin uygunlukları gözden geçirildi.

2.1. Doku Mühendisliği Nedir?

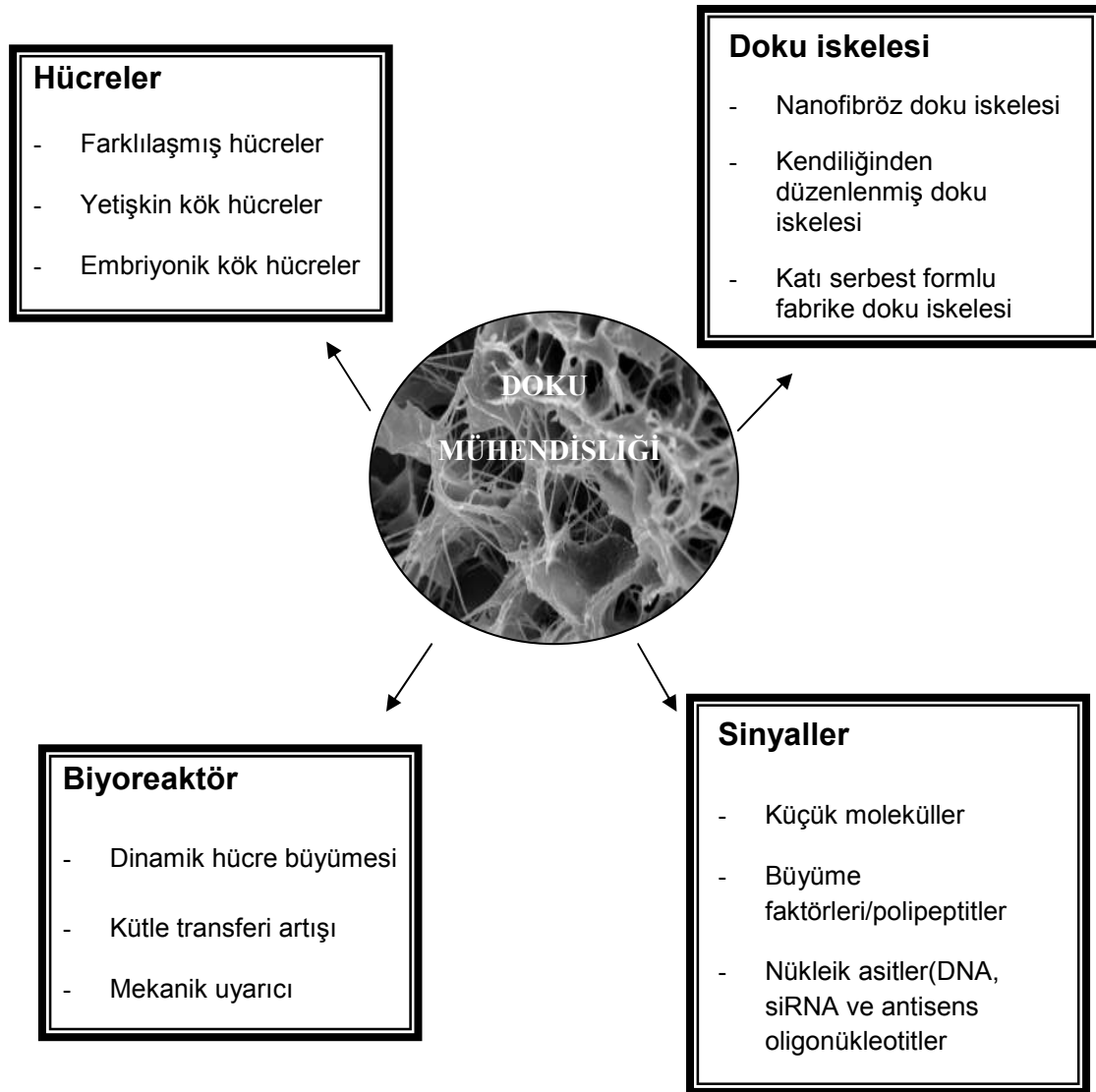
Doku ya da organ ağır bir şekilde yaralandığı zaman genelde organ ya da fonksiyon kaybı ile sonuçlanan durumlarda klinik olarak rekonstruktif cerrahi ya da organ transplantasyonu ile müdahale edilir (Ma, 2006). Uygun donör bulunmasındaki zorluklar nedeniyle yaralanma ya da bir hastalık sonucu oluşan doku kayıpları ya da son aşama olan organ kayıplarında hastaya organ veya doku transplantasyonu en önemli sağlık sorunu haline gelmiştir.

Doku onarımında geleneksel olarak 2 tedavi formu mevcuttur; 1) doku ya da organ transplantasyonu, 2) alloplastik ya da sentetik protezler. Günümüzde alternatif olarak kullanılan mekanik cihazlar ya da yapay protezler organ fonksiyonunu ve doku onarımını yerine getirememektedir. Ayrıca bu protezler ve mekanik aksamlar uzun vadeli implantasyon sırasında aşınmakta ve bireyde immun cevaba yol açabilmektedir. Bunun yanı sıra sürekli immun supresif ilaç tedavisi farklı viral enfeksiyon ve karsinogenez gibi yan etkilere neden olur. Bu yan etkilerden dolayı hasta dokusunun rejenerasyonunu indükleyen terapötik girişimler ve kendi iyileşme potansiyeli olan organlar kullanılmaya başlanmıştır. Doku mühendisliği, biyomedikal mühendislik ve teknoloji alanında yeni terapötik denemeler yapan araştırma ve geliştirme alanıdır. Doku mühendisliğinin amacı, doku rejenerasyonunu indükleyecek defektli doku ve organ kaybının biyolojik fonksiyonlarını karşılayacak hücrelerin manipüle edilmesidir (Ma ve Elisseeff, 2006).

İlk olarak doku mühendisliği terimi 1988'de NSF (National Science Foundation)'in sponsor olduğu toplantıda "doku ya da organ fonksiyonlarının onarımı ve rejenerasyonu için biyolojik yapıların geliştirilmesi; normal ve patolojik memeli dokularındaki yapı-fonksiyon ilişkisini anlamak üzere mühendislik ve yaşam bilimleri metod ve prensiplerinin uygulaması" olarak tanımlanmıştır (Skalak, 1988). 1993 yılında Langer ve Vacanti bu alandaki gelişmeleri kısaca özetlemiş ve doku mühendisliğini "Organ ve doku fonksiyonlarının iyileştirilmesi, korunması ve onarımını sağlayacak biyolojik yapıların geliştirilmesi üzerine mühendislik ve yaşam bilimleri prensiplerinin uygulanacağı interdisipliner bir alan" olarak tanımlamıştır (Langer ve Vacanti, 1993).

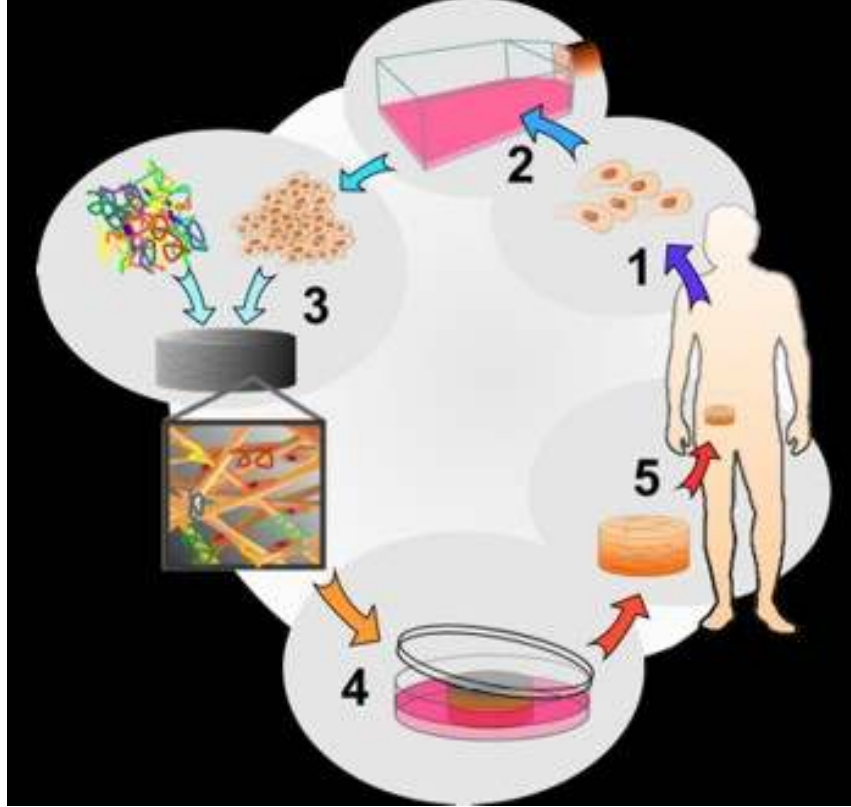
Doku mühendisliği, tıp, biyoloji, materyal bilimleri, mühendislik bilgilerini içeren interdisipliner bir alandır. Genel doku mühendisliği yaklaşımında doku iskelesi, hücre, biyosinyal molekülleri (hormonlar, sitokinler ve büyüme faktörleri) ve biyoreaktörler kullanılarak doku oluşumu amaçlanır (Şekil 2.1.).

Doku iskelesi, izole edilen hücrelerin istenilen dokuyu oluşturabilmeleri için uygun bir çevre sağlayan destek malzemeleridir. Biyosinyal molekülleri ise hücreler arasındaki iletişimi sağlayan peptit/proteinlerdir.



Şekil 2.1. Doku mühendisliği bileşenleri (Laurencin ve Nair, 2008).

Doku mühendisliği sürecinde hücreler donörden izole edildikten sonra doku iskelesi üzerine ekilir, istenen doku oluşumunu indükleyecek biyosinyal molekülleri de eklenir, gerçek dokudaki mekanik kuvveti simüle edecek biyoreaktörler içine yerleştirilerek doku oluşumu beklenir. Oluşturulan doku kişideki hasarlı bölgeye implante edilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Doku mühendisliğinin temel konsepti: 1) Hücrelerin alınması, 2) Hücre kültüründe sayılarının çoğaltılması, 3) Uygun büyüme faktörleri ve sitokinlerle birlikte uygun bir skafold içerisine ekim, 4) Kültür ortamına koyma, 5) İşlenmiş dokunun hasara göre bölgeye yeniden implantasyonu ([www. centropede.com](http://www.centropede.com))

2.2. Doku İskelesi Tanımı ve Özellikleri

Doku iskelesi hücrenin büyüme, çoğalma ve farklılaşması için bir taslak ya da ön bir destektir. Doku iskelesinin temel işlevi, çevre dokudan doku iskelesine göç eden ya da doku iskelesi üzerine ekilmiş hücrelerin büyümelerini yönlendirmektir. Hücreye yapısal bütünlüğünü sağlayan yapay bir ekstraselular matriks olarak da tanımlanabilir.

İdeal bir doku iskelesi birtakım özelliklere sahip olmalıdır;

- Hücre göçü için porozite
- Hücre yapışması için yüzey hidrofilitesi ve hidrofobitesi arasında denge
- Doğal yüklenme durumlarını kaldırabilecek doğal doku ile kıyaslanabilir mekanik özellikler
- İmplantasyondan sonra tamamen absorbe olabilecek degradasyon kapasitesi
- Non-toksik ürünler
- 3D matriks (Brown ve Stevens, 2007)

Çizelge 2.1. Doku mühendisliğine yönelik doku iskelesi olarak ideal yapısal parametreler (Edwards, 2004)

Doku iskelesi fonksiyonu	Doku iskelesi dizayn parametreleri
İn-vivoda toksisiteyi ya da inflamasyon cevabı yaratmamalı	Biyouyumlu, non-toksik ve non-karsinojenik
Üç boyutlu doku ve organ oluşumuna yardımcı	Üç boyutlu doku iskelesi yapısı
Uniform hücre yoğunluğuna izin vermeli	Porlar arasında yüksek porozite ve yüksek interkonnektivite
Hücre yapışması, çoğalması ve farklılaşması için uygun yüzey sağlamalı	Optimum polimer yüzey kimyası ve topografisi
Hücresel yapışma gibi hücre yüzey etkileşimlerine izin vermeli	Yüksek yüzey alanı-hacim oranı
Doku iskelesi boyunca doku büyümesine izin vermeli, hücrenin çoğalma ve göçünü hızlandırmalı	Porlar arasında yüksek porozite ve yüksek interkonnektivite ile birlikte hücre penetrasyonuna izin verecek optimum por büyüklüğü
Sadece doğal dokunun kalması için doku iskelesi degrade olabilmeli	Doku iskelesi degradasyon hızı yeni hücre oluşumuyla dengeli, degradasyon ürünleri toksik olmamalı ve in-vivoda inflamasyon yaratmamalı
İn-vivo güçlere dayanıklı ve gelişecek dokunun büyümesi için yeterli mekanik dayanıklılık ile birlikte in-vivoda yeterli yapısal dayanıklılık	Doku iskelesi yeni gelişen doku ile eşit mekanik özelliklere sahip olmalı

2.3. Doku İskelesi Materyalleri

Biyomalzemeler doku mühendisliğinde kritik bir teknolojidir, çünkü doku iskelesi üzerine hücre popülasyonunun yapışması ve göç etmesini sağlayan substrat, özel hücre tipleri ile kombine edilen üç boyutlu implant, hücre salan bir vesikül, lokalize bölgelerde özel hücresel fonksiyonların aktive edilmesi için bir ilaç taşıyıcısı, yenilenen dokuların biçimini belirleyen bir mekanik yapı ve fibroblast oluşumunu engellerken doku rejenerasyonu için alan temin eden bir bariyer membran olarak görev yapar. Biyomalzemelerin degradasyon ve absorpsiyonu, fonksiyonel doku mühendisliğinde oldukça önemlidir.

Doku mühendisliğindeki farklı ihtiyaçları karşılamak için doku rejenerasyonuna yönelik doku iskelesi olarak farklı materyallerden yararlanılmaktadır. Doku iskelesi üretiminde sentetik biyobozunur polimerler (polilaktidler, polihidroksialkanoatlar, PEG, poliamidler, polianhidridler), seramikler ve doğal polimerler (kollajen, ECM türevleri, hyaluronik asit, kitosan vb.) kullanılmaktadır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Biyomedikal uygulamalar için onaylanmış bazı biyobozunur polimerler

Polimer ve yapısı	Tg *(°C)	Tm *(°C)	Mukavemet (MPa)	Uzama (%)	Bozunma (ay)
Poliglukolat -O-CH ₂ -CO-	35	225	75	~0	1
Poli(L-laktat) -O-CHCH ₃ -CO-	57	175	45	3	6-12
Poli(D,L-laktat) -O-CHCH ₃ -CO-	50	Yok	-	-	3-10
Poli(ε-kaprolakton) -O-(CH ₂) ₅ -CO-	-60	60	22	>500	>24
Poli(1,4 dioksan-2-on) -O-CH ₂ CH ₂ -O-CH ₂ -CO-	-14	110	36		
Poli(trimetilenkarbonat) O-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -O-CO-	-15	52	0.5	160	Yok
Poli(β-hidroksibütirat) -O-CHCH₃CH₂-CO-	5	175	26	3	Yok

2.4. Mikroporöz Doku İskelesi Fabrikasyonu

Doku iskelesi üretimindeki en büyük sorun, istenen makro-yapısal (dış geometri, bileşim, mekanik dayanım, yoğunluk, gözeneklilik), mikro-yapısal (gözenek boyutu, gözenekler arası bağlantılar, bozunma davranışı) ve nano-yapısal (yüzey topografisi, yüzeyin fiziksel-kimyasal yapısı) özelliklerin kesin bir şekilde korunmasıdır. Poröz yapı formasyonu oluşturmak, doku iskelesi fabrikasyonunda öncelikli hedefdir.

Yaygın olarak kullanılan teknikler çözücü döküm/partikül ekstraksiyonu, faz dönüşümü/ partikül ekstraksiyonu, fiber çekme/bağlama, eriterek kalıplama, gazla köpüklendirme, yüksek basınç muamelesi, membran laminasyonu, hidrokarbon kalıplama, dondurarak kurutma, emülsiyondan dondurarak kurutma, çözelti döküm ve bu tekniklerin kombinasyonlarıdır.

Çözücü döküm/partikül ekstraksiyonu, doku mühendisliğine yönelik doku iskelelerinin hazırlanmasında yaygın bir şekilde kullanılan ve kapsamlı bir şekilde incelenmiş bir üretim yöntemidir. Mikos tarafından 1994'te ilk kez tarif edilen bu yöntem bir mineral ya da organik partikülün polimer çözeltisi içerisinde disperse edilmesine dayanır. Dispersiyon sürecinin ardından bir döküm ya da dondurarak kurutma süreci gelir.

Sünger formundaki gözenekli 3 boyutlu doku iskelelerinin üretimi için kullanılan bu yöntemde hazırlanan polimer çözeltileri uygun şartlar altında dondurulmakta, sonrasında donmuş olan doku iskeleleri dondurarak kurutma cihazına yerleştirilmektedir.

Vakum altında ve düşük sıcaklıklarda çalıştırılan bu cihaz çeşitli ısıtma soğutma protokolleri uygulayarak donmuş olan çözücünün süblimleşmesini ve daha sonrasında cihazın iç duvarlarında yoğunlaşmasını sağlamaktadır. Hızlı bir şekilde kurutmanın sağlandığı bu yöntem ile makro gözenekli yapıların elde edilmesi mümkündür.

Çizelge 2.3. Farklı metotlarla üretilen polimerik doku iskelesi özellikleri
(<http://www.ejb.org/content/vol3/issue2/full/5/>)

Metod	Porozite (%)	Avantaj	Dezavantaj	Por boyutu
Fiber bağlama Örülmemiş ağ	81	İnterkonnekt porlar ile birlikte yüksek poroziteye sahip doku iskelesi	Hücrelerin uzun süre içinde tutuldukları toksik (zehirli) çözümler kullanmak	500
Çözücü dökümü/ parçacık uzaklaştırma	87	Yapı oldukça dayanıklı ya da elektriksel iletkenliğe sahip	Kullanılan organik çözümler polimeri kontamine eder	100
Gaz köpükleştirme	93	Biyouyumlu	Kullanılan organik çözümler polimeri kontamine eder	100
Faz separasyonu Emülsifikasyon	95	Por boyutu ve porozite kolaylıkla değiştirilebilir	Kullanılan çözümler toksik	13-35

2.5. Doku İskelesi Yüzey Modifikasyonu

Yüzey, bir biyolojik sistemde yüzey ve ara yüzeyde gerçekleşen çok fazla biyolojik reaksiyonda önemli bir rol oynar. Doku mühendisliğine yönelik biyomateryaller geliştirilerek spesifik hücresel cevap ve direkt yeni doku rejenerasyonu yaratabilen harika yüzeyler oluşturulabilir. Direkt yüzey modifikasyonu, biyomateryallerin biyouyumluluğunu iyileştirmesi açısından önemli bir katkıdır.

Doku mühendisliği alanında polimerizasyon sonrasında fonksiyonel grup yaratmak için plazma, yüzey hidrolizi, kimyasal modifikasyon, fiziksel adsorbsiyon, biyomimetik yüzeyler ve kendiliğinden düzenlenme teknolojisi kullanılmaktadır (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Biyomateryallere farklı yüzey özellikleri kazandırmak için yüzey modifikasyon teknikleri (Jiao ve Cui, 2007)

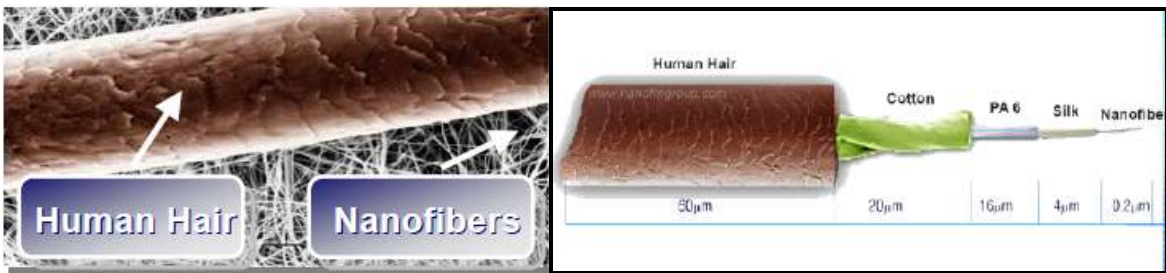
Modifikasyon tipi	Modifiye yüzeyin özellikleri
Morfolojik modifikasyon (porozite ve pürüzlülük)	<ul style="list-style-type: none"> - Doku büyümesini teşvik etmek için por içeren kaplama - Dental implant üzerindeki epitelial içe büyümeyi ve implantların belirli bölgeleri boyunca doğrudan kemik oluşumunu engelleme
Kimyasal modifikasyon (kompozisyon ve yük)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Doku yapışması ve yüzey serbest enerjisini artırmak için akkor boşalma <p>Yüzey geçirgenliğini azaltmak ve yüzey sertliğini artırmak için polimerik yüzeyleri çapraz bağlama</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. Polimer yüzeyinde yeni fonksiyonel gruplar oluşturmak için reaktif gazlarla plazma müdahalesi 3. Korozyona/yüklenmeye karşı dirençliliği artırmak için yapısal ve kimyasal değişme yaratmak için iyon implantasyonu 4. Protein adsorpsiyonu ve hücre yapışmasını azaltmak için PEO gibi makromolekülleri greftleme 5. Negatif (asidik ve sülfonat) ve pozitif (amino) yüklü yüzeyler üretmek için fonksiyonel grup kullanmak
Biyolojik modifikasyon	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hücre yapışması ve hücre büyümesini artırmak için biyomateryal yüzeyinde biyomolekül immobilize (RGD, heparin, heparin sülfat-bağlı peptitler, fibronektin benzeri proteinler ya da büyüme faktörleri) etmek 2. Kanla bağlantılı uygulamalarda protein ve hücre yapışmasını engellemek için fosfokolin immobilizasyonu

kontakta olan yüzey bu enerjik parçacıklar ile bombardıman edilir ve bu enerji plazmadan katıya transfer edilir (Hsieh, 2006).

Bu enerji transferleri Şekil 2.3'de gösterildiği gibi farklı kimyasal ve fiziksel işlemler ile yüzeye dağılarak yüzey modifikasyonu gerçekleştirir. Bu enerjik parçacıklar biyomateryalin bulk özelliğini değiştirmeksizin yüzeyin birkaç yüz angstromdan 10 mikrometre derinliğine kadar tepkimeye girer. Parametrelerin çeşitliliği plazmanın fiziksel ve kimyasal özelliklerine doğrudan ve bunun akabinde plazma modifikasyonu ile gözlenen yüzey kimyasını etkiler. Gaz tipi, uygulanan güç, uygulama süresi ve kullanılan basınç gibi proses parametreleri kullanıcı tarafından çeşitlendirilebilir; elektrot yerleştirimi, gaz girişi ve vakum gibi sistem parametreleri plazma ekipmanının dizaynıyla ayarlanır. Plazma prosesinin geniş parametre aralığı en yüksek enerjili radyasyon prosesinden daha fazla kontrol sağlar (Hsieh, 2006).

2.6. Nanoteknoloji Nedir?

Köken olarak Yunancada amca anlamına gelen nannas'dan gelen nanos ya da nannos kelimesi "kısa boylu erkek" ya da "cüce" anlamındadır. Metrik skalada nano 10^{-9} büyüklüktedir. Bir parça kağıt 100.000 nanometre kalınlığındadır; tek bir altın atomu 3 ya da bir nanometre çapındadır. Bir insan saçı 80.000 nanometre çapındadır.



Şekil 2.4. Nanofiber ile insan saçının karşılaştırılması

Uluslararası Nanoteknoloji Girişimi'nin (National Nanotechnology Initiative) nanoteknoloji tanımı ise şöyledir;

" Nanoteknoloji yeni uygulamalarda eşsiz özellikler kazandıran ortalama 1-100 nanometre boyutundaki malzemelerin kontrolü ve anlaşılmasıdır. Nanoteknoloji

nano boyuttaki malzemelerin görüntülenmesi, ölçümü, modellenmesi ve manipüle edilmesini kapsar.”

Nano boyutta materyaller çok sık rastlanmayan fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler kazanırlar. Bu özellikler bulk materyaller, molekül ya da tek atomların özelliklerinden önemli ölçüde farklıdır.

2.6.1. Doku Mühendisliğinde Nanoteknoloji

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıbbın amacı hasarlı doku ya da organ fonksiyonunu iyileştirmek, korumak ve yenilemek için biyolojik yapıların geliştirilmesidir. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp son on yılda büyük aşamalar kaydetmiştir. Önemli araştırmalar geleneksel implantlara bağlı çok sayıda probleme çözüm bulunması için alternatif materyallere ihtiyaç olduğu yönündedir. Sadece nanomateryaller (100 nm'den daha küçük boyuttaki nanomateryaller olarak tanımlanır) doğal dokunun yüzey özelliklerini (topografi, enerji) taklit edebildiğinden bu sorunlara çözüm olabilir. Bu sebepten dolayı son zamanlarda nanomateryaller geleneksel doku mühendisliğini iyileştirmek için umut vaat edici aday olarak görülmektedir. Önemli olan bu girişimlerin konvansiyonel materyallere (ya da mikron yapıllara) kıyasla üstün biyoyumluluk, mekanik, elektriksel, optik, katalitik ve manyetik özellikler göstermesidir. Yapılan çalışmalarda nanomateryallerin bu eşsiz özellikleri ile farklı doku büyümelerini iyileştirmeye yardım ettiği gözlemlenmiştir (Zhang, 2009).

2.7. Nanofiber Tanımı

Nanofiberler, nanoboyutta ince, uzun iplik benzeri yapılar ya da nesnelere olarak tanımlanabilir. Esneklik ve 1000:1 'den daha büyük en-boy oranı ile karakterize edilen katı durumlu doğrusal nanomateryallerdir. National Science Foundation (NSF) e göre nanomateryaller 100 nm'den daha küçük ya da en az bu çapta materyaller olarak tanımlanıyor (M.C.Rocco, 1999). Öyleyse nanofiberler 100 nm'ye eşit ya da daha küçük çaptaki fiberlerdir. Fiber formundaki materyaller temelde ve uygulamada oldukça büyük bir öneme sahiptir. Yüksek yüzey alanı, esneklik ve üstün dayanıklılığı filtrasyondan koruyucu örtülere kadar birçok uygulama için nanofiberleri öncelikli materyal yapar. Nanofiberleri üstün kılan özellikleri:

- ❖ Yüksek yüzey alanı-hacim oranı
- ❖ Yüksek porozite
- ❖ Küçük porlar
- ❖ Çap (50–1000) nm

Nanometre boyutundaki nanofiberler canlı sistemlerin temel yapı taşlarıdır. 1,5 nm olan çift iplikçikli DNA molekülünden, 30 nm çapında sitoiskelet filamentlerinden, kıl hücreleri ya da gözdeki çubuk hücrelerine gibi sensör hücrelere kadar doku ya da organların, ekstraselular matriksin multifonksiyonel yapısal temeli nanofibere dayanmaktadır.

Doğadaki dizayna benzer olarak elektronik polimerler ve bunların kompozitlerinden hazırlanan nanofiberler insanlığın ihtiyaçlarına hizmet eden eşsiz, yeni fonksiyonlar gösteren cihaz ve yapıların oluşturulması için temel yapı ihtiyacını karşılar. Nanofiber bazlı teknoloji ilaç salım sistemi, doku mühendisliği için doku iskelesi, kapasitör, bilgi teknolojileri için transistör ve diyotlar, bataryalar ya da yakıt hücreleri gibi enerji iletimi, çevrimi ve depolama sistemleri ve havalandırma yapıları için yapısal kompozitleri kapsamaktadır (Guceri ve arkadaşları, 2004).

2.7.1 Nanofiber Üretiminde Kullanılan Polimerler

Bugüne kadar literatürde yaklaşık 50 farklı polimerin 3-1000 nm arasında nanofiber üretimi için kullanıldığı dikkati çekmektedir. Son zamanlarda iletken polimerler, biyobozunur polimerler, ipekböceği ipeği ve genetik mühendisliği ile elde edilen ipek gibi farklı sentetik ve doğal polimerlerden ince fiberler elde edilmektedir.

Elektrospın metodundan polisakkaritler (kitosan, hyaluronik asit, ve selüloz) ve proteinleri (jelatin, kollajen ve silk fibrinojen) içeren farklı doğal biyopolimerlerden doku mühendisliği için örülmemiş matriksler üretmek için yararlanılmaktadır. Bu materyallerin biyomedikal uygulamalarda kendi avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Bir taraftan bu doğal polimerler istenen hücre yapışması ve çoğalmasında öğretici işaretler verirken diğer yandan da batch-to-batch özelliğinin varyasyon problemi bulunmaktadır (Agarwal, 2008).

2.7.2. Mikro-nanofiber Fabrikasyon Yöntemleri

Günümüzde nanofiber sentezi için kullanışlı 3 teknik bulunmaktadır; elektrospin, self-assembly ve faz separasyonudur (Vasita, 2006). Bu tekniklerden en sık çalışılanı elektrospinningdir ve doku mühendisliği alanında umut vaat eden sonuçlar göstermektedir.

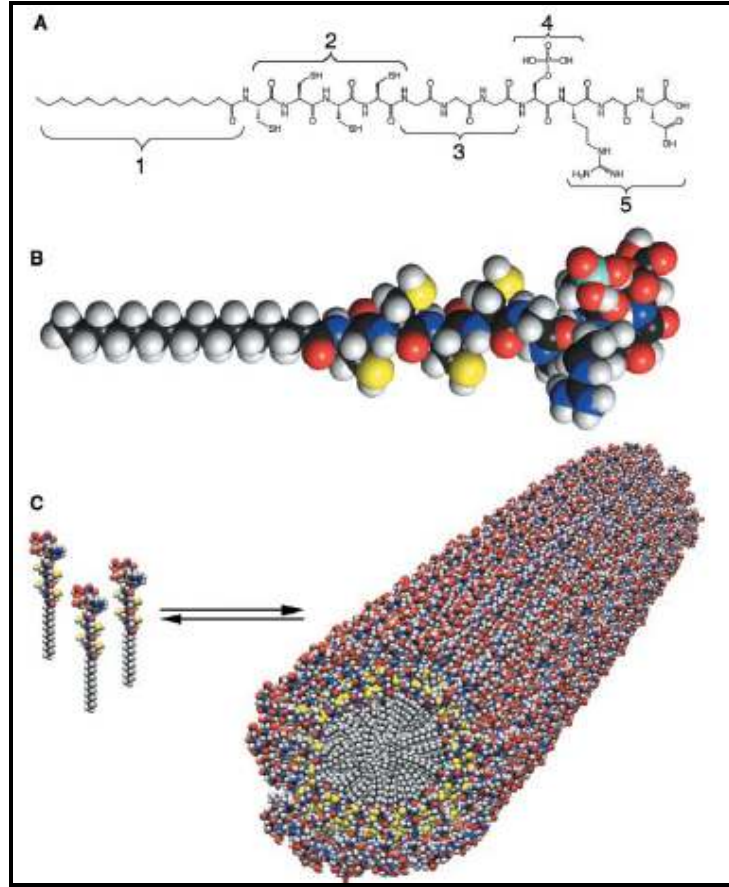
Çizelge 2.5. Nanofiber üretim yöntemlerinin karşılaştırılması (Barnes ve arkadaşları, 2007)

Proses	Avantajlar	Kısıtlamalar
Self-assembly	Küçük çaplı fiber eldesi (5-8 nm)	Sadece kısa fiberler elde edebilme ($< 1\mu\text{m}$) Düşük verim Matriksin doğrudan fabrikasyonu Birkaç polimeri kullanabilme
Faz separasyonu	İstenen mekanik özellikler, por boyutu ve interkonnektivite Batch-to-batch tutarlılığı	Düşük verim Matriksin doğrudan fabrikasyonu Birkaç polimeri kullanabilme
Elektrospin	Fiyat uygunluğu Uzun, sürekli nanofiber Sıralı nanofiber üretimi İstenen mekanik özellikler, por boyutu, biçimi Polimerlerin çoğu kullanılabilir	Büyük nanometrelerden mikron boyuta kadar fiberler Organik çözücüler kullanma 3D por yapısının kontrol zorluğu

2.7.2.1. Self-assembly

Kendiliğinden düzenlenme (self-assembly) insan müdahalesi olmaksızın yapılar ya da desenler halinde bileşenlerin kendiliğinden organizasyonu olarak tanımlanabilir. Doğal aminoasitlerden yapılan kısa peptitlere 16 yıl öncesine kadar kullanışlı bir materyal olarak önem verilmiyordu. Kendiliğinden düzenlenerek düzgün yapılar oluşturan peptitlerin keşfi kavramsal bir değişiklik yaratmıştır. "Bottom-up" olarak bilinen bu metodla küçük çaplı fiberler elde edilir (100 nm'den daha küçük kalınlıkta ve birkaç mikrometrenin üzerindeki uzunluklarda). Desenler ya da yapılar

tipik formdadır ve kovalent olmayan bağlarla korunmaktadır. Hidrojen bağları, iyonik bağlar, hidrofobik etkileşimler gibi non-kovalent bağlar izolasyonda zayıf olmasına rağmen bu bağlar birlikte hareket ettiklerinde biyolojik makromoleküllerin kendiliğinden düzenlenmesini sağlarlar. Bu moleküllere bir örnek verecek olursak gerçekten doğadaki yüksek yapılar içinde hücrelerdeki plazma membranının baş komponenti olan fosfolipidler kendiliğinden düzenlenmiş yapılardır.



Şekil 2.5. Self-assembly nanofiber oluşumu (Hartgerink, 2001)

Peptid amfifillerin kimyasal yapısında 5 anahtar özellik bulunmaktadır (Şekil 2.5):

- Bölge 1 uzun bir alkil zinciridir, moleküle hidrofobik karakter kazandırır.
- Bölge 2 sistein parçaları içerir.
- Bölge 3 glisin parçaları içerir. Bu bölge hidrofilik karakter kazandırır.
- Bölge 4 tek bir serin parçası içerir.
- Bölge 5 hücre yapıştırıcı sekans (RGD) içerir.

Farklı kısa peptit sınıfları keşfedildiğinden beri nanoteknoloji ve moleküler cihazların geliştirilmesi için membran proteinlerinin stabilizasyonu, yavaş ilaç salımı, doku mühendisliği, rejeneratif ve reparatif tıp, 3D hücre doku kültürünü kapsayan geniş uygulama alanları bulmuştur (Yang ve arkadaşları, 2009).

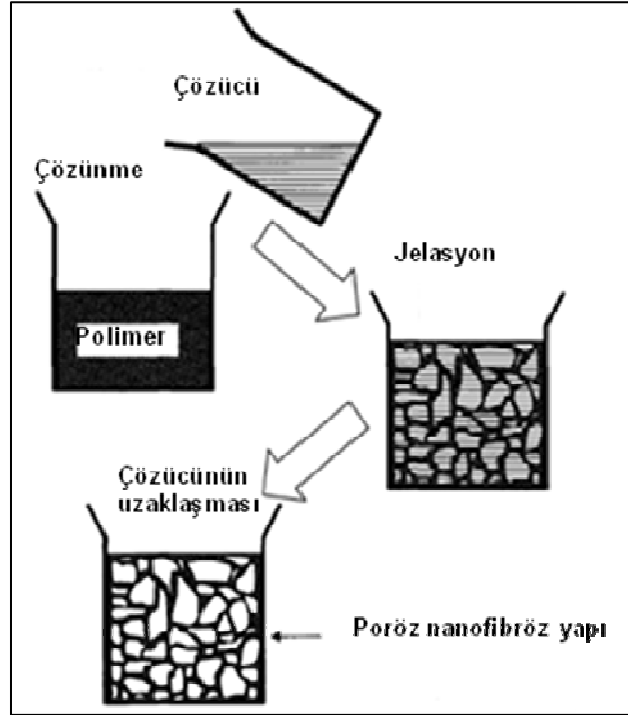
Bu yöntemin ana dezavantajı kompleks, uzun ve düşük verimlilikle birlikte aşırı ayrıntı gerektiren bir tekniktir.

2.7.2.2 Faz Separasyonu

Kontrollü faz separasyonu yıllardır poröz polimer membranların hazırlanmasında kullanılıyor. Bu prosesle nano-fibröz materyaller üretilmektedir. Faz separasyon prosesi ile doğal kollajene benzer üç boyutlu fibröz ağısı poroz yapılar elde edilir. Bu fibröz ağı oluşturan fiberler 50-500 nm ve %98 poroziteye sahiptir (Smith, 2004).

Bu proses 5 adım içerir:

- ❖ Polimeri eritme
- ❖ Sıvı-sıvı faz separasyonu
- ❖ Polimer jelasyonu (düşük sıcaklıkta nano boyuttaki doku iskelesinin porozitesini kontrol eder)
- ❖ Su ile jelden çözücünün uzaklaştırılması
- ❖ Vakum altında dondurarak kurutma ya da dondurma



Şekil 2.6. Faz separasyonu ile nanoyapıların üretimi
(Ramakrishna ve arkadaşları, 2005)

Faz separasyonu basit prosedürlü, gerekli malzeme az, kalıplarla vücutta istenen anatomik büyüklükte doku iskelesi fabrikasyonu için uygundur. Dezavantajı ise uzun fiberler üretilmemesi ve sadece jelasyon yeteneğine sahip polimerlerin nanofibröz yapılar üretmek için kullanılmasıdır.

2.7.2.3. Elektrosinning Yöntemi ile Nanofiber Üretimi

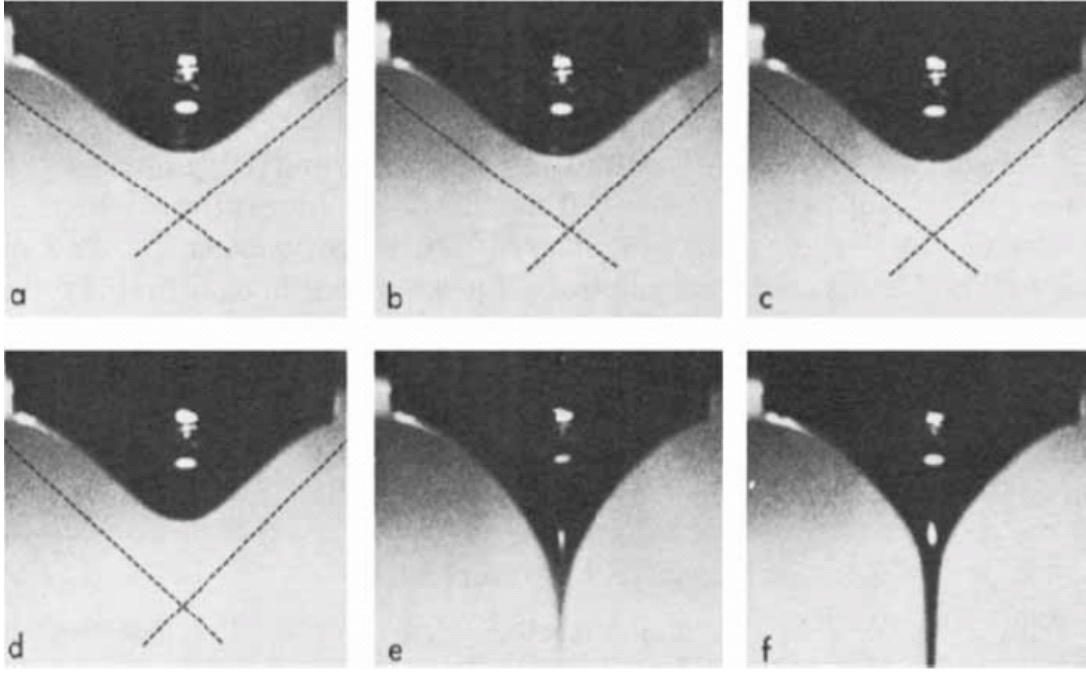
Nanomaterial üretmek için en ucuz ve basit yol elektrosinningdir. Elektrosinning gelişmekte olan ülkelerin ekonomik ve bilimsel canlanması adına mecburi bir öneme sahiptir. Birkaç mikrometreden on nanometre çapındaki polimerik fiberler farklı türdeki uygulamalar açısından dikkate değer bir ilgi görmektedir. Çevresel problemleri çözümlenmek için biyobozunur ve yenilenebilir atık bir üründen dayanıklı, ucuz fiyatlı, yüksek verimde fiber üretmek şimdilerde mümkündür. Örneğin poröz yapıda elektrosinning nanofibröz membran, yaradan sıvının uzaklaştırılmasını hızlandıran yara örtü materyali olarak kullanılmaktadır. Elektrosinning nanofibröz membran kontrollü sıvı buharlaşması, hızlı oksijen geçirgenliği ve ekzojen mikroorganizmaların girişini engellerken drenaj kapasitesini artırıcı etki göstermektedir.

İlk kez 1934 yılında Formhals tarafından patenti alınan elektrospin prosesi elektrostatik kuvveti kullanarak polimerik fiberlerin üretilmesine dayanır.

Basit bir elektrospin için ihtiyaç duyulan minimum ekipmanlar:

1. Viskoz polimer solüsyonu ya da eriyik
2. Polimer solüsyonuyla kontaklı sağlayan elektrot
3. Elektroda bağlı yüksek voltaj DC-jeneratörü
4. Nanofiberlerin toplanması için karşıt yükle yüklenmiş bir yüzey (Andrady, 2008)

Elektrospin prosesinde polimer solüsyonunun ya da eriyiğın elektrik yüklü jet oluşturabilmesi için yüksek voltaj kaynağı kullanılır. Polimer solüsyonu ya da eriyik cam bir tüp içerisinde, genellikle bu pipet şırınga benzeri bir yapıya bağlanır. Şırınga pistonuna bir pompa bağlanarak sıvının pipet boyunca sabit bir basınçta akması sağlanır. Elektrotlardan birisi spin solüsyonu ya da eriyiğine diğeri de toplayıcıya bağlanır. İçinde polimerik çözelti bulunan kapiler tübün ucuna elektrik alan uygulanır. Sıvının yüzeyinde bir yük oluşur. Bunun sonucunda polimerik sıvı ile kapiler boru arasındaki yüzey gerilimine ters yönde bir kuvvet oluşur. Elektrik alanın şiddeti arttıkça sıvının hemisferik yüzeyi kapiller tübün ucunda " Taylor konisi" olarak bilinen konik bir form alır. Taylor konisi yüzey gerilimi ve yüklü yüzeydeki elektronik güç arasındaki dengeyi sağlar (He ve arkadaşları, 2008). Elektrik alan arttıkça itici elektrostatik kuvvetler yüzey gerilimini yendiği zaman kritik bir değere ulaşılır ve Taylor konisinin ucundan yüklü bir jet fışırır. Bu yüklü jet toplayıcı üzerinde fiber olarak toplanır.

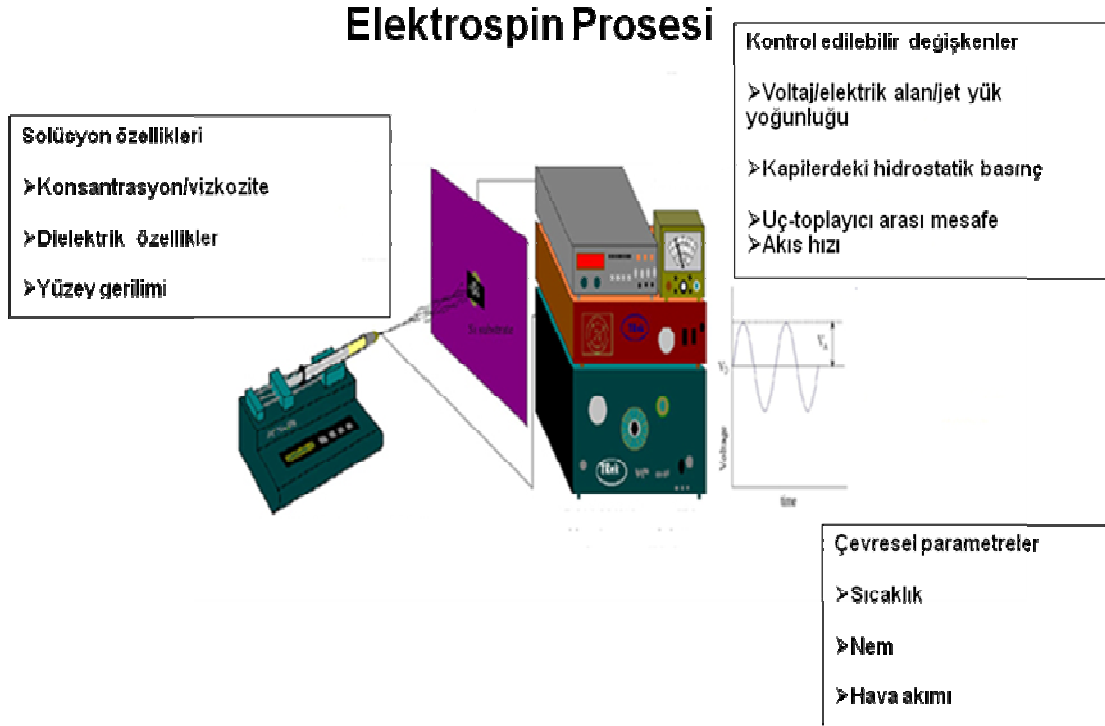


Şekil 2.7. Kılcal Boru Ucundaki Damlanın İlerleyerek Artan Voltaj Etkisiyle Taylor Konisi ve Jet Oluşumu a) Polimer damlası artan voltaj etkisiyle yarı küresel formda b,c) Taylor konisine geçişi d)Taylor konisindeki şekli e,f) Taylor konisinden bir jet halinde çıkışı (Larrondo,1981, I-III)

Elektrospinning prosesinde 50-1000 nm ya da daha büyük fiberler elde edilir.

2.7.2.4. Elektrospin Parametreleri

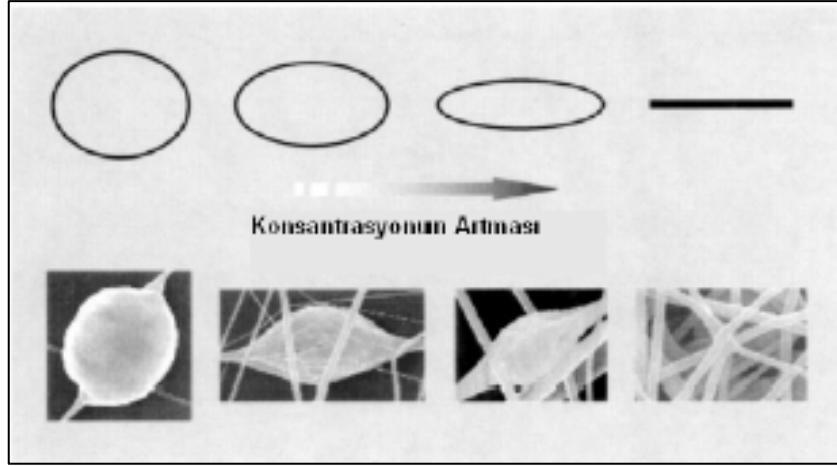
Elektrospin ile üretilen fiberlerin çoğu dairesel katı filamentlerdir; tüpler, şeritler, halkalar ve boncuksu yapıların oluşabildiği özel durumlar da vardır. Elektrospin kullanımı kolay olmasına rağmen elektrospin fiberlerin oluşum ve yapısı üzerine etki eden çok sayıda faktör vardır. Bu faktörler Şekil 2.8'de görülmektedir.



Şekil 2.8. Elektrospın parametreleri

2.7.2.4.1. Solüsyon Parametreleri

Viskozite/Konsantrasyon: Polimer konsantrasyonu bir solüsyonun spinlenebilirliğini, yani fiber formu alıp alamayacağını tanımlar. Solüsyon, zincir karışıklığının oluşması için yeterli polimer konsantrasyonunda olmak zorundadır; ne çok seyreltik ne de çok konsantre olmamalıdır. Polimer konsantrasyonu elektrospın prosesinde önemli parametrelerden olan solüsyonun yüzey gerilimi ve viskozitesi üzerine etki eder. Solüsyon çok seyreltik olursa yüzey geriliminin etkisiyle toplayıcıya ulaşmadan damlacıklar halinde parçalanır. Solüsyon çok konsantre olursa yüksek viskoziteden dolayı fiber formu oluşmaz, öyleki solüsyonun akış hızını kontrol etmek güçleşir (Travis, 2006).



Şekil 2.9. Polimer konsantrasyonunun fiber oluşumuna etkisi

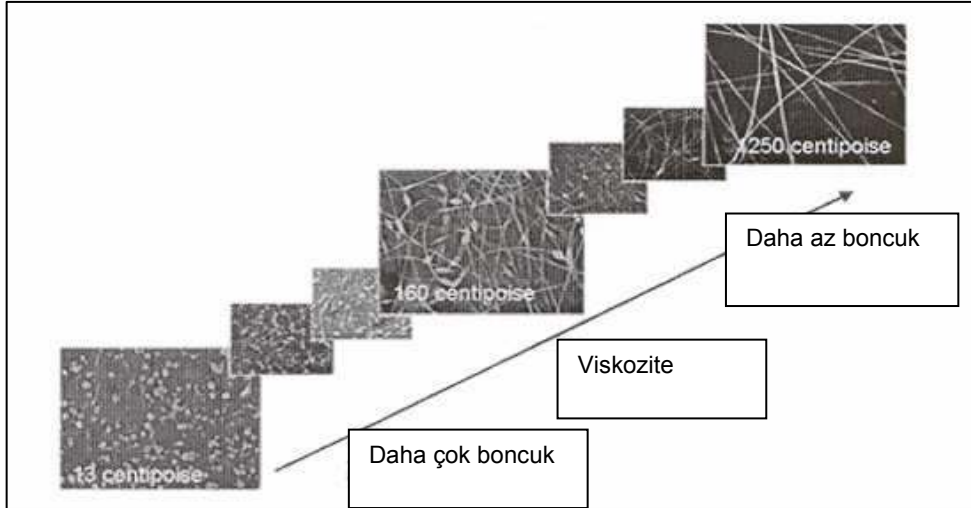
Elektrospinning ile üretilen fiber çapının, solüsyon konsantrasyonu arttıkça artış gösterdiği bulunmuştur. Örneğin %5'lik solüsyondan 800-2400 nm fiberler üretilirken %1'lik solüsyondan 100-300 nm çapında PLLA fiberleri elde edilmiştir. Ayrıca PVA konsantrasyonu %6'dan %8'e çıktığında PVA fiberlerin çapı da 87 ± 14 nm'den 246 ± 50 nm'ye çıkmıştır. Fiber çapının artmasının doğrudan elektrospin matrislerdeki yüzey alanının artmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (Pham ve arkadaşları, 2006).

Elektrospinningde diğer bir problem boncuk benzeri defektlerin oluşmasıdır. Polimer konsantrasyonunun boncuk formasyonu üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (Aussawasathien, 2006)

Fong (Fong, 1999) yüksek polimer konsantrasyonunda daha az boncuksu yapılar gözlemlemiştir.

Boncuksu yapıların oluşumunu engellemek için;

- Viskozite yüksek olursa boncuk oluşumu engellenebilir (Polimer konsantrasyonu ile oynanarak viskozite değiştirilebilir).
- Net yük yoğunluğunun artması boncuk oluşumunu engellerken daha ince lif oluşumunu sağlar (Net yük yoğunluğu uygulanan elektrik alan ve kısmen de çözeltinin iletkenliği ile ilişkilidir).
- Düşük yüzey gerilimi boncuk oluşumunu engelleyebilir (Yüzey gerilimi ise polimer ve çözücüye bağlıdır).



Şekil 2.10. Farklı polimer konsantrasyonlarında boncuksuz yapıları elektrospon nanofiberlerin SEM görüntüleri (Fong, 1999)

Doshi ve Reneker farklı PEO konsantrasyonundaki PEO/su solüsyonundan elektrospon fiberler elde etmiştir. 4000 centipoise'dan daha büyük viskoziteye sahip PEO/su solüsyonu oldukça kalın elektrosponleniyorken 800 centipoise'dan daha küçük viskoziteye sahip solüsyon damlacıklar halinde parçalanıyor (Doshi, 1995).

İletkenlik: Polimer solüsyonundaki yüklü iyonlar fiber formasyonu üzerinde oldukça etkilidir. Jet tarafından taşınan yükler arttığında elektrik alan altındaki jete daha yüksek çekme kuvvetleri uygulanır, bunun sonucunda daha küçük boncuk ve daha ince fiberler oluşur.

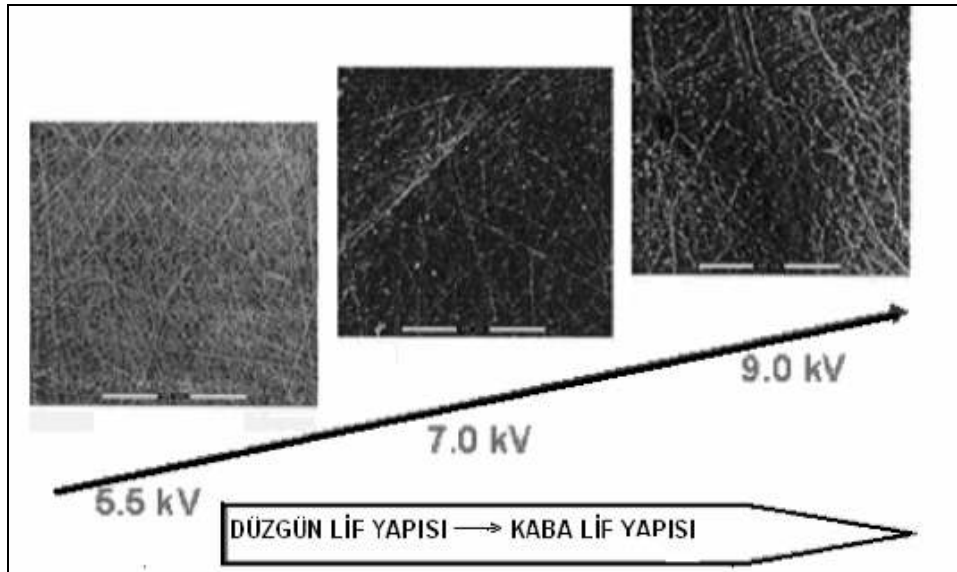
Solüsyon iletkenliği ya da yük yoğunluğu arttıkça daha az damlacıklı uniform fiberlerin oluştuğu bulunmuştur. Solüsyonun iletkenliğini arttırmak için kullanılan yaklaşımlardan biri de tuz eklemektir. Zhang ve arkadaşları PVA/su solüsyonuna iyon ekleyerek elektrospon fiber çapı üzerindeki etkisini araştırmıştır (Zhang, 2005). PVA/su solüsyonundaki NaCl konsantrasyonunu % 0.05'den 0.2'ye çıkarıldığında fiber çapının 214 ± 19 nm'den 159 ± 21 nm'ye düştüğü gözlemlenmiştir. İletkenlik çözücüye alkol eklenmesiyle artar, bunun sonucunda daha düzgün ve daha az sayıda boncuk içeren PHBV fiberler oluşur (Pham, 2006).

Çözücü buharlaşması: Çözücü buharlaşma basıncı, buharlaşma hızı, kuruma süresi ve elektrospon fiber morfolojisi üzerinde önemli bir rol oynar. Kapiler uç ve

toplayıcı arasında yeterli çözücü buharlaşmasının olabilmesi için uçucu bir çözücü kullanılmak zorundadır (Megelski, 2002). Megelski ve arkadaşları farklı oranlarda DMF (Dimetilformamid) ve THF (tetrahidrofuran) içeren solüsyonlardan hazırlanan polisitren elektrospin nanofiberlerin yapısal özelliklerini incelemişler. %100 THF (oldukça uçucu) solüsyonundan elde edilen elektrospin fiber, çapına bağlı olarak fiberin yüzey alanını %20-%40 kadar arttıran yüksek por yoğunluğu göstermiş. %100 DMF (az uçucu) elektrospin solüsyonu düz formasyonda fiberler ile birlikte mikro yapıda tam bir kayıp göstermiştir. Bu iki uç arasında çözücünün uçuculuğunun azalması gibi por derinliği azalırken (böylece por yoğunluğu azalır) por büyüklüğü artar.

2.7.2.4.2. Proses Parametreleri

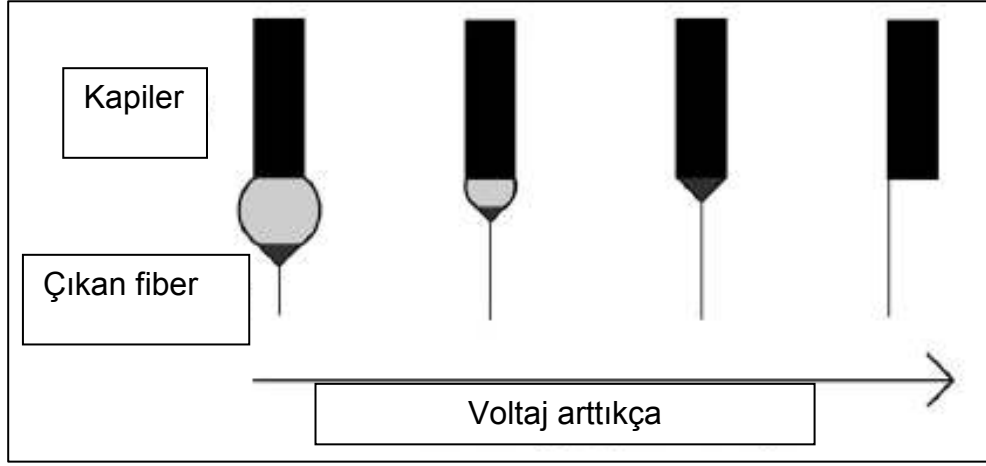
Voltaj: Elektrospinde uygulanan voltaj, jet stabilitesi ve fiber morfolojisi üzerinde dikkate değer bir etki göstermektedir. Genel olarak uygulanan voltajdaki artış, iğnenin ucundan daha fazla miktarda kütle akışına bağlı olarak daha fazla birikmeye neden olur.



Şekil 2.11. Uygulanan voltajın fibere etkisi

Düşük voltajda ya da alan gücünde, bir damla tipik olarak enjektör ucunda asılı durur ve Taylor konisinden boncuk oluşumunun gözlemlenmediği bir jet çıkar (farzedelim ki elektrik alan gücü yüzey gerilimine yeterli gelsin). Voltaj arttıkça tipteki damlanın hacmi azalır bu da Taylor konisinin kaybolmasına neden olur. Uç

ile sıvı yüzeyinden çıkan jetten daha çok boncuklu kısım gözlenir. Voltaj daha fazla arttığında jet tipin kenarları etrafında hareket eder, Taylor konisi görülmez; bu durumda birçok boncuksu yapının varlığı gözlemlenebilir (Pham, 2006).



Şekil 2.12. Farklı voltaj değerlerinin Taylor koni formasyonunda etkisi
(Travis ve arkadaşları, 2008)

Polietilenoksit/su sistemi için 5.5 kV'luk bir elektrik potansiyelinde defeksiz fiber morfolojisi gözlemlenirken 9.0 kV'luk bir potansiyelde oldukça fazla boncuksu yapıya sahip fiber morfolojisi gözlemlenmiştir (Deitzel, 2001).

Megelski ve arkadaşları polisitren fiber çapının voltaja bağımlılığını tanımlamış ve voltaj 5 kV'dan 12 kV'a çıktığında por boyutu dağılımında önemli bir değişim olmaksızın fiber boyutunun 20 μm 'den 10 μm 'ye düştüğünü göstermişlerdir (Megelski, 2002).

Kapiler uç-toplayıcı arası mesafe: Kapiler uç ile boşluk arasındaki mesafe fiber toplanma zamanı, buharlaşma hızı üzerine etki eder. Sıvı polimer solüsyonu yüksek uçuculuğa sahip sistemlere göre kurumak için daha uzun bir mesafeye ihtiyaç duyar.

Kontrollü fiber çapı ve morfolojisi için tip ve toplayıcı arasında farklı mesafeler denenmiştir. Toplayıcıya ulaşmadan önce fiberin kuruması için yeterli sürenin olması minimum mesafe olarak bulunmuştur. Mesafe çok yakın ya da çok uzak olursa boncuksu yapılar gözlemlenir (Pham, 2006).

Doshi ve Reneker mesafe arttıkça fiber çapının azaldığını bulmuştur (Doshi, 1995). Başka bir çalışmada Jaeger ve arkadaşları PEO/su solüsyonundan elektrospin fiberler ve Taylor konisi mesafesinin bir fonksiyonu olarak fiber çapını incelemiştir (Jaeger, 1998). Mesafenin 1'den 3.5 cm'e çekildiğinde ortalama fiber çapının 2 kat azaldığını, 19'dan 9 µm'ye düştüğünü gözlemlemiştir. Megelski ve arkadaşları ise kapiler uç ve toplayıcı arasındaki mesafenin kısalmayla elektrospin polistiren fiberlerin boncuksu morfoloji gösterdiğini açıklamışlardır (Megelski, 2002).

Akış hızı: Polimer akış hızı, fiber boyutu üzerinde önemli etkiye sahiptir, ek olarak fiber biçimi gibi fiber porozitesi üzerinde de etkilidir. Yüksek akış hızında boncuk denilen defektler göze çarpar. Megelski ve arkadaşları polistiren/tetrahidrofuran solüsyonundan elektrospin fiber yapısı üzerinde akış hızının etkisini araştırmışlardır. Akış hızının artmasıyla fiber çapının ve por boyutunun arttığını gözlemlemiştir (Megelski, 2002).

2.7.2.4.3. Çevresel Parametreler

Hava akımı, bağıl nem, vakum durumu gibi elektrospin çevre koşulları fiber yapısı ve morfolojisi üzerinde etkilidir. Bağıl nemin %60'dan daha yüksek olması, toplayıcı üzerinde fiberlerin karmakarışık olmasının yanı sıra akrilik elektrospin fiberlerde kurumanın tamamen gerçekleşmemesine neden oluyor (Baumgarten,1971). Megelski ve arkadaşları PS (polistiren) fiberlerin por yapılarının bağıl neme bağlılığını tanımlamışlardır ve spin fiberlerde por formasyonu için faz separasyon mekanizmasını önermişlerdir (Megelski, 2002).

Çizelge 2.6. Elektrospin solüsyon ve proses parametreleri (Sawicka, 2006)

Elektrospin proses parametreleri	
Toplayıcı-uç arası mesafe	Yük yoğunluğu hacminin karekökü ile orantılı Boncuk yoğunluğu ile ters orantılı Elektrik alan gücü ile ters Fiber çapı ile ters orantılı
Akış hızı	Elektrik akımı ile doğru orantılı Fiber çapı ile doğru orantılı Yüzey yük yoğunluğu ile ters ilişkili Yük yoğunluğu hacmi ile ters ilişkili
Voltaj	Yüzey yük yoğunluğu ile ters orantılı Boncuk formasyonu üzerinde direkt etkili AC potansiyeli fiber uniformitesini artırıyor Fiber çapı ile ters ilişkili
Polimer konsantrasyonu	Fiber çapı ile doğru orantılı Fiber çapı güç yasası ile ilişkili Polimer konsantrasyonunun küpü ile çap orantılı
İyonik güç	Yük yoğunluğu ile doğru orantılı Boncuk yoğunluğu ile ters orantılı
Çözücü	Yük yoğunluğu hacmi üzerinde etkili Buharlaşma ve katılaşma hızıyla direkt ilişkide
Sıcaklık	Viskozite ile ters orantılı Daha az boncuklu uniform fiberler
Viskozite	Çapla ve spinleme yeteneği ile parabolik ilişkide

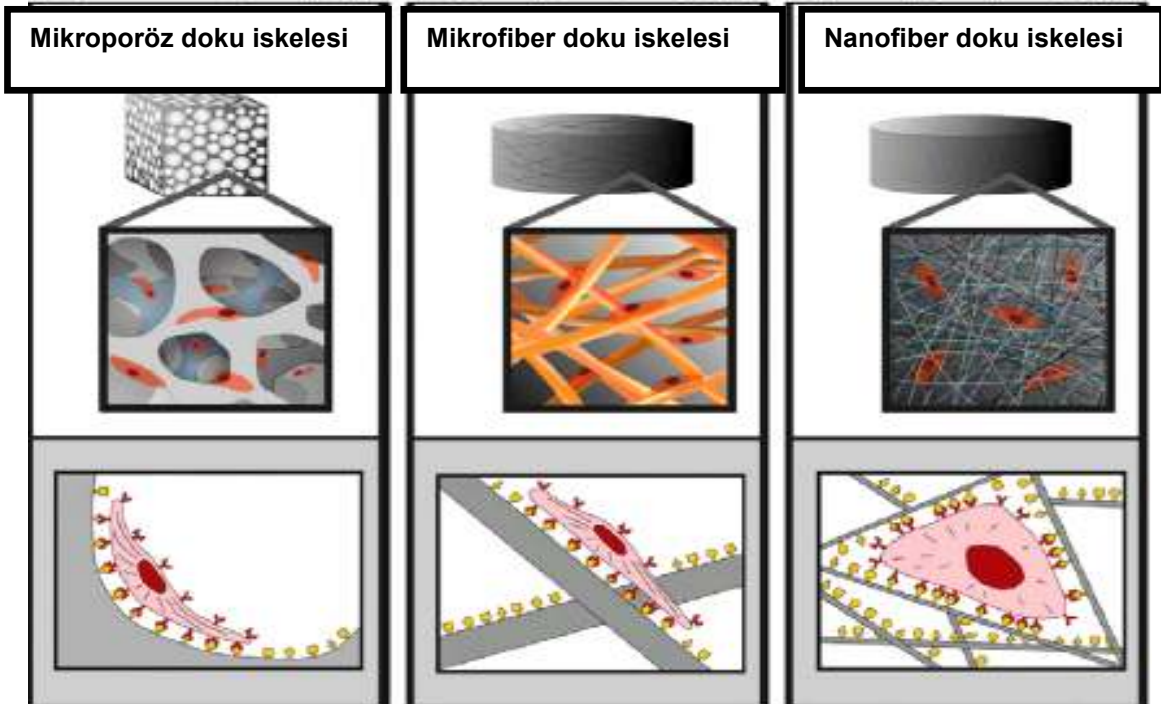
2.8. Nanofiber Uygulama Alanları

Elektrospın fiberler; örülmemiş fabrikler, güçlendirici fiberler, enzimlere yardımcı, ilaç salım sistemleri, yakıt hücreleri, iletken polimer ve kompozitler, fotonikler, sensörler, tıp, eczacılık, yara iyileşmesi, filtrasyon, doku mühendisliği, katalist yardımcısı, kompozit sistemlerde güçlendirici bileşen olarak fiber matriks ve fonksiyonel nanotüplerin hazırlanması gibi uygulama alanlarında kullanılır (He, 2008).

2.8.1. Doku Mühendisliğinde Nanofiber Uygulama Alanları

Doku mühendisliğinde en önemli değişkenlerden birisi de nano boyutta doku yapısını taklit edecek doku iskeleleri geliştirmektir. Nanofiber üretimi doku iskelesi fabrikasyonunda çok hızlı gelişen alanlardan biridir.

Nanometre boyutunda doğal insan dokusunun yapısına taklit edecek doku iskelesi üretmek için nanofiber geliştirilmesi önemlidir. Morfoloji olarak elektrospın yöntemiyle hazırlanmış nanofiberler insan doğal ECM 'ine çok benzemektedir. Bu nedenle hücre kültürü ve doku mühendisliği uygulamaları için nanofiberler, doku iskelesi materyali olarak umut vaat etmektedir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Doku iskelesi yapısının hücre yapışması ve çoğalması üzerindeki etkisi

Elektrospın prosesi yapay dokular içerisinde farklı hücre tiplerinin büyümesini sağlayacak kompleks ve üç boyutlu (3D) nanofiber doku iskelesi üretebilmeyi mümkün kılar. Nanofiber kullanılarak dizayn edilen 3 boyutlu sentetik biyobozunur doku iskeleleri hücre yapışması, proliferasyonu ve farklılaşması için mükemmel bir iskelet rolü oynar.

Nanofiberlerin yüksek yüzey alanı hacim oranı mikropor yapısıyla birleştirildiğinde hücre yapışması, proliferasyonu, farklılaşması ve rejenerasyonu doku mühendisliği uygulamaları için istenen özelliklerdir. Nanofiberler kas, kemik, kırıkta, ligament, iskelet-kas, deri, vasküler, nöral doku mühendisliğinde; ilaçların, proteinin ve DNA'nın kontrollü salımı için taşıyıcı olarak kullanılabilir.

Doğal polimerlerin avantajları insan vücudunda bulunan makromoleküllerle çok benzer olmalarıdır. Kollajen, hyaluronik asit, jelatin, kitosan, elastin, ipek, buğday proteini gibi doğal polimerler nanofiberlerin doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır. Kollajen nanofiber myoblast ve kondrositlerde uyumluluk göstermektedir (Gersbach ve arkadaşları, 2002; Shields ve arkadaşları, 2004).

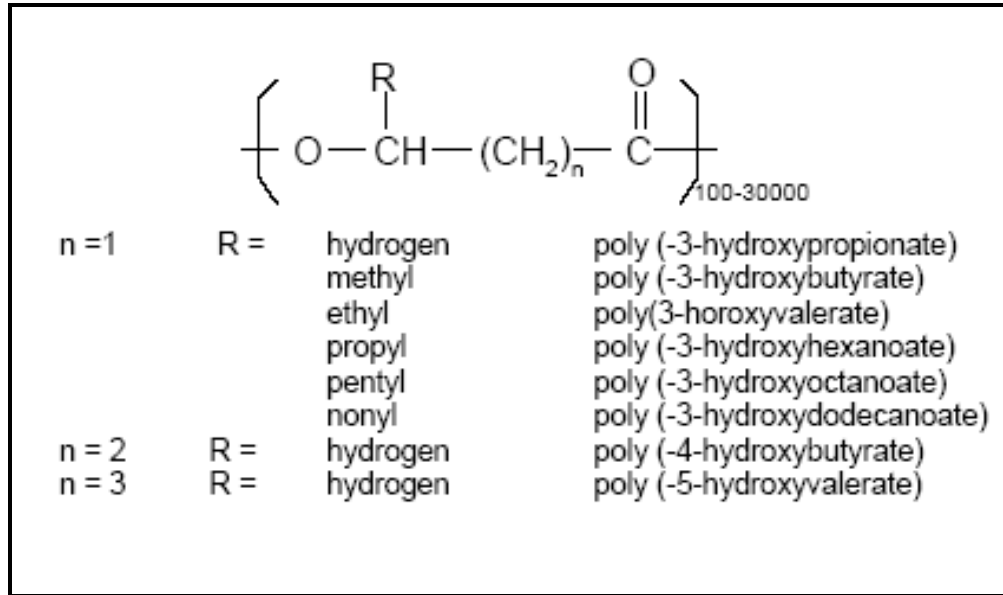
Sentetik polimerler PLA (polilaktikasit), PET (polietilenterefitalat) kan damarı doku mühendisliğinde, nöral ve kırıkta doku mühendisliğinde ECM (ekstraselüler matriks)'i taklit eden PCL (polikaprolakton) ve PLLA-CL, düz kas ve endotel hücreleri için kopolimerik bileşimler, PLGA (kemik ve kırıkta doku mühendisliği ve kontrollü ilaç salımı), PEVA kontrollü ilaç salımı ve PLGA-PEG blok kopolimeri DNA salımı için matriks olarak kullanılıyor. Son zamanlarda karbon ve alumina nanofiberler dental ve ortopedik implantlarda biyomateryal olarak kullanılıyor (Vasita, 2006).

2.9. Polihidroksialkanoatlar (PHA)

Plastik materyaller degradasyona dirençliliği ve sağlamlılığı gibi bazı istenen özelliklerden dolayı yaşamımızı tamamlayan bir parça haline gelmiştir. Her yıl çevrede 25 milyon ton degrade olmayan plastik birikmektedir. Son zamanlarda global çevre ve katı atık yönetimine ait problemler konvensiyonel sentetik plastiklerin istenen fiziksel ve kimyasal özelliklerini koruyacak şekilde biyobozunur plastiklerin geliştirilmesini gündeme getirmiştir. Geliştirilen bazı biyobozunur

plastikler polihidroksialkanoatlar (PHA), polilaktidler, alifatik polyesterler, polisakkaritler ve bunların kopolimerleri ve blendleridir (Sang Yup Lee, 1996).

Polihidroksialkanoatlar (PHA), çok çeşitli mikroorganizmalar tarafından, azot ve fosfor gibi temel besinlerin sınırlı konsantrasyonlarında ve karbon kaynağının fazlalığında enerji depo materyali olarak sentezlenen hidroksialkanoat polimerleridir (Anderson ve Dawes 1990, Poirier ve arkadaşları 1995). Bu polimerler, doğrusal, kısa zincirli C-hidroksi yağ asiti monomerleri içeren, zarla çevrili hücre içi depo materyali olup tekrarlanan hidrofobik birimlerden meydana gelmiş uzun polimerlerdir (Findlay ve White 1983, Lafferty ve arkadaşları 1988, Anderson ve Dawes 1990, Slater ve arkadaşları 1992, Madison ve Huisman 1999, Poirier 2002). Bu hücre içi depo materyalinin bakterilerde, insandaki yağ ve bitkilerdeki nişasta gibi rol oynadığı bildirilmektedir (Pool, 1989). İlk kez Lemoigne tarafından 1920'li yıllarda topraktan izole edilen *Bacillus megaterium* bakterisinde bilinmeyen bir materyalin parçalanması sonucu rastlanılan 3-hidroksi bütirik asit, poli-3-hidroksibütirat homopolyesteri (PHB) olarak tanımlamıştır (Braunegg, Lefebvre ve Genser 1998).



Şekil 2.14. Polihidroksialkanoatların (PHA) genel yapısı

Farklı monomer kombinasyonlarının çokluğundan dolayı PHA özellikleri değişiklik göstermektedir. Ancak PHA ailesinin bütün üyeleri aşağıdaki karakteristik özellikleri gösterir;

- 2×10^5 - 3×10^6 moleküler ağırlık
- 80'den fazla farklı monomeri vardır. Düz ve dallanmış, doymuş ve doymamış yapıları, alifatik ve aromatik yan grupları vardır.
- Biyolojik olarak yıkılabilir
- Su buharını geçirmez
- Yüksek UV-direnci
- Toksik değil
- Biyouyumlu
- Piezoelektrik
- Optik açıdan aktif *
- PHA'lar hem termoplastik veya elastomerik materyaller olabilmektedir. Erime noktaları 40-180 °C arasında değişir.
- PHA, bakterilerde karbon ve enerji deposu olarak kullanılır.
- Yetersiz N, P, Mg, O₂ ve fazla karbon bulunan şartlarda üretimi olur. Nutrientler dengelendiğinde, depolimeraz ile degrade olurlar.

*Şimdiye kadar sadece PHB ve kopolimerleri için tespit edilmiştir.

PHA'ların 300'den daha fazla mikroorganizma tarafından sentezlendiği ve hücre içinde depo edildiği bilinmektedir. Bu mikroorganizmalar içerisinde hücre kuru ağırlığının % 90'ı üzerinde PHB biriktirmesi nedeniyle yapılan çalışmalarda sıklıkla "*Alcaligenes eutrophus*" bakterisi kullanılmaktadır.

Çizelge 2.7. PHA biriktiren bakteri cinsleri (Helm, 2002)

<i>Actinomyces</i>	<i>Ferrobacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Halofax</i>	<i>Protomonas</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Ralstonia</i>
<i>Azosprillum</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Beijernickia</i>	<i>Methylosinus</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Rhodosprillum</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Mycoplasma</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Derxia</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Vibrio</i>

PHA üretimi sırasında şeker ve yağlar gibi tekrarlanabilen kaynaklar, spesifik mikroorganizmalar tarafından fermente edilerek PHA polimerleri oluşturulmaktadır.

PHA'ların termoplastik, piezoelektrik, biyobozunur, biyoyumlu ve nontoksik olmaları; suda çözünmemeleri onları paketleme ve biyomedikal uygulamalar gibi pek çok uygulamada çekici kılmaktadır (Anderson ve Dawes, 1990). PHA'ların immunolojik açıdan inört ve insan dokusunda yavaşça degrade olması vücut içinde implant olarak kullanılabilceği anlamına da gelmektedir. PHA'lar mikroorganizmaların aktif olarak bulunduğu ortamda 5-6 haftada degrade olabilmektedir. PHA toprak, deniz, göl suları ve atık sulardaki mikroorganizmalar tarafından aerobik şartlarda karbondioksit ve suya kadar, anaerobik koşullar altında metana kadar tamamen parçalanabilmektedirler (Khanna ve Srivastava, 2005).

2.9.1 PHB (poli-3-hidroksibütirat)

Polihidroksibütirat (PHB) atık su yönetiminde ve biyomedikal cihazlarda biyoyumluluk için kullanılan biyobozunur termoplastik bir biyopolimerdir. İlk kez 1926'da Lemoigne tarafından keşfedilen P(3HB) PHA ailesinin en yaygın ve basit üyesidir. Polihidroksibütirat (PHB) PHA sentaz enzimi varlığında belirli mikroorganizmalar tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak sentezlenen alifatik

bir biyopolyesterdir. PHB *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus megaterium* gibi mikroorganizmaların fizyolojik strese karşı cevabının bir göstergesi olarak üretilir.

Poli(3HB) özellikleri:

- Termoplastik
- Biyobozunur
- Yenilenebilir kaynaklardan üretilebilir
- Nontoksik
- Biyoyumlu
- Yüksek derecede polimerizasyon
- Suda çözünmeme
- Yüksek kristalite (doğal çevreden ekstrakte edildiğinde)
- Optik aktivite
- İzotaktik (tekrarlanan ünitelerde stereokimyasal düzenlenme)
- Piezoelektrik (Steinbüchel ve Füctenbush,1998)

Poli(3HB) plastik materyal olarak önemli bir ticari ilgi alanıdır, çünkü bütünüyle farklı kimyasal yapılara sahip olmalarına rağmen fiziksel özellikleri polipropilene (PP) oldukça benzerdir. Poli(3HB) biyomedikal uygulamalarda kullanılan ilk PHA polimeridir. Poli(3HB) mekanik, kimyasal, degradasyon özellikleri ve ticari uygunluğundan dolayı kompozit materyal fabrikasyonunda kullanılan PHA ailesinin ilk üyesidir. Poli(3HB) gerçekten sert, katı materyaldir ve çekme dayanıklılığı polipropilenle karşılaştırılabilir. Doğal bir termoplastik polyester olan Poli(3HB)'ın mekanik özellikleri polilaktitler gibi sentetik olarak üretilen bozunur polyesterler ile karşılaştırılabilir (Engelberg, 1991). Yüksek kırılma ve düşük degradasyon Poli(3HB) polimerinin tek dezavantajıdır.

Çizelge 2.8. PHB özellikleri (Misra ve arkadaşları, 2006)

Özellikler	Ölçümler
Erime sıcaklığı (C)	160-177
Camsı geçiş sıcaklığı (C)	-4...+15
Çekme dayanıklılığı(MPa)	15-40
Çekme modülü(GPa)	1.1-3.5
Kristalite (%)	1-6
Kırılmada uzama (%)	1.243
Polidispersity index	1.9-2.1
Degradasyon periyodu	>52 hafta
Degradasyon modu	Hidrolitik, bakteriyel depolimeraz
Kontakt açısı (°)	66

Poli(3HB) biyodegradasyonu, optik aktivitesi ve izotaktik özelliğinden dolayı doku mühendisliğinde doku iskelesi ve kontrollü ilaç-salım taşıyıcısı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca piyasada yiyecek paketlenmesinde, plastik filmlerde, cerrahi süturlarda ve kemik plaklarda kullanılmaktadır.

Düşük molekül ağırlıklı Poli(3HB) doğal olarak insan kanında bulunur ve bu moleküller 3-hidroksibütirik asite ayrışır, bu ürün ise nontoksik ve biyoyumludur. (Misra ve arkadaşları, 2006). Poli(3HB) fare fibroblast hücre hattında, sıçan kondrosit, osteoblast ve gastrointestinal bölgede toksisite yaratmaz (Misra ve arkadaşları, 2006). PHB osteoblast, epitel hücreler ve adrenokortikal hücrelerle iyi biyoyumluluk gösterir (Wu ve arkadaşları, 2004; Shishatskaya, 2004).

2.10. Doku Mühendisliğinde PHA

Mevcut bilgiler PHA biyopolimerinin doku mühendisliğinde ve terapötik uygulamalar için canlı doku ürünlerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Polihidroksialkanoatlar biyoyumlu olmaları, değişebilen mekanik

özellikleri ve fizyolojik şartlar altında kontrol edilebilir biyobozunmaları ile doku mühendisliği ve medikal uygulamalar için umut vaat etmektedir. Farklı ve değiştirilebilir özellikleri ile PHA kardiyovasküler sistem, kornea, pankreas, gastrointestinal sistem, böbrek ve genitoüriner sistem kas-iskelet sistemi, sinir sistemi, deri, diş ve oral boşluk için potansiyel doku mühendisliği uygulamaları için iyi bir alternatiftir. Ayrıca son zamanlarda PHA ailesinin yeni bir sınıfı absorbe olabilen P(4HB)-türevli Tephaflex suture FDA (Food Drug Administration) tarafından onay almıştır.

Polihidroksialkanoatların farklı uygulamalarda kullanımları biyouyumluluklarının, mekanik özelliklerinin ve degradasyon hızlarının ayarlanması blend oluşturabilmelerine, yüzey modifikasyonuna ya da diğer polimerler, inorganik materyaller ve büyüme faktörleri ile kompozit oluşturmalarına bağlıdır.

2.11. Nanofiber Üretiminde PHB

Toksik yan ürün oluşturmayan, biyobozunur olan P(3HB) ve kopolimerleri birçok mikroorganizma tarafından sentezlenebilir. Bu çevre dostu biyopolimerler konvensiyonel biyobozunur olmayan materyallerin yerine geçtiler ve doku mühendisliğinde doku iskelesi, ilaç taşıyıcısı, implant materyali ve cerrahi suture olarak uygulama alanlarını genişlettiler.

Yüksek yüzey alanı-hacim oranı gösteren ultra ince polimerik fiberler elektrospinning yardımıyla hazırlanabilir. Bu karakteristik özellikler separasyon membranları, yara örtü materyalleri, yapay kan damarları, sensörler, kompozit materyaller gibi ileri uygulamalar için oldukça önemlidir.

Son zamanlarda bazı araştırmacılar mikroporöz biyobozunur ya da biyouyumlu doku iskelesi hazırlamak için çalışmaktadırlar. Örneğin elektrospinning yöntemi kullanılarak hazırlanan PLGA ultra ince fiberler 500-800 nm çap aralığı ile doğal dokudaki ekstraselüler matrikse morfolojik olarak benzerlik göstermektedir (Li, 2002).

3. Deneysel Çalışmalar

Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar başlıca dört ana bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde doku iskelesi hazırlamak üzere bakteriyel polimer olan PHB'nin üretimi gerçekleştirildi. Üretilen PHB'nin saflık miktarını ticari PHB ile karşılaştırmak için NMR kullanıldı.

İkinci bölümde doku iskelesi hazırlama yöntemlerinden biri olan dondurarak kurutma yöntemi ile geleneksel formda, elektrospinning yöntemi ile nano boyutta doku iskeleleri ticari ve bakteriyel PHB'den hazırlandı.

Üçüncü bölümde ise hazırlanan doku iskelelerinin yüzeyi plazma yöntemi ile (PEG ve EDA ile) modifiye edildi.

Çalışmanın son bölümünde ise dondurarak kurutma ve elektrospinning yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin mesane epitel hücreleri (human urinary bladder transitional cell carcinoma) ile etkileşimi incelendi.

3.1. Kimyasallar

Çalışmada doku iskelesi hazırlanmasında kullanılan PHB Sigma-Aldrich (Amerika) firmasından temin edildi. Plazma ile yüzey modifikasyonu için kullanılan polietilen glikol (PEG, Mw=400g/mol) Acros (Belçika) ve etilen daimin (EDA) Fluka, (ABD) firmalarından temin edildi. Hücre kültür deneyleri için, Tripsin-EDTA (Tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit), DMEM F-12 ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium") besiyeri ve Fetal Sığır Serum (FCS), DMSO (Dimetilsülfoksit), Tetrazolium Tuzu (MTT) Serva'dan (ABD) firmasından temin edildi. Çoklu kuyucuklu plaklar ve hücre kültür kapları Corning (Amerika) firmasından temin edildi.

Yapılan çalışmaların tamamında kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup herhangi bir ilave saflaştırma işlemine tabi tutulmadı.

3.2. PHB Sentezi

"*Alcaligenes eutrophus*" adlı bakteriden PHB sentezi için üreme ve polimer vasatı olmak üzere iki vasat hazırlandı. Söz konusu ortamlar ile eser elementlerin yer aldığı çözeltiler Çizelge 3.1-3.3.'te ayrıntılı olarak tanımlandı.

Çizelge 3.1. *Alcaligenes eutrophus* için zenginleştirilmiş besiyeri

Glukoz	10 g/lt
Yeast extract	2 g/lt
Pepton	2 g/lt
K ₂ HPO ₄	1 g/lt
KH ₂ PO ₄	1g/lt
(NH ₄)SO ₄	1 g/lt
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,05 g/lt

4x50 ml'lik üreme ortamı hazırlandı, pH'ı 7'ye ayarlandı ve otoklavlandı. Daha sonra ekim yapıldı ve 30 °C'de 2 gün çalkalamalı etüvde inkübe edildi.

Çizelge 3.2. *Alcaligenes eutrophus* için polimer ortamı

Sucrose	10 g/400 ml
KH ₂ PO ₄	0,6 g/400 ml
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	1,2 g/400 ml
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,08 g/400 ml
CoCl ₂ 2H ₂ O	0,004/400 ml

Çizelge 3.3. Eser element çözeltisi (bileşen miktarları litre çözelti başına verilmiştir)

FeSO ₄ 7 H ₂ O	20g
H ₃ PO ₄	0,3 g
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,2 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,03 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,03 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,03 g
NiSO ₄ 7H ₂ O	0,03 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,01 g

Polimer ve eser element ortamı hazırlandı. Sonra eser element ve polimer ortamları 1ml/1l oranında karıştırıldı. Bakteri süspansiyonu 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant atıldı. Altta kalan pelet polimer-eser element ortamına aktarıldı. Hazırlanan bakteri süspansiyonu 30°C'de 3 gün çalkalamalı etüvde inkübe edildi.

Polimer Ekstraksiyonu

- Polimer ortamındaki *Alcaligenes eutrophus*'lar santrifüj edilip -80°C'ye kaldırıldı.
- Her bir pelletin üzerine 5 ml sodyum hipoklorit (NaOCl) eklendi. Daha sonra vortekslendi ve 24 saat boyunca etüvde 37 °C'de inkübe edildi.
- Bakteri/NaOCl 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Peletin üzerine 5 ml su eklendi ve vortekslendi, 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

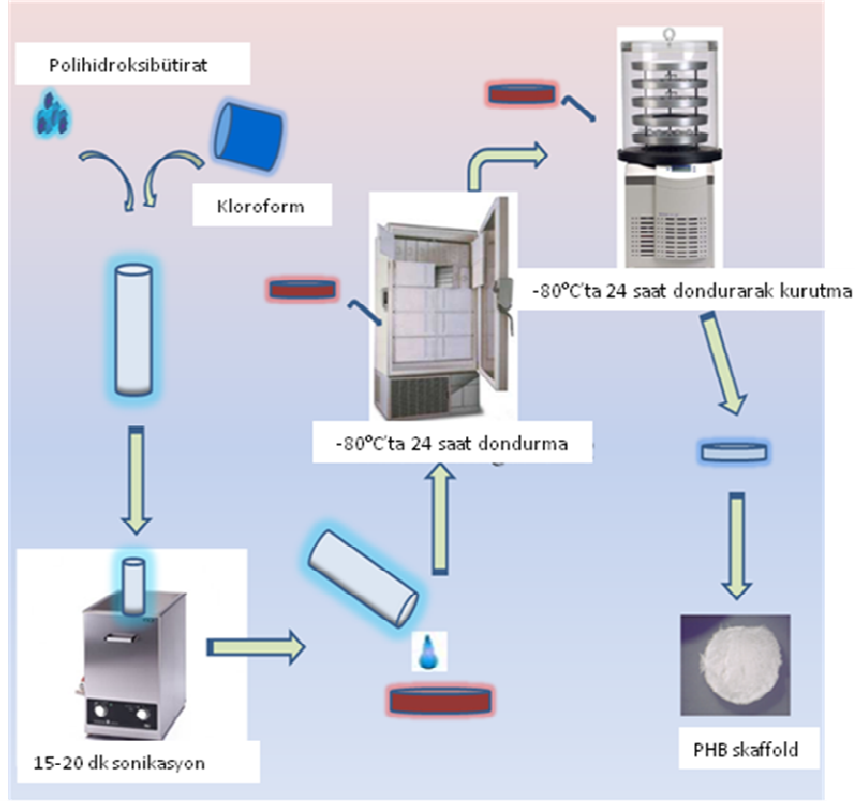
- Üstte kalan süpernatant uzaklaştırıldı. Peletin üzerine 5 ml kloroform eklendi ve tüpler 1 saat boyunca 37 °C'de rotorda karıştırıldı.
- Böylelikle hücresel atıklar sıvının üst kısmında toplandı ve mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
- Elde edilen PHA/kloroform çözeltisi -80 °C'ye kaldırıldı.
- Liyofilizatörde 1 gece bekletildi. Kalan hücresel atıkların uzaklaştırılması için metanolle yıkandı.

3.3. PHB Karakterizasyonu

Bakteriden üretilen PHB'nin saflık derecesini ticari PHB ile karşılaştırmak amacıyla karakterizasyon yöntemlerinden biri olan NMR kullanıldı. NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) spektrumları 400 Mhz ve 25 °C parametrelerinde çalıştırılan Bruker UltraShield 400 NMR spektrometresi (Almanya) ile elde edildi. Örnekler sıcak kloroform içerisinde çözülerek hazırlandı.

3.4. Geleneksel Doku İskelesinin Hazırlanması

Doku iskeleleri ticari ve bakteri kaynaklı PHB'den dondurarak kurutma (freeze-drying) yöntemi kullanılarak hazırlandı. %3 lük (w/v) solüsyon hazırlamak için 5 ml kloroformda 0,15 gr PHB çözüldü. Solüsyon, cam kaplara döküldü ve sırasıyla -80 °C'de ve liyofilizatörde 1 gece bekletildi. Böylece geleneksel doku iskeleleri hazırlanmış oldu (Şekil 3.1).



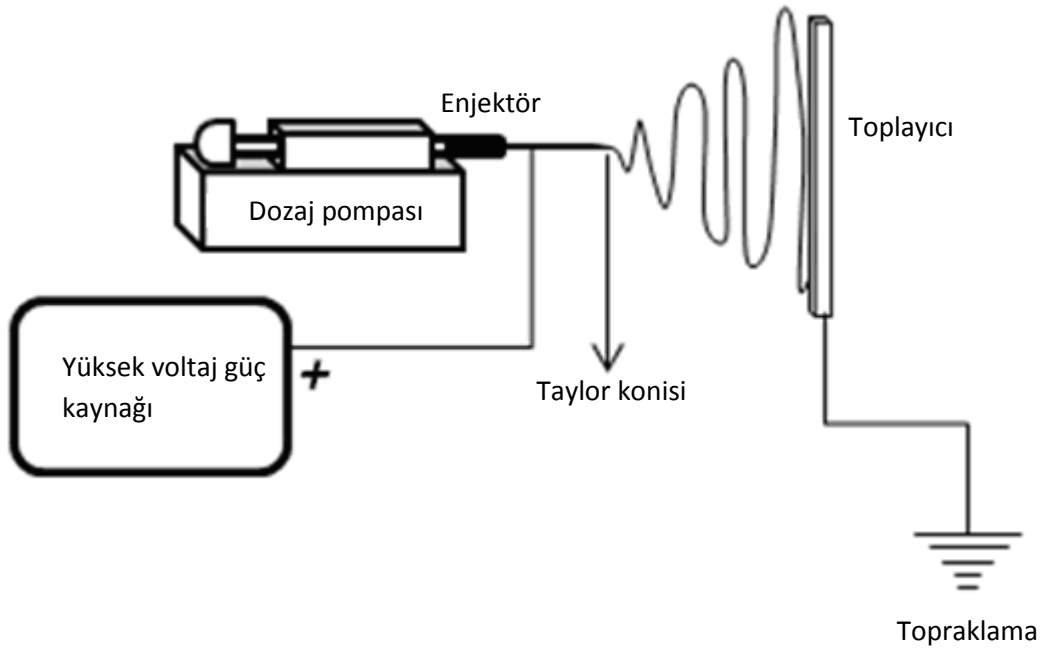
Şekil 3.1. Geleneksel PHB doku iskelesi hazırlama basamakları

3.5. Nanofibriler yapıların hazırlanması

Nanofibriler yapıların hazırlanmasında Spellman marka, CZE1000R model (0-30kV) yüksek voltaj kaynağı ve Goldman marka dozaj pompasının yer aldığı elektrospin düzeneği kullanıldı (Şekil 3.2.). Yapılan çalışmalar sonunda elde edilen optimum çalışma koşullarına göre; %5 lik polimer konsantrasyonunda, 17kV, 15 cm toplayıcı-iğne ucu arası mesafede, 20 ml/sa akış hızında PHB nanofibriler doku iskeleleri elde edildi.



Şekil 3.2. Nanofibriler PHB doku iskelesi hazırlanmasında kullanılan düzenek



Şekil 3.3. Basit bir elektrospin düzeneği

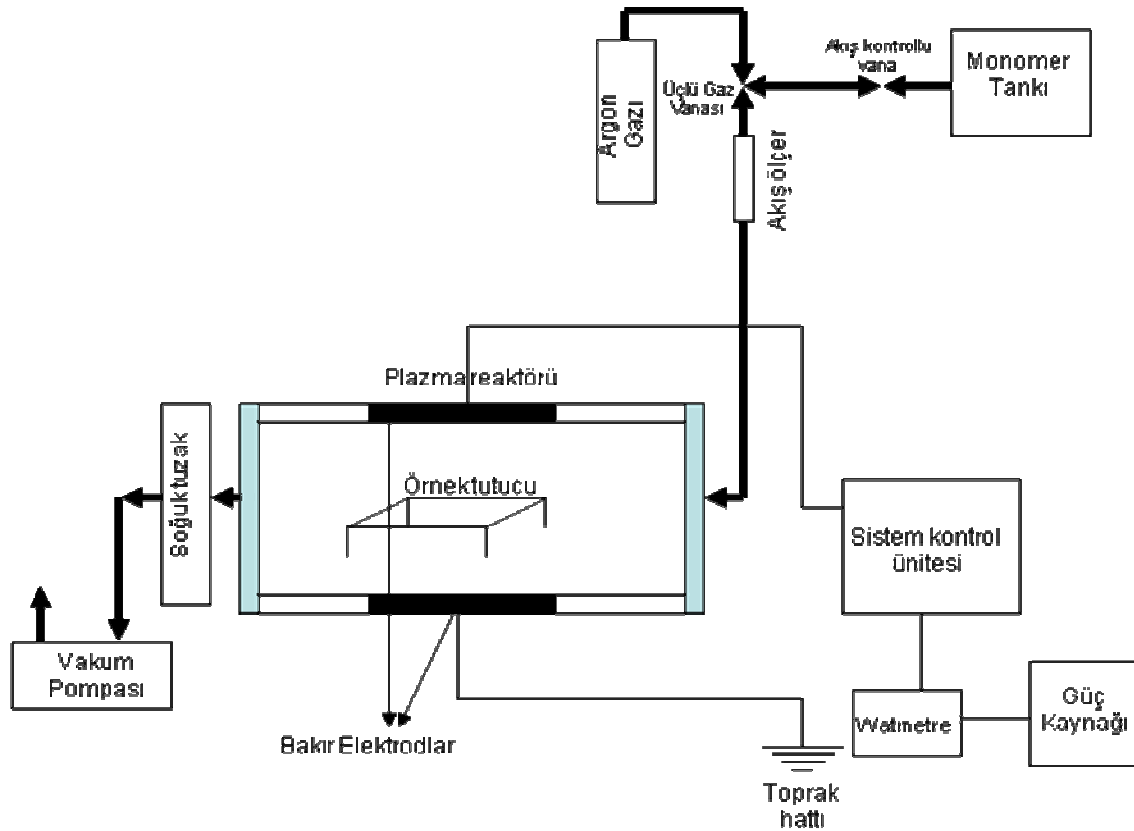
3.6. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Dondurarak kurutma ve elektrospinning yöntemi ile hazırlanan nanofibriler yapıdaki doku iskelelerinin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskopundan-SEM (ZEISS EVO 50 EP and ZEISS SUPRA 50 VP, Germany) yararlanıldı.

3.7. Doku İskelelerinin Yüzey Modifikasyonu

Dondurarak kurutma ve elektrospinning yöntemi ile hazırlanan PHB doku iskelelerinin hücre ile biyouyumluluklarını artırmak amacıyla radyo frekansı yük boşalım (RFGD) plazma polimerizasyon tekniği kullanılarak modifiye edildi. Plazma polimerizasyon sistemi olarak 13.56 Mhz radyo frekans jeneratörü ve içerisinde biri jeneratörün empedans ünitesine, diğeri toprak hattına bağlı olan iki bakır elektrot bulunan reaktöre sahip Vakum Praha (Çek Cumhuriyeti) plazma modifikasyon sistemi kullanıldı. Plazma reaktörü, reaktör gazını boşaltması için 1×10^{-4} mbarlık vakum pompasına bağlandı. İşlem süresince reaktör, monomer tankı ve argon gazı ile beslendi. Plazma polimerizasyon sisteminin şematik gösterimi Şekil 3.4.'de verildi.

Dondurarak kurutma ve elektrospinning yöntemi ile hazırlanan PHB doku iskelelerinin yüzey modifikasyonunda 30 W güç kullanılarak polietilen glikol (PEG) ve 50 W güç kullanılarak etilen diamin (EDA) kaplamaları aşağıdaki prosedüre göre yapıldı.



Şekil 3.4. Plazma polimerizasyon sisteminin şematik gösterimi

Plazma polimerizasyonu ile yüzey modifikasyon prosedürü (Akdoğan E. 2005)

- Örnekler bakır elektrotların ortasında olacak şekilde örnek sehpası üzerine yerleştirildi ve reaktörün kapakları sızdırmazlık sağlanacak şekilde kapatıldı.
- Vakum pompası çalıştırıldı ve reaktör içerisindeki basınç 0,14-0,16 mbar'a düşürüldü.
- Reaktör içerisinde kalan oksijen ve azot atomları gibi reaktiflerin süpürülmesi için sistemden 10 dakika inert azot gazı geçirildi.
- Homojen plazmanın sağlanabilmesi için gerekli olan 0,16 mbar'lık basınç tekrar sağlandı.
- Reaktör içerisine monomer beslendi ve işlem sadece monomer varlığını sağlamak için 10 dakika daha devam ettirildi.
- İstenilen güç ayarlanarak RF jeneratörü çalıştırıldı ve 10 dakika boşalım sağlandı.
- İşlem sonrasında jeneratör kapatıldı ve reaktör içerisindeki polimer yüzeyine tutunabilecek monomer ve radikal kalıntıları için sistemden 10 dakika argon gazı geçirildi.
- Son olarak örnekler 10 dakika vakum altında tutuldu ve cihazdan alınarak analizler için kapalı kaplarda saklandı.

3.8. Mekanik Testler

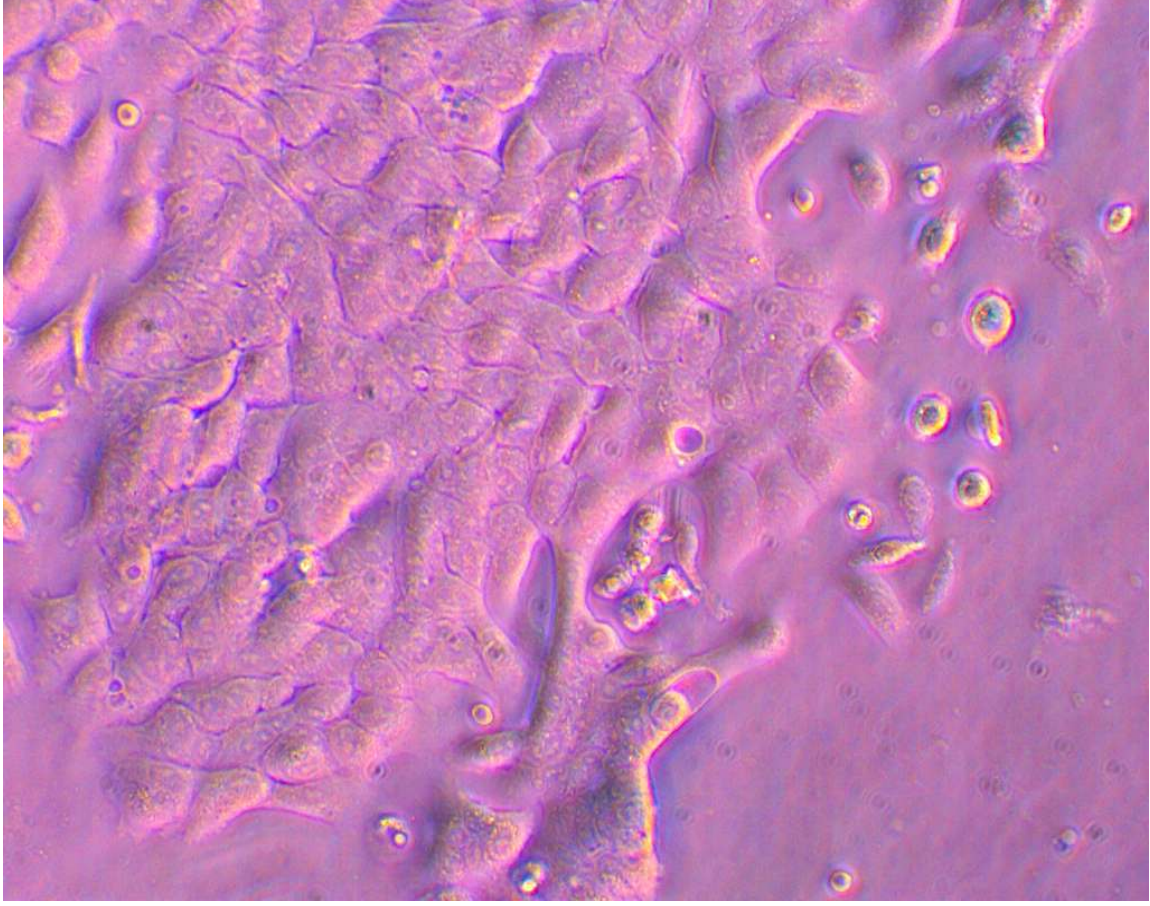
Zwick Z010 mekanik test cihazı, ticari ve sentez nanofibriler doku iskelelerinin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde kullanıldı. 10 kN kuvvette çalışıldı.

3.9. Biyolojik Uyum Testleri

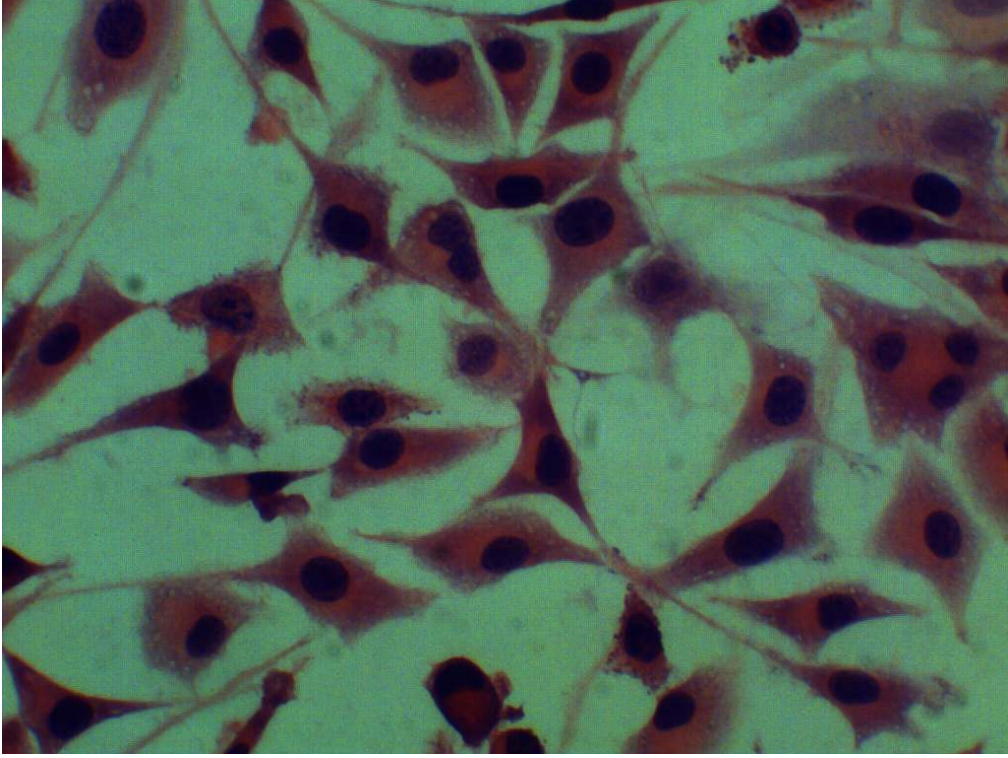
3.9.1 Mesane Epitel Hücrelerinin İzolasyonu

Yapılan çalışmada kullanılan, mesane epitel hücreleri (human urinary bladder transitional cell carcinoma) kanserli mesane dokusundan izole edildi. Bunun için doku mekanik olarak parçalandı. Elde edilen doku parçaları hücre kültür kaplarına kondu. Üzerlerine 1 ml besi yeri eklendi. Bir gece etüvde bekletildi. Ertesi gün

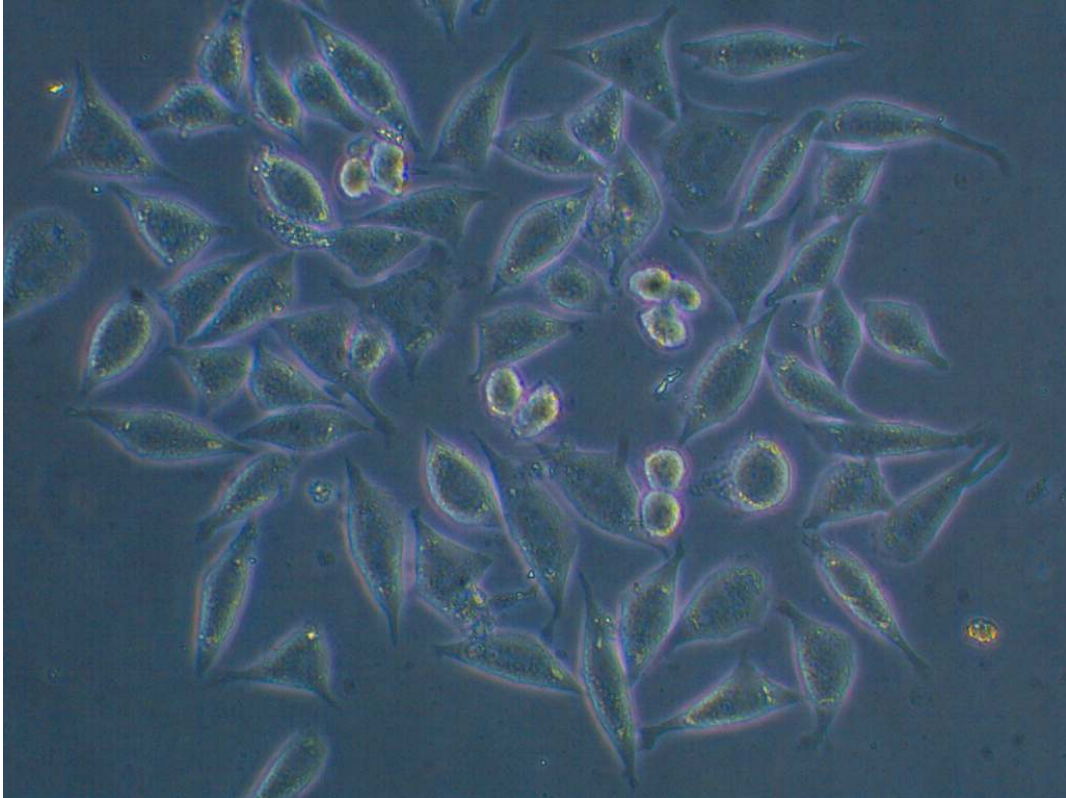
hücre költür kaplarına 1 ml daha taze besiyeri eklendi. Hücreler konfokal ışık mikroskobunda takip edildi. Yaklaşık 2 hafta içerisinde hücreler izole oldu (Şekil 3.5.). Hücre karakterizasyonu için hücreler plazma polimerizasyonu ile EDA kaplanmış bakteri lamında 3 gün költüre edildi ve hematoksilin-eozin ile boyandı (Şekil 3.6.).



Şekil 3.5. İzole edilmiş mesane epitel hücreleri.



şekil 3.6. Hematoksilen-eozin ile boyanmış mesane epitel hücreleri



şekil 3.7. Kltre edilen mesane epitel hücreleri

3.9.2. Hücrelerin Hazırlanması

Çizelge 3.4'de verilen koşullara göre mesane epitel hücreleri hücre kültür ortamlarında çoğaltıldı. İki günde bir ortam değiştirildi. Hücreler, hücre kültür kabı zeminini kapladıklarında 1/3 pasaj yapıldı. Mantar ve bakteri kontaminasyonlarına karşı her gün mikroskopik incelemeye tabi tutuldu.

Çizelge 3.4. Mesane epitel hücrelerinin hücre kültür ortamında çoğaltılması

Hücre Türü:	Değişken epitel hücreleri
Kültür kabı:	25 cm ³ 'lük polistren flask (yüzeyi hücre yapışmasına uygun)
Kültür vasatı:	%10 Fetal sığır serumu içeren DMEM-F12; %1 penisilin-streptomisin, %1 human insulin, %1EGF
Rutin sub-kültür:	1/3
Kültür özelliği:	Monolayer
Toplam hacim:	5 ml
pH:	7,2-7,5
Sıcaklık:	37±0,5°C
İnkübasyon ortamı:	% 5'lik CO ₂ etüvü

3.9.3. Sitotoksisite Testi (MTT)

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoluim bromide; Thiazolyl blue) testi hücre canlılığının ve böylelikle sitotoksisitesinin kolorimetrik olarak ölçülebileceği bir testtir.

Bakteriyel ve ticari PHB'den elektrospinning ve geleneksel yöntem ile üretilen doku iskelelerinin (plazma yöntemi ile PEG ve EDA kullanılarak yüzeyleri modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş doku iskeleleri) degradasyon ürünlerinin mesane epitel hücreleri üzerine sitotoksik etkileri (indirek sitotoksisite) incelendi. Bunun için mesane epitel hücreleri 96 kuyucuklu plağa ekildi. Plak bir gece etüvde inkübe edildi. Doku iskeleleri UV ışık altında 20 dakika steril edildikten sonra hücre kültür

vasatı (0,2 gr scaffold/ 1ml vasat) ile farklı sürelerde inkübe edildi. İnkübasyon 37°C, %5 CO₂'li etüvde gerçekleştirildi. İnkübasyondan sonra 96 kuyucuklu plaktaki vasat atıldı ve hücrelerin üzerine doku iskeleleriyle etkileştirilmiş vasat 200µl pipetlendi. Plak 24saat etüvde inkübe edildi. Daha sonra plaktaki vasat atıldı ve kuyucuklara 100µl taze vasat ve 13µl MTT solüsyonu (5µg/ml, fenol-red içermeyen RPMI 1640 ile seyreltildi) ilave edildi. 4 saat karanlıkta, etüvde inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki vasat ve MTT solüsyonu kibarca döküldü ve kuyucuklara 200µl 0,04M HCl içeren saf izopropanol pipetlendi. 30 dakika bekletildikten sonra plak 570 nm'de ELISA okuyucusunda okutuldu.

MTT testi hücre canlılığının tespiti için kullanılan bir testtir. Polimerik yapıların sitotoksik olup olmadıkları veya sitotoksosite oranları bu test ile saptanabilir. Yapılan MTT testinde, plağın ilk sütunundaki sekiz kuyucuk kontrol olarak kullanıldı ve her bir doku iskelesi sekiz tekrarlı olarak çalışıldı. Kontrol plağından alınan absorbansların ortalaması %100 kabul edildi, test kuyucuklarından alınan absorbansların ortalamaları ile mukayese edildi ve polimerlerin toksisiteleri bulundu. Örneğin modifiye edilmemiş bakteriyel kaynaklı PHB'den elektrospinning ile elde edilen doku iskelesinin absorbansı 0,502'dir. Kontrol kuyucuklarından ise 0,521 absorbans alındı. Buna göre;

0,521 %100

0,502 x

X: %96,2

Buna göre modifiye edilmemiş bakteriyel kaynaklı PHB'den elektrospinning ile elde edilen doku iskelelerinin degradasyon ürünleri %3,8 toksiktir.

3.9.4. Hücre Çoğalma Oranı Testi

Bu çalışma ile hazırlanan doku iskelelerine yapışan hücre sayısı incelendi.

Testin Yapılışı:

- Doku iskeleleri 0,5 cm çapında kesildi. UV ışığı altında 20 dakika steril edildi. Birkaç kez taze hazırlanmış hücre kültür vasatı ile yıkandı. Üzerlerine 50µl hücre ekildi. Hücre kültür plakları 37°C'de karbondioksitli etüvde inkübe edildi. 2 saat sonra her bir kuyucuğa 150µl taze vasat ilave edildi. Bir gece etüvde

inkübe edildi. İnkübasyondan sonra doku iskeleleri başka bir plağa alındı. Doku iskeleleri hücre atıldıktan sonra 1, 3, 6, 8 ve 10. günlerde alındı ve PBS ile birkaç kez yıkandı. Üzerlerine 50µl MTT solusyonu (5gr/ml) eklendi. 4 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra doku iskeleleri üzerine 200µl HCl içeren izopropanol eklendi. Solüsyon 570nm'de ELISA okuyucusunda okutuldu.

- Aynı zamanda modifiye edilmiş ve edilmemiş, geleneksel ve nanofibriler doku iskeleleri hücre ile etkileştirilmeksizin yukarıda anlatılan işlemlerden geçirildi ve elde edilen çözeltinin absorbanı 570 nm'de UV spektrofotometrede ölçüldü. Elde edilen absorban 0.02'dir ve diğer çalışmalar değerlendirilirken ihmal edilmiştir.

4. Deneysel Bulgular ve Tartışmalar

4.1. Bakteriyel Esaslı PHB Sentezi

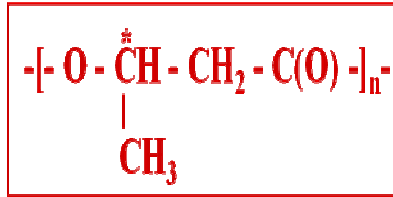
Bu aşamada ‘*Alcaligenes eutrophus* (DSM 545)’ adlı bakteri suşundan PHB sentezlendi.

4.1.1. Bakteriyel Esaslı PHB Polimerinin Karakterizasyonu

Sentezlenen PHB’nin moleküler yapısı incelendi. Elde edilen bakteri kaynaklı ve ticari PHB’nin NMR(¹H-NMR) sonucu Şekil 4.2 ve 4.3’de verildi.

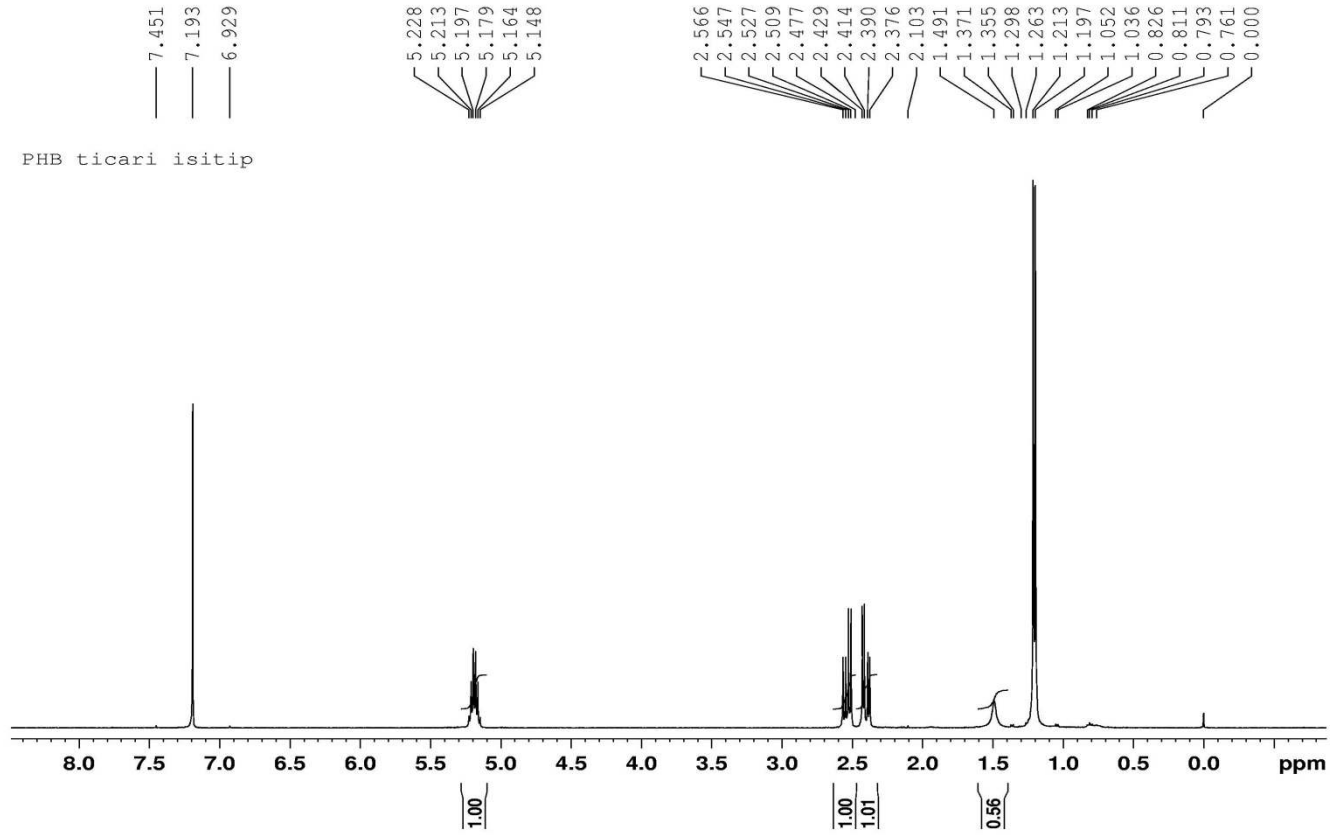
Ticari PHB’de 7.2, 5.2, 2.6, 2.4, 1.5 ve 1.2 ppm’deki pikler sentez PHB ile karşılaştırıldığında birebir örtüşmektedir.

NMR sonuçları göz önüne alındığında sentezlenen bakteriyel PHB’nin saflığının oldukça yüksek olduğu görüldü.

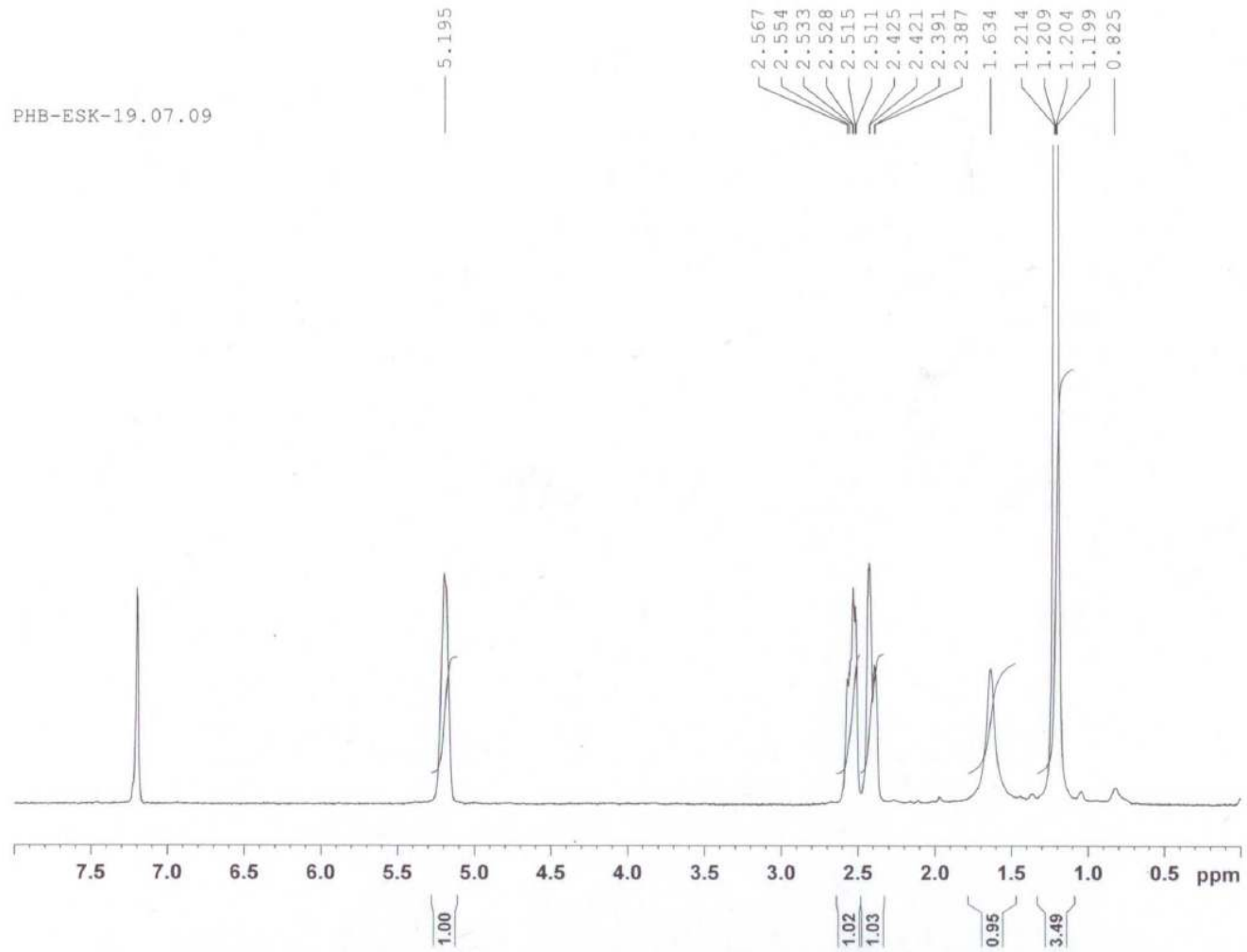


Şekil 4.1. PHB moleküler yapısı

Deneysel Bulgular ve Tartışmalar



Şekil 4.2. Ticari PHB (polihidroksibütirat) ^1H -NMR spektrumu



Şekil 4.3. Sentezlenen PHB (polihidroksibütirat) polimerinin ^1H -NMR spektrumu

4.2. Ticari PHB'den Doku İskelesi Hazırlanması

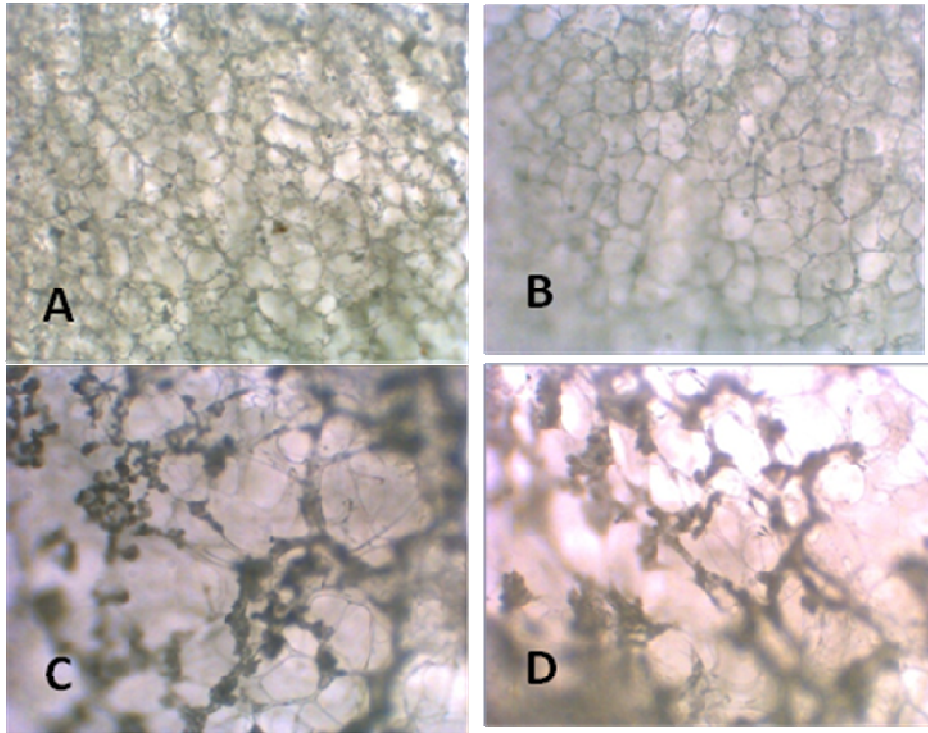
4.2.1. Dondurarak Kurutma Yöntemiyle Doku İskelesi Hazırlanması

Ticari polimerden dondurarak kurutma yöntemiyle doku iskeleleri elde edildi, optik mikroskop ve SEM görüntüleri alındı.



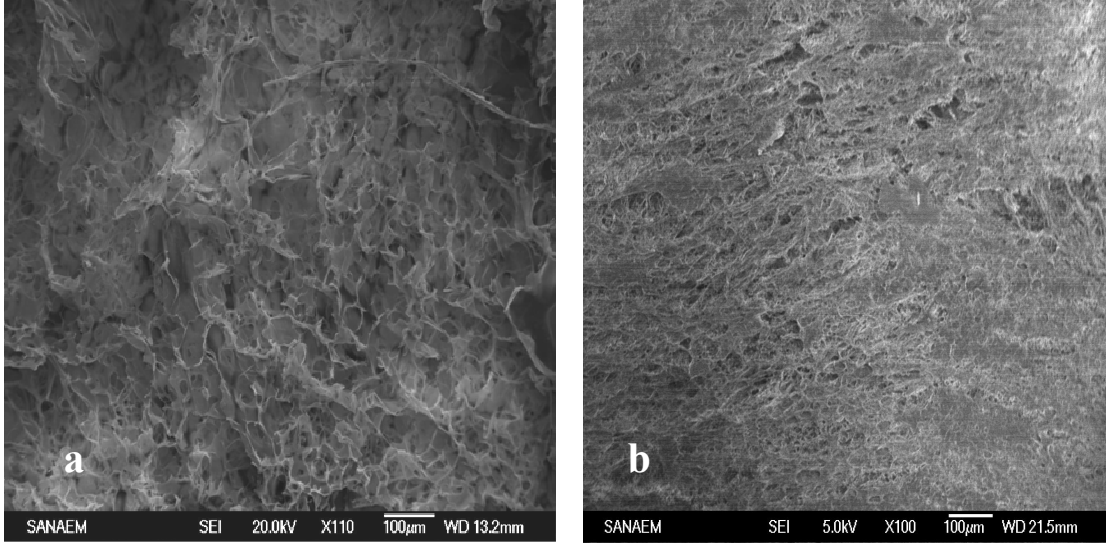
Şekil 4.4. Dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanan doku iskeleleri

Optik mikroskop altında elde edilen görüntülerde doku iskelelerinin birbiriyle bağlantılı eş dağılımlı gözeneklere sahip olduğu görüldü (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. %3 polimer konsantrasyonunda PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü (A ve B fotoğrafları 10X20, C ve D 10X40)

PHB doku iskelelerinin SEM görüntülerinde ağıs ve homojen bir por dağılımına ve yüksek poroziteye sahip olduğu görüldü. Birbirleriyle bağlantılı olan por yapısı ve yüksek yüzey alanı, hücre yapışması ve vaskülarizasyon için istenen özelliklerdendir (Jiang, 2008).

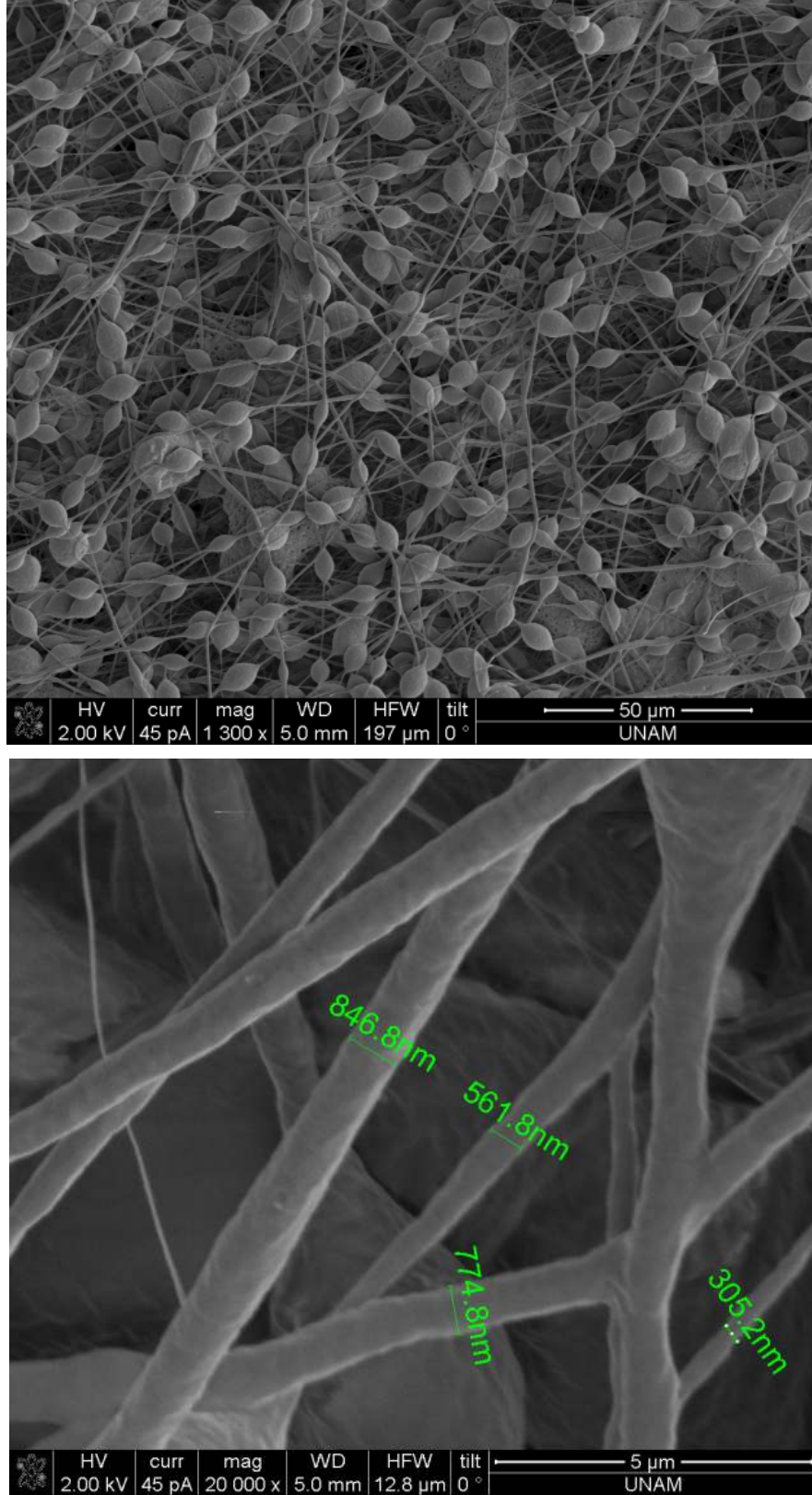


Şekil 4.6. %3 polimer konsantrasyonunda PHB doku iskelesinin SEM görüntüsü a) yandan b) yüzeyden

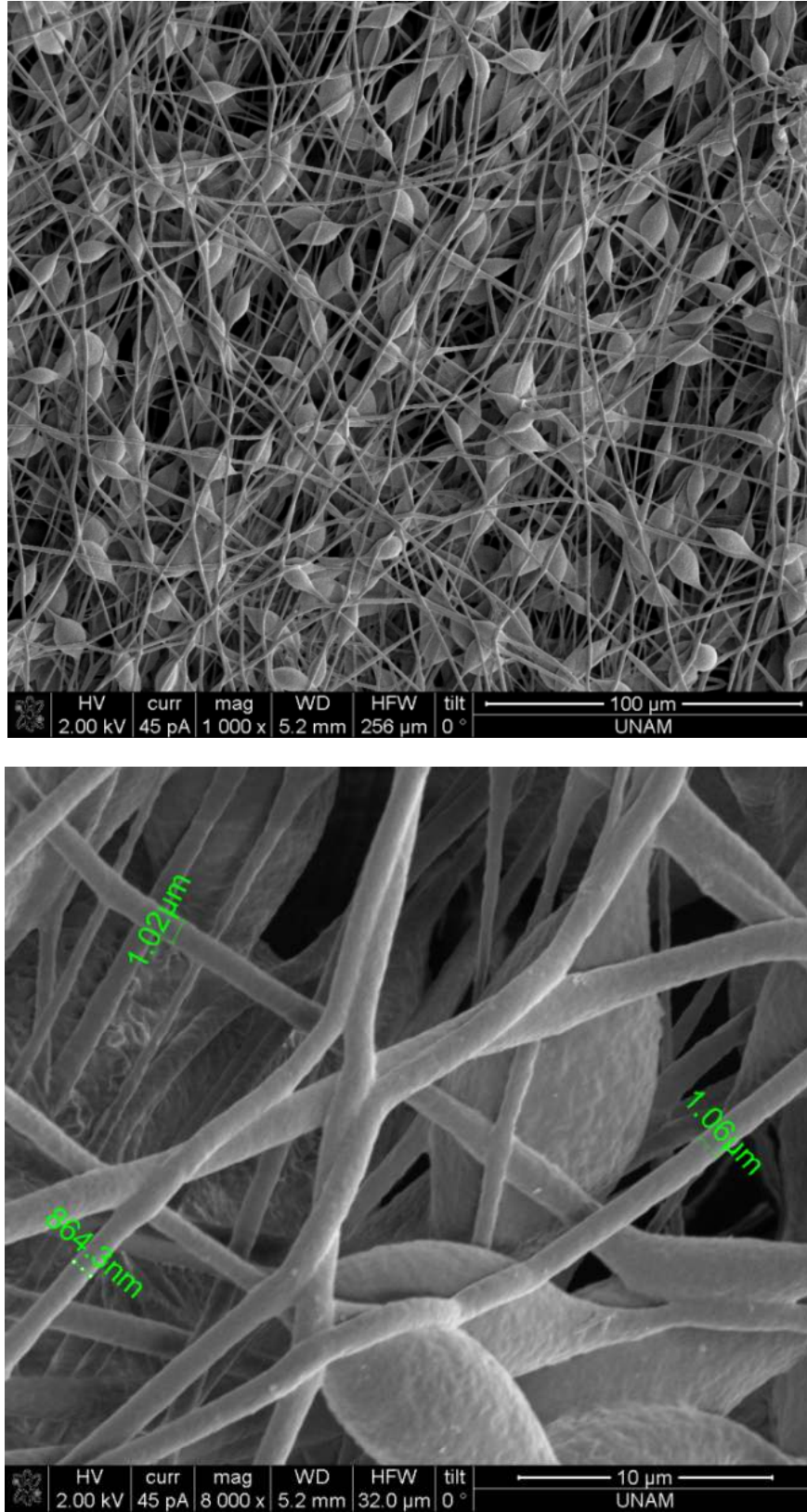
4.2.2. Nanofibriler Yapıda Doku İskelelerinin Hazırlanması

Elektrospinning yöntemi ile nanofibriler yapı üretiminde, fiber çapı polimer konsantrasyonuna dolayısıyla polimer çözeltisinin viskozitesine bağlıdır. Polimer konsantrasyonu arttıkça çözelti viskozitesinin ve elde edilen fiber çapının arttığı bilinmektedir (Megelski, 2002).

Bu çalışmada %5 ve %7'lik konsantrasyonlarda ticari PHB nanofibriler yapılar hazırlandı. %5 ve %7'lik yapılar karşılaştırıldığında; %7'likte fiber çapının %5'liğe göre daha fazla olduğu ve aynı zamanda boncuksu yapıların da azaldığı görüldü. Örneğin %5 konsantrasyonunda fiber çapı 300-800 nm civarında iken, %7'likte 800nm-1µm aralığında olduğu görüldü.



Şekil 4.7. %5 polimer konsantrasyonunda, %100 CHCl₃, 0,5 ml/dk, 20 cm, 17kV parametrelerinde elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü

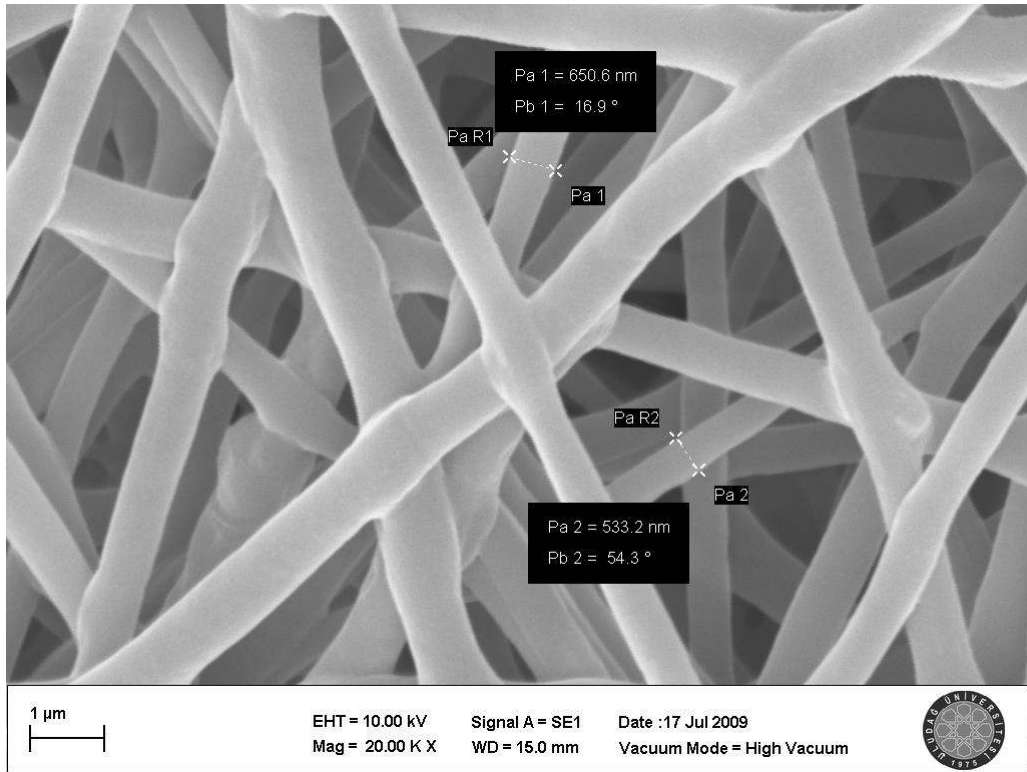
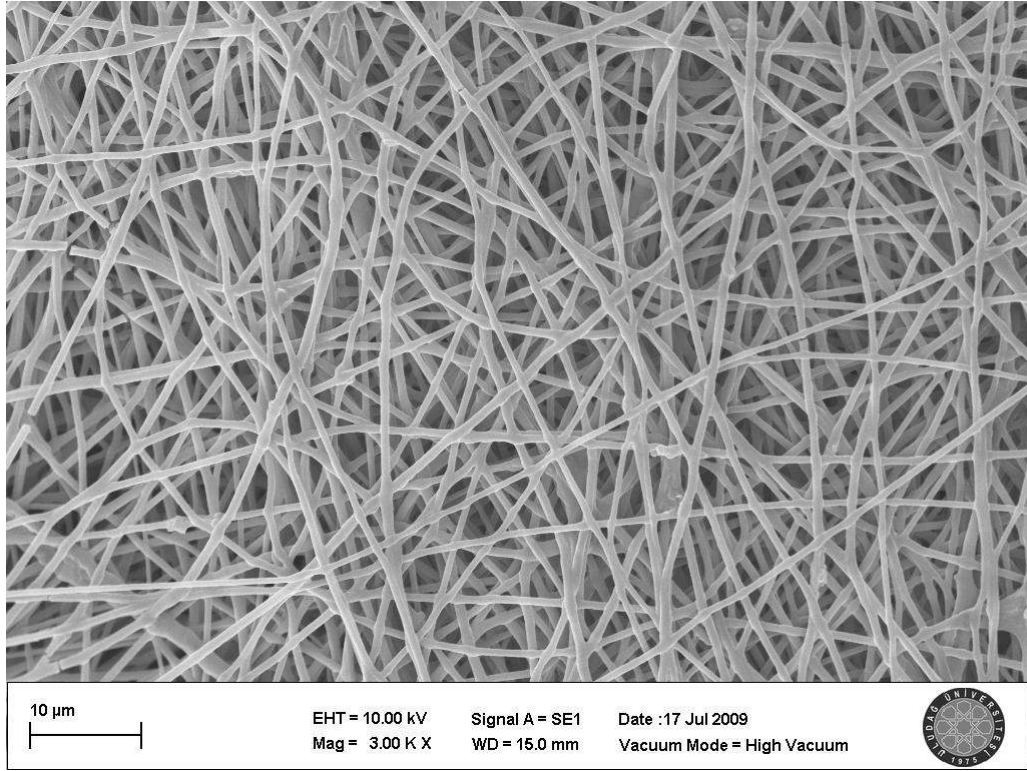


Şekil 4.8. %7 polimer konsantrasyonunda, %100 CHCl_3 , 0,5 ml/dk, 20cm, 15 kV parametrelerinde elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü

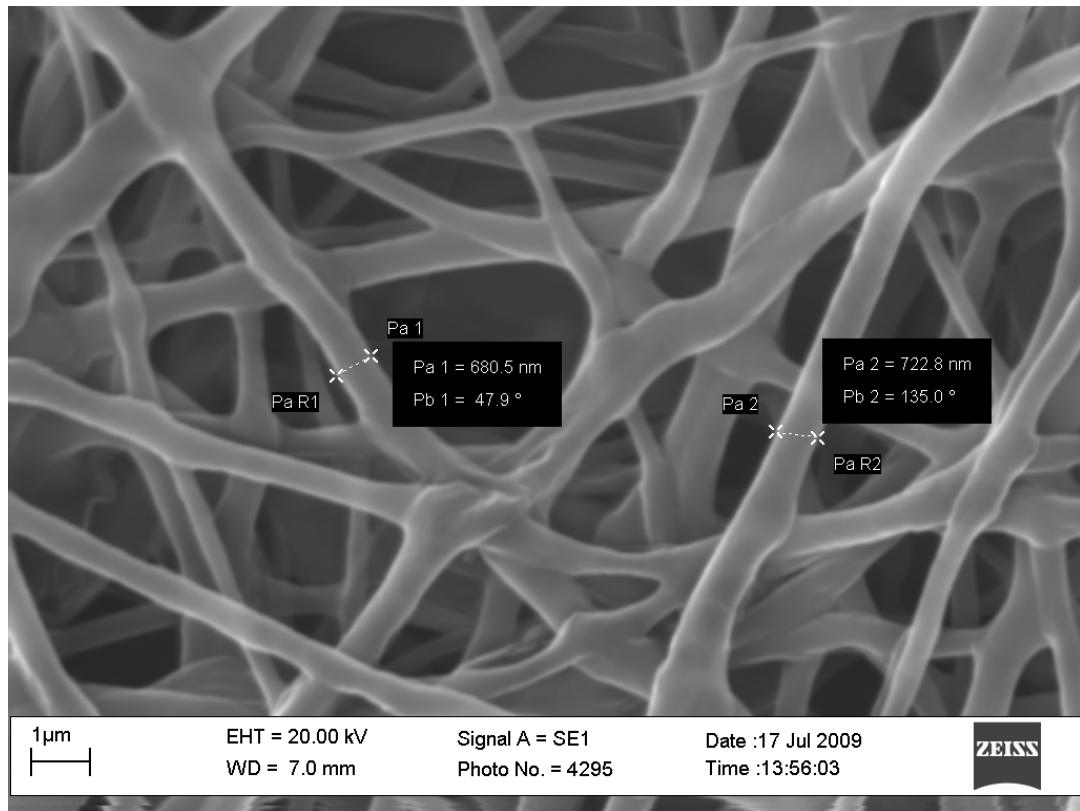
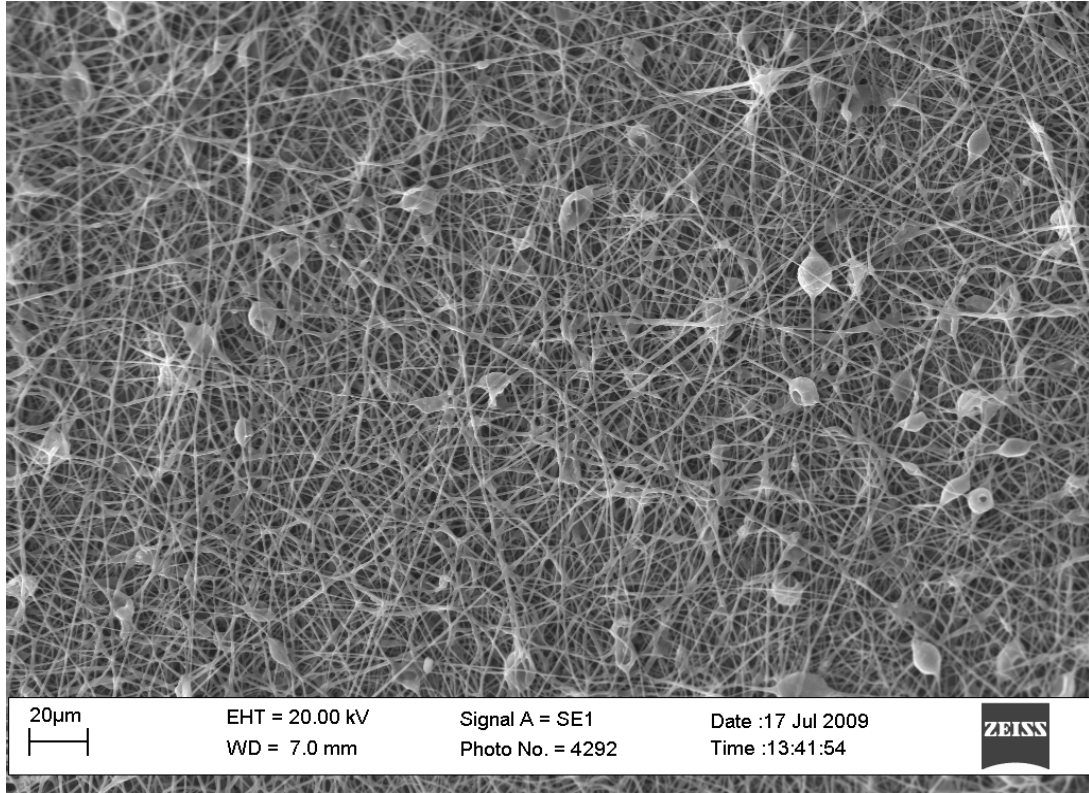
Ancak polimer konsantrasyonunu arttırmakla boncuksu yapılar tam olarak giderilemedi. Boncuk şekillerine bakıldığında sorunun polimer konsantrasyonu ile ilgili olduğu sonucuna varıldı. Sadece kloroform kullanılarak hazırlanan yüksek polimer konsantrasyonundaki çözeltinin kapiler tüpte sıklıkla tıkanmalara yol açtığı ve jet oluşumunu engellediği gözlemlendi.

Literatürde daha yavaş çözücü buharlaşmasını sağlayan ve polimer solüsyonunun elektrospinlenebilirliğini arttıran DMF(dimetilformamid)'in kloroforma (CHCl_3) bir kosolvent olarak eklendiği çalışmalar mevcuttur (Cheng, 2008). Bu bilgilerden yola çıkılarak %20 DMF/%80 CHCl_3 ve %5 DMF/%95 CHCl_3 oranlarında nanofibriler yapıda doku iskeleleri hazırlandı.

DMF eklenerek hazırlanan doku iskelelerinde, DMF miktarındaki artış fiber çapında önemli oranda azalmaya neden oldu. %20 DMF/%80 CHCl_3 oranında hazırlanan nanofibriler yapıların çapları 500-600 civarında iken %5 DMF/%95 CHCl_3 'de fiber çapı 700 nm oldu. Aynı zamanda DMF'nin yüksek yüzdelerinde boncuk oluşumunun engellendiği de görüldü. İlgili literatürde de benzer sonuçlar ve yorumlar vardır (Cheng, 2008).



Şekil 4.9 % 5 polimer konsantrasyonunda, 15 kV, 0,7 ml/dk, 20 cm, %20 DMF/%80 CHCl_3 parametrelerinde elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü

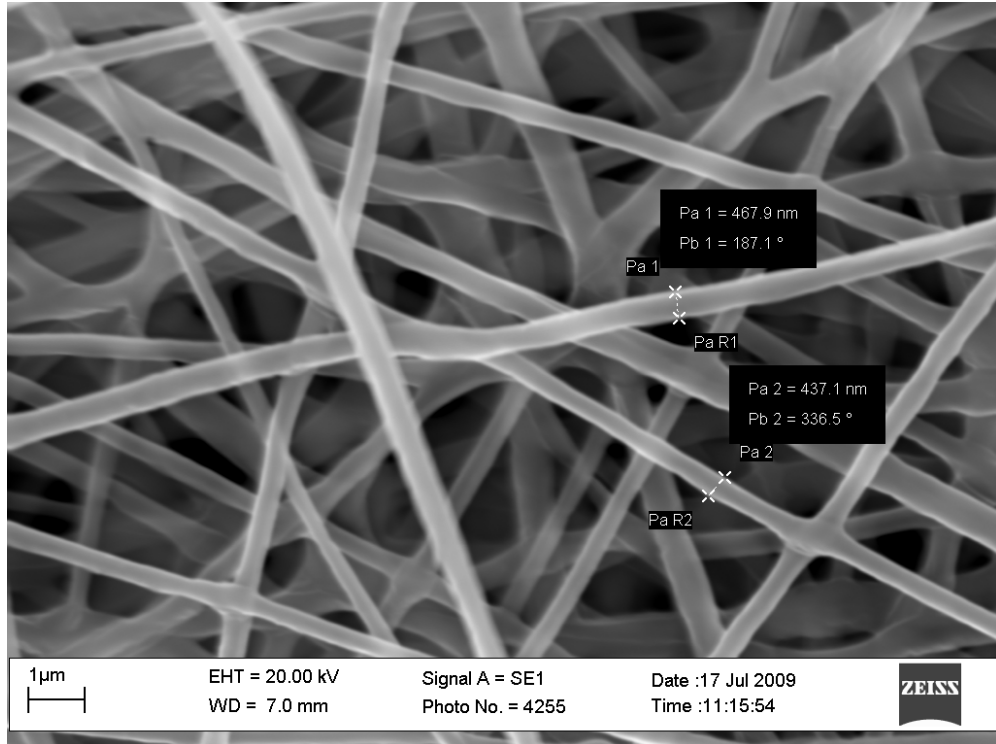
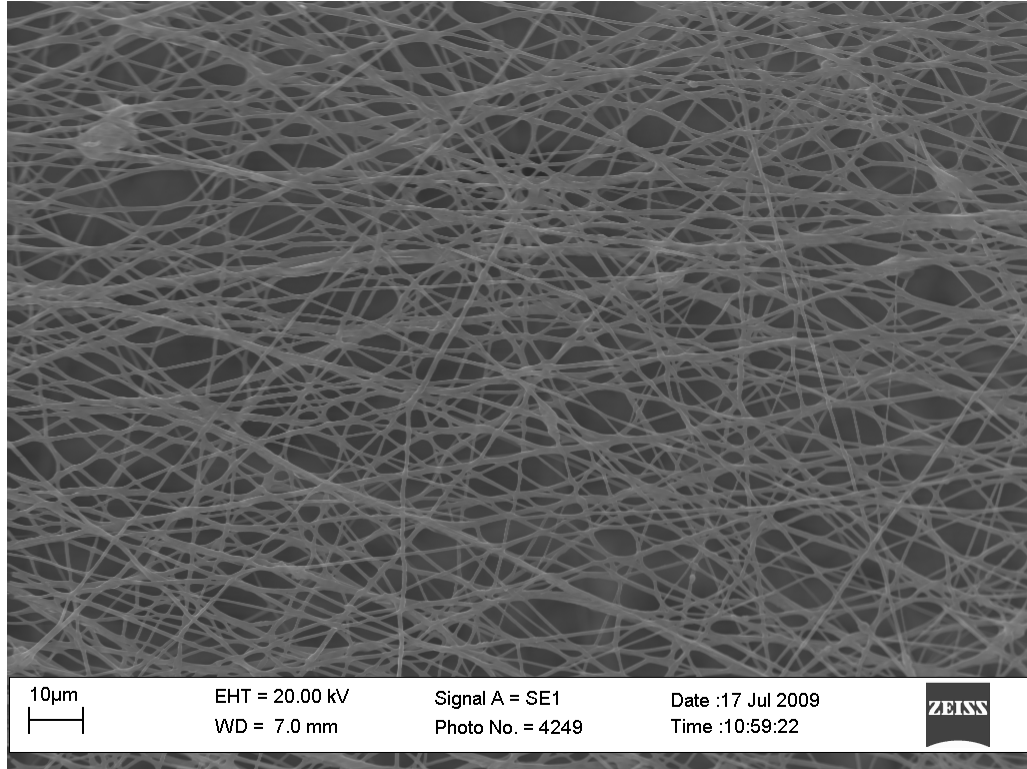


Şekil 4.10. %5 polimer konsantrasyonunda, 21 kV, 12 ml/sa, 20 cm, %5 DMF/%95 CHCl₃ parametrelerinde elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü

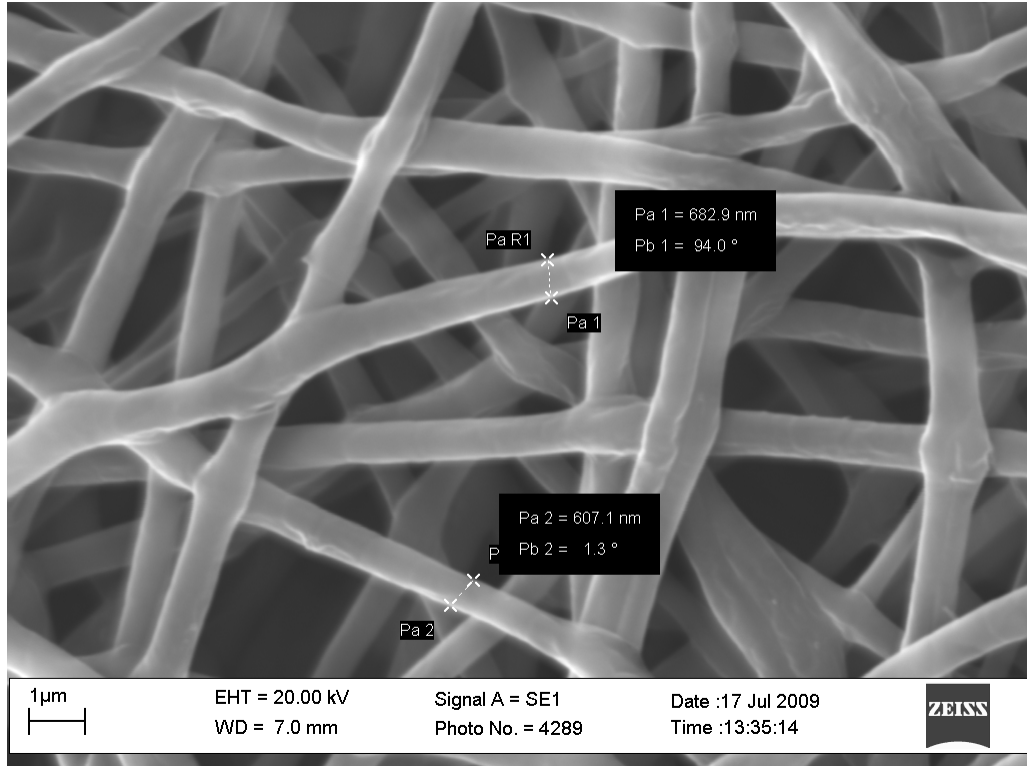
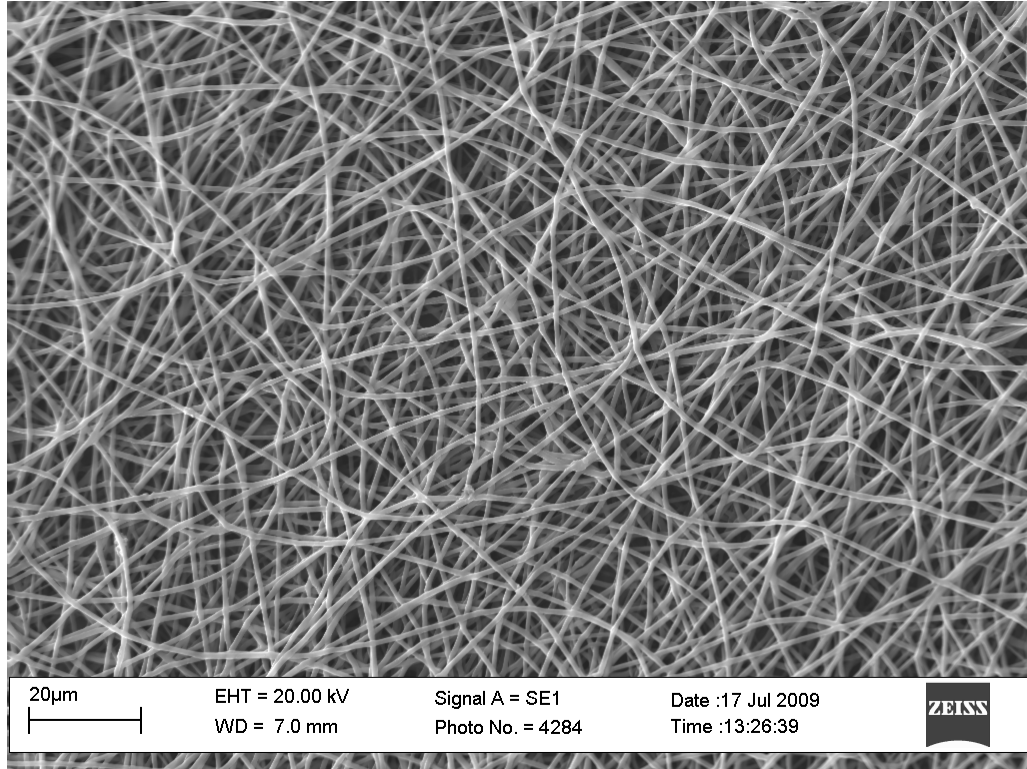
Literatürde PHA nanofiber ile yapılan çalışmalarda, polihidroksibütirat-ko-valerat (PHBV) polimer çözücüsüne alkol eklenmesiyle iletkenliğin arttığı, bunun sonucu olarak daha düz ve daha az boncuksu yapıların elde edildiği görüldü (Zuo, 2005). Çözeltiye etanol eklenmesi ile viskozitenin arttığı ve yüzey geriliminin azaldığı bilinmektedir. Bu etki daha düzgün fakat daha kalın filament oluşumuna izin verir. Etanol eklenmesiyle çözücü daha kolay buharlaşmakta, viskozite artmakta ve boncuk oluşum hızı azalmaktadır (Kozanoğlu, 2006).

Bu bilgilerden yola çıkılarak farklı etanol konsantrasyonlarında [%25 CHCl_3 /%75 etanol, %35 etanol/%65 CHCl_3] hazırlanan doku iskeleleri Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmiştir. % 5 polimer konsantrasyonunda, 9 kV, 20 ml/sa, 20 cm, %35 etanol/%65 CHCl_3 parametrelerinde elde edilen ortalama nanofiber çapları 600 nm civarında iken %5 polimer konsantrasyonunda, 17 kV, 20 ml/sa, 15 cm, %25 CHCl_3 /%75 etanol parametrelerinde elde edilen nanofiberler 450 nm civarındadır. Sonuç olarak çözücüye etanol eklenmesi boncuk oluşumunu engellemiş ancak etanol miktarını arttırdığımızda fiber çapının da arttığı gözlemlendi. Literatürde bu yönde bilgiler de mevcuttur (Fong, 1999; Kozanoğlu, 2006).

Yapılan çalışmalar arasında çözücüye etanol eklenerek hazırlanan matrikslerdeki fiberlerin diğer gruplara göre çap ve boncuk oluşumu açısından daha iyi olduğu sonucuna varıldı. Etanol eklenerek hazırlanan matriksler için en uygun akış hızı, voltaj, mesafe ve konsantrasyon belirlendi. Ticari ve sentez PHB kullanılarak %5 polimer konsantrasyonunda %25 CHCl_3 /%75 etanol, 17 kV'da, 20ml/sa akış hızında, 15 cm mesafede hazırlanan doku iskeleleri deneylerde kullanıldı.



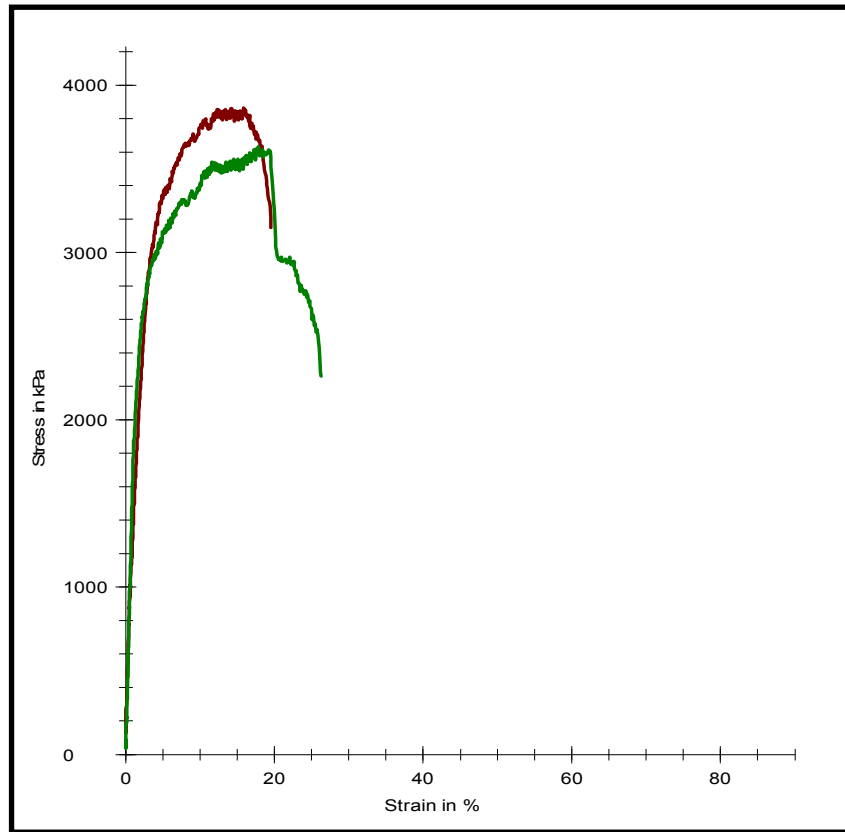
Şekil 4.11. %5 polimer konsantrasyonunda, 17 kV, 20 ml/sa, 15 cm, %25 CHCl₃/%75 etanol parametrelerinde elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü



Şekil 4.12. % 5 polimer konsantrasyonunda, 9 kV, 20 ml/sa, 20 cm, %35 etanol/%65 CHCl₃ parametrelerinde elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü

4.3. Ticari PHB'den Hazırlanan Nanofibriler Doku İskelelerinin Mekanik Dayanıklılığı

Bu deneyde %5'lik %25 etanol/%75 CHCl₃, 17 kV'da, 20ml/sa akış hızında, 15 cm mesafede hazırlanan doku iskeleleri 8 cm uzunluğunda, 2 cm eninde, 0.5 mm kalınlığında kesildi. Ticari PHB'den hazırlanan nanofibriler doku iskelesinin çekme-uzama grafiği Şekil 4.13'de verildi.



Şekil 4.13. Ticari PHB'den Hazırlanan Nanofibriler Doku İskelelerinin Çekme-Uzama Grafiği

Ticari PHB'den hazırlanan nanofibriler doku iskelesinin elastik modülü 88 MPa, çekme dayanımı 3,6 MPa olarak bulundu.

4.4. Ticari PHB'den Hazırlanan Doku İskelelerinin Biyouyumluluk Testleri

4.4.1. Dondurarak Kurutma Yöntemiyle Hazırlanan Doku İskelelerinin Sitotoksitesisi (MTT)

Bu çalışmada 3.4'de anlatıldığı gibi dondurarak kurutma yöntemi ile doku iskeleleri elde edildi. Elde edilen doku iskelelerinin mesane epitel hücrelerine toksisitesi incelendi. Sonuçlar Çizelge 4.1'deki gibidir. Bu sonuçlara göre 5. gün sonunda modifiye edilmemiş PHB doku iskelesi ile etkileştirilen hücrelerde % 85.3; EDA modifiye doku iskelesi ile etkileştirilen hücrelerde %82; PEG modifiye doku iskelesi ile etkileştirilen hücrelerde de %80.9 canlılık gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. Modifiye edilmiş (EDA-PEG) ve modifiye edilmemiş dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan ticari PHB doku iskelelerinin mesane epitel hücreleri üzerine etkileri

Ticari PHB'den Dondurarak Kurutma Yöntemi İle Elde Edilen Doku İskelesinin Sitotoksitesite Sonuçları			
		Ortalama Absorbans \pm STD	%Canlılık
	Kontrol	0.419 \pm 0.01	100
1Gün	PHB	0.383 \pm 0.02	91.299
	EDA-PHB	0.375 \pm 0.06	89.551
	PEG-PHB	0.376 \pm 0.02	89.630
2Gün	PHB	0.369 \pm 0.02	88.081
	EDA-PHB	0.353 \pm 0,02	84.207
	PEG-PHB	0.367 \pm 0.01	87.485
3Gün	PHB	0.366 \pm 0.01	87.246
	EDA-PHB	0.366 \pm 0.01	87.437
	PEG-PHB	0.354 \pm 0.05	84.545
4Gün	PHB	0.342 \pm 0.05	81.525
	EDA-PHB	0.351 \pm 0.02	83.869
	PEG-PHB	0.348 \pm 0.03	83.156
5Gün	PHB	0.358 \pm 0.02	85.387
	EDA-PHB	0.344 \pm 0.02	82.002
	PEG-PHB	0.339 \pm 0.02	80.929

4.4.2. Nanofibriler Yapıda Hazırlanan Doku İskelelerinin Sitotoksitesisi (MTT)

Bu çalışmada ticari PHB'den elektrospinning yöntemi ile nanofibriler doku iskeleleri elde edildi ve doku iskelelerinin yüzeyi EDA ve PEG kullanılarak modifiye edildi. Elde edilen modifiye (EDA-PEG) ve modifiye edilmemiş doku iskelelerinin mesane epitel hücrelerine sitotoksik etkileri incelendi. Bu amaçla doku iskeleleri 1-5 gün hücre kültür vasatı ile (0,2 gr/1ml vasat) inkübe edildi. 96 kuyucuklu plağa 8000 hücre/ml ekildi ve sitotoksitesite çalışması yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.2' deki gibidir. Bu sonuçlara göre doku iskelesi-vasat inkübasyon süresi arttıkça toksisite oranı da artmaktadır. Örneğin EDA modifiye ticari PHB nanofibriler doku iskelesi birinci gün % 0,4 toksik iken beşinci gün bu oran % 24,3'e çıktı.

Çizelge 4.2. Modifiye edilmiş (EDA-PEG) ve modifiye edilmemiş nanofibriler ticari PHB doku iskelelerinin mesane epitel hücreleri üzerine etkileri

Ticari PHB'den Hazırlanan Nanofibriler Doku İskelesinin Sitotoksitesite Sonuçları			
		Ortalama Absorbans \pm STD	%Canlılık
	KONTROL	0.763 \pm 0.02	100
1Gün	PHB	0.715 \pm 0.03	93.709
	EDA-PHB	0.76 \pm 0.03	99.607
	PEG-PHB	0.737 \pm 0.04	96.592
2Gün	PHB	0.694 \pm 0.06	90.957
	EDA-PHB	0.649 \pm 0.03	85.059
	PEG-PHB	0.688 \pm 0.03	90.170
3Gün	PHB	0.696 \pm 0.03	91.219
	EDA-PHB	0.643 \pm 0.04	84.273
	PEG-PHB	0.613 \pm 0.03	80.341
4Gün	PHB	0.582 \pm 0.05	76.278
	EDA-PHB	0.6 \pm 0.06	78.637
	PEG-PHB	0.587 \pm 0.04	76.933
5Gün	PHB	0.599 \pm 0.04	78.506
	EDA-PHB	0.57 \pm 0.04	74.705
	PEG-PHB	0.573 \pm 0.04	75.098

4.4.3. Dondurarak Kurutma ve Elektrospinning Yöntemiyle Hazırlanan Doku İskelelerinde Hücre Çoğalma Oranı

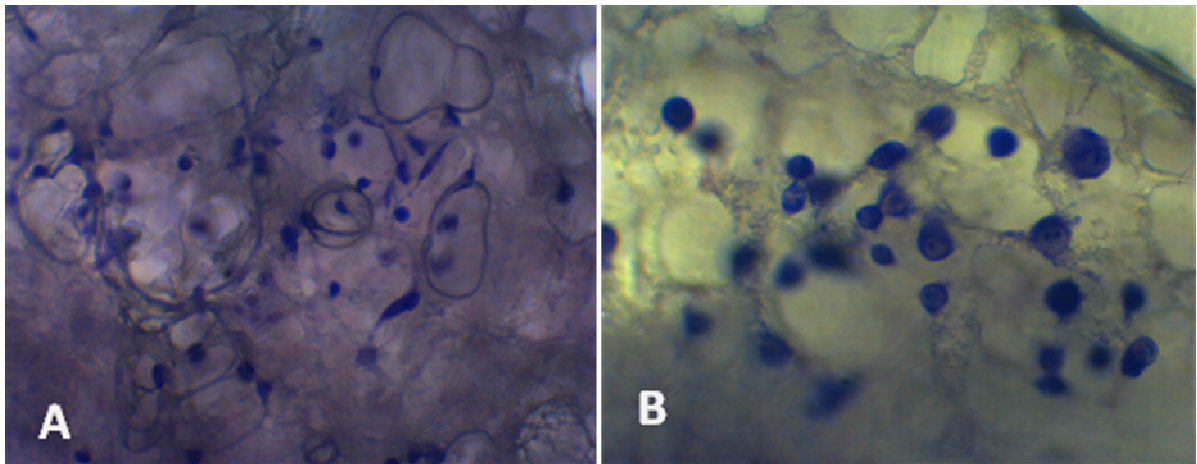
Bu çalışmada ticari PHB'den elektrospinning yöntemi ile elde edilen nanofibriler doku iskeleleri ile dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen makroporöz geleneksel doku iskelelerinin hücre çoğalma oranına etkisi incelendi. Sonuçlar Çizelge 4.3'deki gibidir.

Çizelge 4.3. Mesane epitel hücreleri ile etkileştirilen ticari geleneksel ve nanofibriler doku iskelelerinin hücre çoğalma oranına etkisi

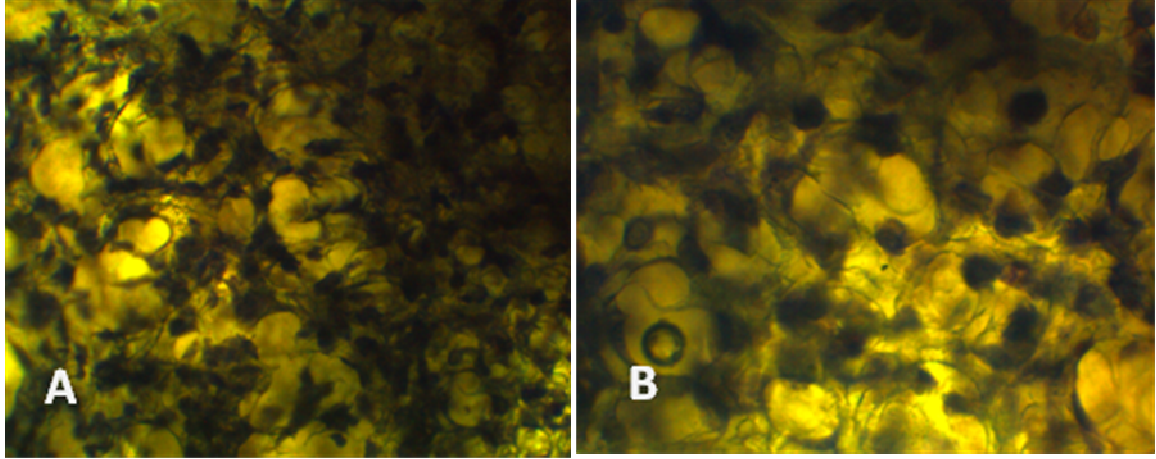
Nanofibriler ve Geleneksel Ticari PHB Doku İskelelerinde Hücre Çoğalma Oranı \pm STD					
	1. Gün	3. Gün	6. Gün	8.gün	10.gün
Nanofibriler PHB Doku İskelesi	0.385 \pm 0.01	0.383 \pm 0.03	0.464 \pm 0.02	0.512 \pm 0.06	0.649 \pm 0.02
EDA Modifiye Nanofibriler PHB Doku İskelesi	0.483 \pm 0.02	0.572 \pm 0.06	0.616 \pm 0.04	0.860 \pm 0.02	0.882 \pm 0.03
PEG Modifiye Nanofibriler PHB Doku İskelesi	0.412 \pm 0.05	0.627 \pm 0.01	0.764 \pm 0.01	0.793 \pm 0.03	1.09 \pm 0.02
Geleneksel PHB Doku İskelesi	0.105 \pm 0.01	0.152 \pm 0.05	0.140 \pm 0.05	0.329 \pm 0.01	0.327 \pm 0.04
Geleneksel EDA Modifiye PHB Doku İskelesi	0.210 \pm 0.03	0.295 \pm 0.03	0.321 \pm 0.04	0.311 \pm 0.05	0.450 \pm 0.06
Geleneksel PEG Modifiye PHB Doku İskelesi	0.111 \pm 0.02	0.19 \pm 0.04	0.203 \pm 0.03	0.241 \pm 0.06	0.295 \pm 0.01

10 günlük yapılan bu testin sonucuna göre nanofibriler yapı, hücre çoğalma oranını artırmaktadır.

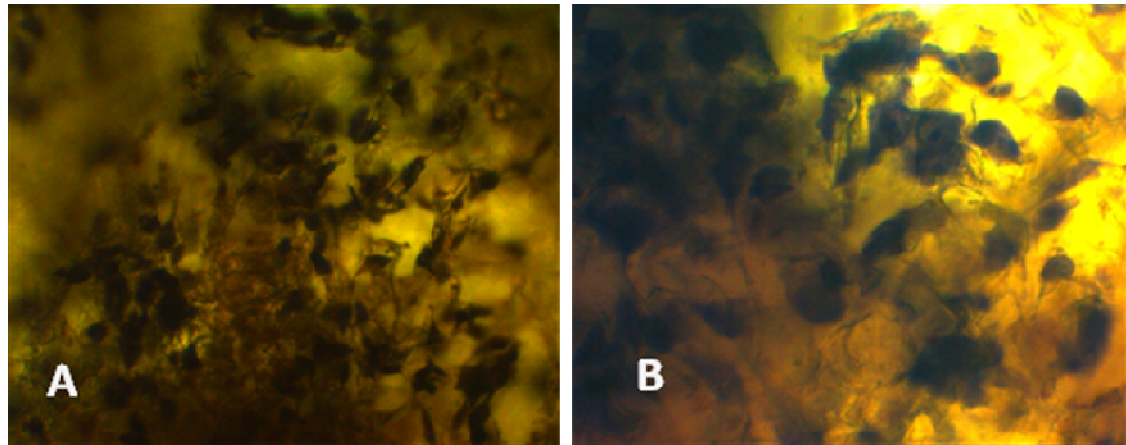
Çoğalma oranı testinin dışında hücre sayısını gözlemlemek amacıyla ticari PHB'den dondurarak kurutma ve elektrospinning yöntemi ile hazırlanan doku iskeleleri, hücrelerle etkileştirilip SEM ve optik mikroskop görüntüleri alınmıştır. Ticari PHB'den dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanan doku iskeleleri (modifiye edilmemiş ve EDA-PEG modifiye) 1 hafta hücrelerle etkileştirildikten sonra elde edilen görüntüler Şekil 4.14, 4.15, 4.16'da verilmiştir. Görüntülerden ve çoğalma oranı testinden de anlaşıldığı gibi modifiye edilen doku iskelelerinde modifiye edilmemiş göre hücre sayısı daha çoktur.



Şekil 4.14. Hücre yapışmış modifiye edilmemiş geleneksel ticari PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü (A ve B fotoğrafları 10X10, 10X20)

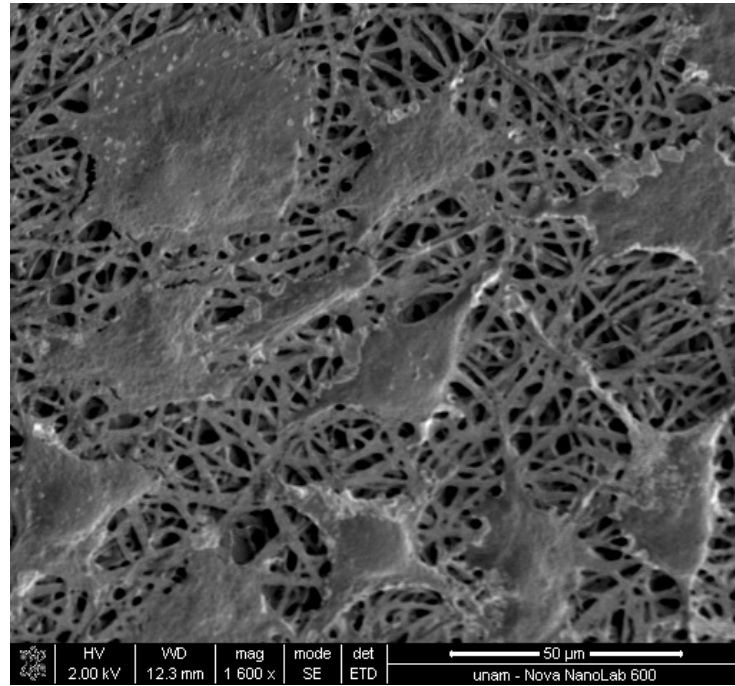
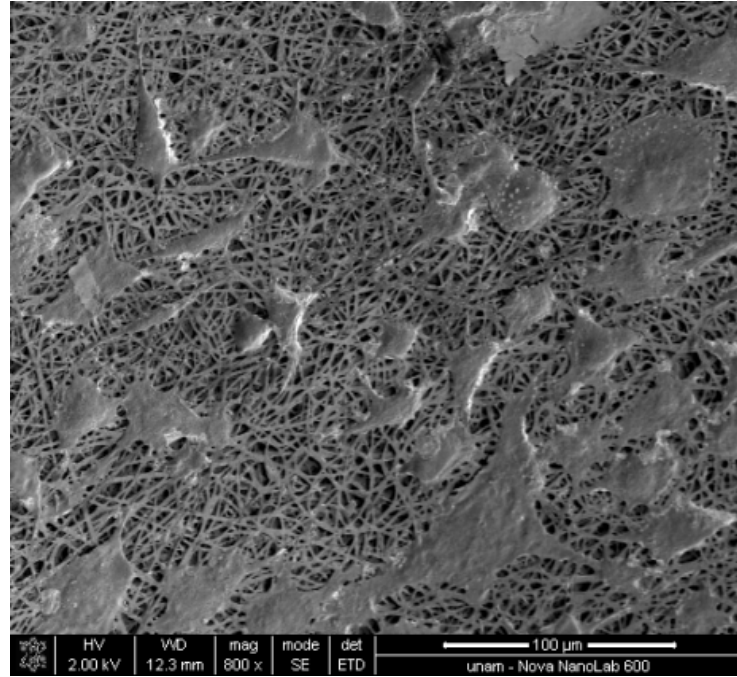


Şekil 4.15. Hücre yapışmış EDA ile modifiye edilmiş geleneksel ticari PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü (A ve B fotoğrafları 10X10,10X20)



Şekil 4.16. Hücre yapışmış PEG ile modifiye edilmiş geleneksel ticari PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü (A ve B fotoğrafları 10X10, 10X20)

Şekil 4.17'de ise ticari PHB'den nanofibriler yapıda hazırlanan doku iskeleleri üzerinde mesane epitel hücreleri görülmektedir. Çoğalma oranı testinin sonucunda olduğu gibi dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan doku iskelelerine kıyasla nanofibriler doku iskelelerindeki hücre yapışmasının fazla olduğu, alınan SEM görüntülerinde de görülmektedir.



Şekil 4.17. Hücre yapışmış ticari PHB nanofibriler doku iskelesinin SEM görüntüsü

4.5. Bakteriyel PHB'den Doku İskelesi Hazırlanması

4.5.1. Dondurarak Kurutma Yöntemiyle Doku İskelesi Hazırlanması

Bakteriyel polimerden dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanan; 1 cm çapında ve 0,5 cm kalınlığında olan doku iskelelerinin optik mikroskop görüntüsü Şekil 4.19'da verildi.



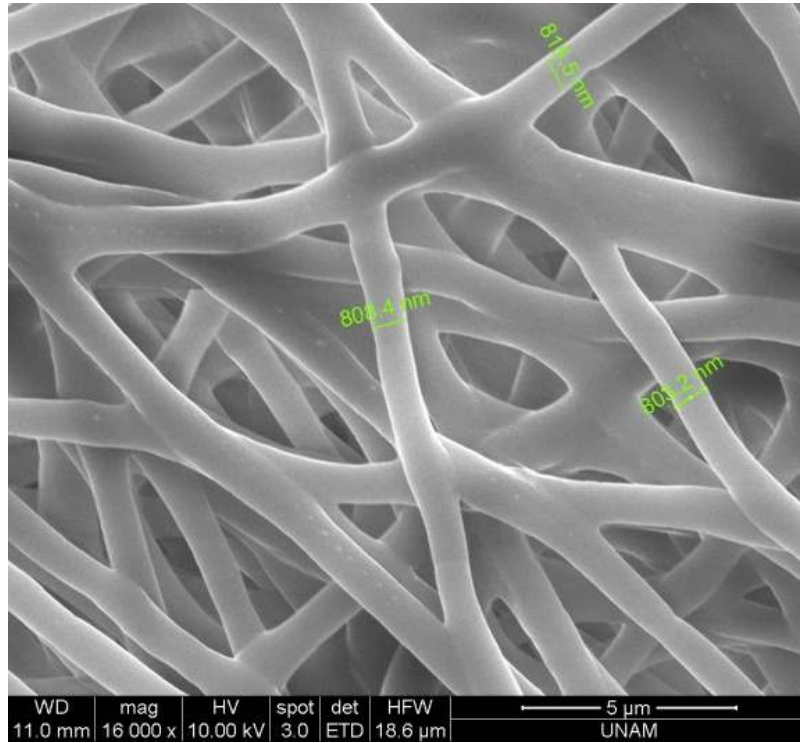
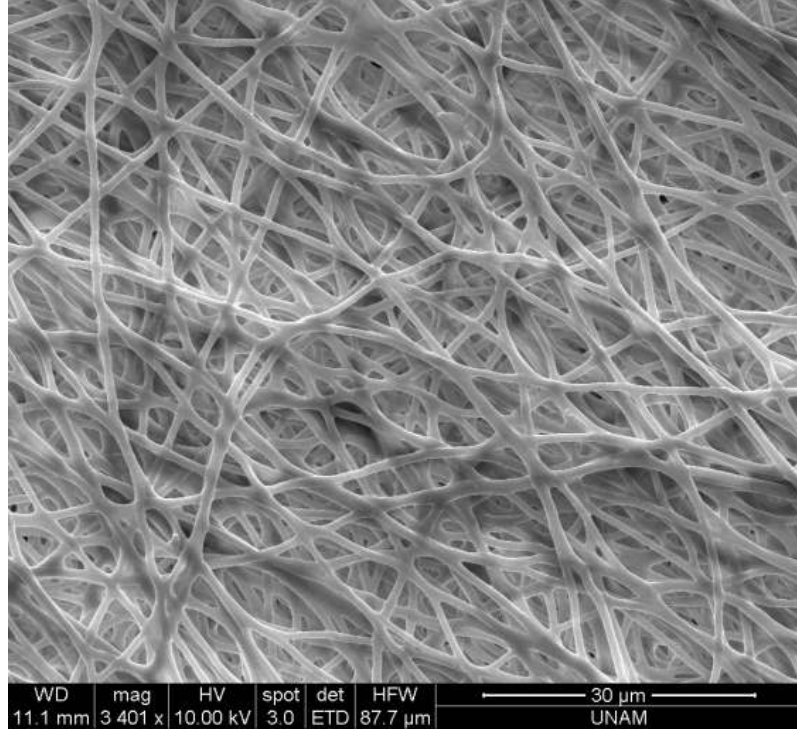
Şekil 4.18. Geleneksel yöntemle hazırlanan doku iskeleleri



Şekil 4.19. PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü (10X20)

4.5.2. Nanofibriler Yapıda Doku İskelelerinin Hazırlanması

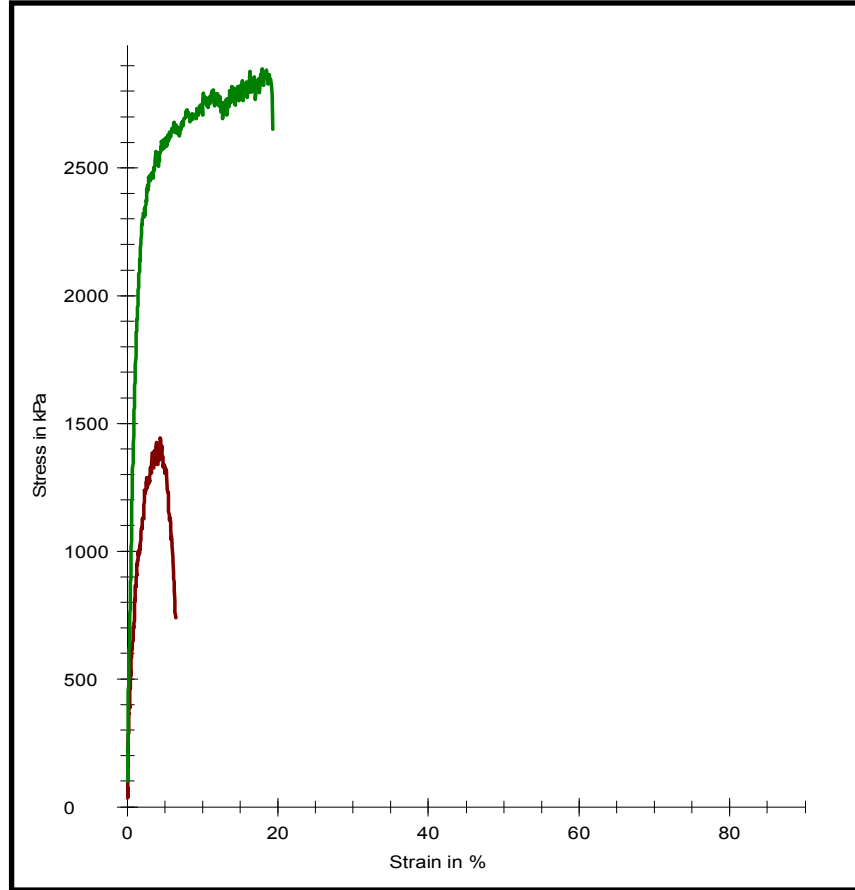
Ticari polimerden nanofibriler yapıların hazırlanmasında kullanılan parametreler aynen bakteriyel polimerde de kullanıldı. Şekil 4.20'de %5 polimer konsantrasyonunda %25 etanol/%75 CHCl_3 , 17 kV'da, 20ml/sa akış hızında, 15 cm mesafede hazırlanan doku iskeleleri görülmektedir. Hazırlanan doku iskelelerindeki ortalama nanofiber çapları 800 nm olarak belirlendi.



Şekil 4.20. %5 polimer konsantrasyonunda, 17 kV, 20 ml/sa, 15 cm %25 etanol/%75 CHCl₃ parametrelerinde bakteriyel PHB'den elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü

4.6. Bakteriyel PHB'den Hazırlanan Nanofibriler Doku İskelelerinin Mekanik Dayanıklılığı

Bu deneyde %5 polimer konsantrasyonunda, %25 etanol/%75 CHCl_3 , 17 kV'da, 20ml/sa akış hızında, 15 cm mesafede hazırlanan doku iskeleleri 8 cm uzunluğunda, 2 cm eninde, 0.5 mm kalınlığında kesildi. Bakteriyel PHB'den hazırlanan nanofibriler doku iskelesinin çekme-uzama grafiği Şekil 4.21'de verildi.



Şekil 4.21. Bakteriyel PHB'den Hazırlanan Nanofibriler Doku İskelelerinin çekme-uzama grafiği

Bakteriyel PHB'den hazırlanan nanofibriler doku iskelesinin elastik modülüsü 71 MPa, çekme dayanımı 2,88 MPa olarak bulundu. PHB'nin gerçek elastik modülüs değeri 1.1-3.5 GPa ve çekme dayanımı 43 MPa'dır (Misra, 2006). Bakteriyel PHB'den elde edilen değerler ile bu değerler karşılaştırıldığında bakteriyel PHB'nin çekme dayanıklılığının ve elastik modülün düşük olduğu görüldü. Ticari ve bakteriyel PHB'den hazırlanan nanofibriler doku iskeleleri karşılaştırıldığında bakteriyel nanofibriler yapının ticariye kıyasla daha zayıf olduğu da görüldü.

4.7. Bakteriyel PHB'den Hazırlanan Doku İskelelerinin Biyouyumluluk Testleri

4.7.1. Dondurarak Kurutma Yöntemiyle Hazırlanan Doku İskelelerinin Sitotoksitesisi (MTT)

Bu çalışmada bakteriyel kaynaklı PHB'den dondurarak kurutma yöntemi ile doku iskeleleri elde edildi. Hazırlanan bu doku iskelelerinin sitotoksitesisinin belirlenmesi için MTT testi yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.4'de verildi.

Çizelge 4.4. Modifiye edilmiş (EDA-PEG) ve modifiye edilmemiş dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan bakteriyel PHB doku iskelelerinin mesane epitel hücreleri üzerine etkileri

Bakteriyel kaynaklı PHB'den dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen doku iskelelerinin sitotoksitesite sonuçları			
		Ortalama Absorbans±STD	%Canlılık
	Kontrol	0.54±0.01	100
1Gün	PHB	0.53±0.06	98.13
	EDA-PHB	0.53±0.05	98.19
	PEG-PHB	0.51±0.03	94.45
2Gün	PHB	0.50±0.01	94.08
	EDA-PHB	0.49±0.02	91.14
	PEG-PHB	0.48±0.03	90.54
3Gün	PHB	0.47±0.05	87.01
	EDA-PHB	0.46±0.04	86.65
	PEG-PHB	0.45±0.02	84.24
4Gün	PHB	0.45±0.01	84.58
	EDA-PHB	0.44±0.03	82.62
	PEG-PHB	0.43±0.02	81.03
5Gün	PHB	0.44±0.01	81.68
	EDA-PHB	0.42±0.01	77.62
	PEG-PHB	0.41±0.01	76.07

Bakteriyel kaynaklı PHB'den dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen doku iskelelerinin sitotoksitesite sonuçları incelendiğinde: 5.gün sonunda modifiye edilmemiş PHB doku iskelesi %18,3; EDA modifiye %22,4; PEG modifiye PHB doku iskelesinin ise %24 toksik olduğu görüldü.

4.7.2. Nanofibriler Yapıda Hazırlanan Doku İskelelerinin Sitotoksitesisi (MTT)

Bu çalışmada “0,2gr doku iskelesi/1ml vasat” konsantrasyonunda doku iskeleleri 1–5 gün hücre kültür vasatı ile etkileştirilmiştir. Mesane epitel hücreleri 9000 hücre/ml konsantrasyonda 96 kuyucuklu plağa ekildi ve bir gece etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 96 kuyucuklu plaktaki vasat atıldı ve doku iskeleleri ile etkileştirilmiş vasat hücrelerin üzerine pipetlendi. Bir gece etüvde inkübe edildikten sonra 3.9.2’ de anlatıldığı gibi sitotoksitesite testi yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.5’deki gibidir. Bu sonuçlara göre; doku iskelesi-vasat’ın inkübasyon süresi arttıkça toksisitesi de artmaktadır. Örneğin EDA ile modifiye edilmiş PHB nanofibriler doku iskelesi 1. gün %2,4 toksisiteye sahipken 5. gün sonunda %13,9 toksisiteye sahiptir.

Çizelge 4.5. Modifiye edilmiş (EDA-PEG) ve modifiye edilmemiş nanofibriler bakteriyel PHB doku iskelelerinin mesane epitel hücreleri üzerine etkileri

Bakteriyel Kaynaklı PHB Nanofibriler Doku İskelesi			
		Ortalama Absorbans±STD	%Canlılık
	Kontrol	0.5215±0.03	100
1gün	PHB	0.502±0.05	96.26
	EDA-PHB	0.509±0.04	97.60
	PEG-PHB	0.491±0.04	94.15
2gün	PHB	0.482±0.01	92.43
	EDA-PHB	0.485±0.05	93.00
	PEG-PHB	0.488±0.05	93.58
3gün	PHB	0.489±0.06	93.77
	EDA-PHB	0.478±0.04	91.66
	PEG-PHB	0.469±0.05	89.93
4gün	PHB	0.462±0.04	88.59
	EDA-PHB	0.467±0.04	89.55
	PEG-PHB	0.453±0.03	86.86
5gün	PHB	0.455±0.01	87.25
	EDA-PHB	0.458±0.04	87.82
	PEG-PHB	0.449±0.03	86.10

4.7.3. Dondurarak Kurutma ve Elektrospinning Yöntemiyle Hazırlanan Doku İskelelerinde Hücre Çoğalma Oranı

Bakteriyel PHB'den dondurarak kurutma ve elektrospinning yöntemi ile hazırlanan, modifiye edilmemiş ve EDA-PEG modifiye doku iskeleleri 1 hafta hücrelerle etkileştirildikten sonra optik mikroskop görüntüleri alındı (Şekil 4.22, 4.23, 4.24). Ticari PHB'den dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan doku iskelelerinde olduğu gibi bakteriyel PHB'den hazırlanan modifiye edilmiş (EDA-PEG) doku iskelelerine, modifiye edilmeyenlere göre daha iyi hücre yapıştığı görüldü.

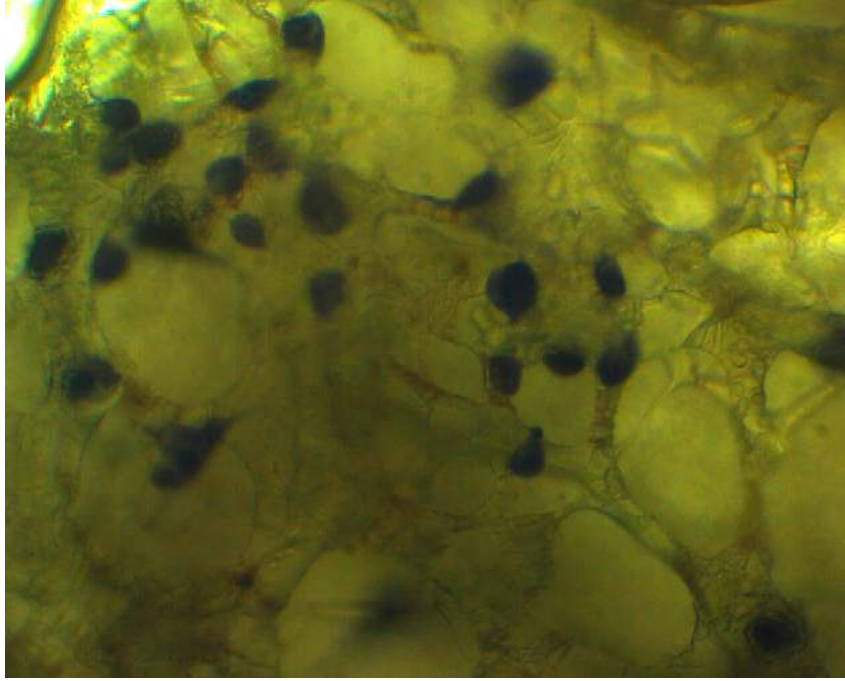
Hücrelerle etkileştirilen bakteriyel PHB nanofibriler doku iskelelerinin SEM görüntüsü Şekil 4.25'de verildi. Ticari PHB nanofibriler doku iskelesine göre bakteriyel PHB nanofibriler doku iskelesinde hücre sayısı azdır. Çünkü bakteriyel PHB nanofibriler doku iskeleleri 2 gün hücrelerle etkileştirildikten sonra görüntü alındı, oysa ki ticari PHB nanofibriler doku iskeleleri 7 gün hücrelerle etkileştirilmişti.

Çizelge 4.6. Mesane epitel hücreleri ile etkileştirilen bakteriyel geleneksel ve nanofibriler doku iskelelerinin hücre çoğalma oranına etkisi

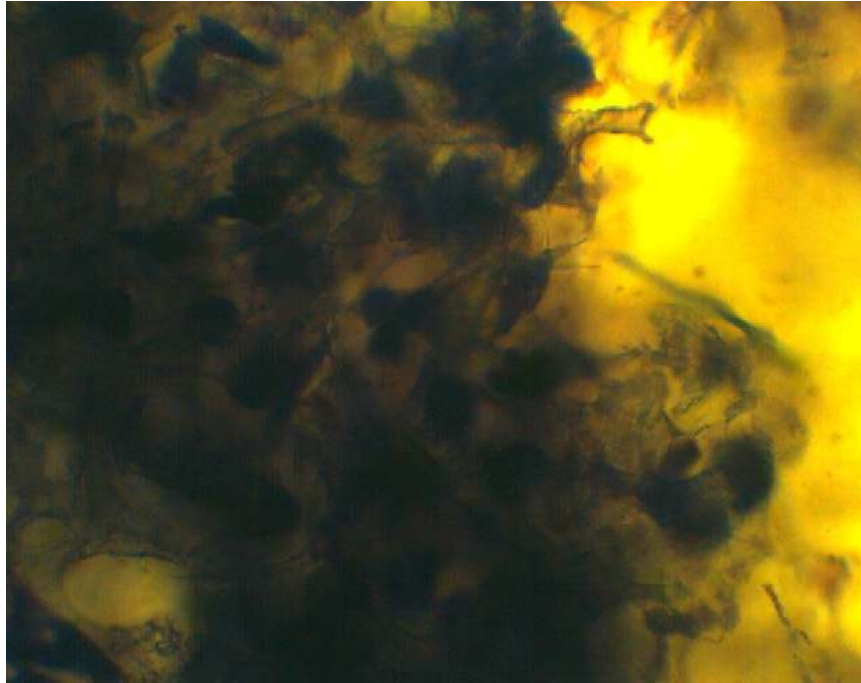
Nanofibriler ve geleneksel bakteriyel PHB doku iskelelerinin hücre çoğalma oranı \pm STD					
	1. Gün	3. Gün	6. Gün	8.gün	10.gün
Nanofibriler PHB doku iskelesi	0.13 \pm 0.01	0.175 \pm 0.05	0,252 \pm 0,01	0.445 \pm 0.03	0.713 \pm 0.04
EDA modifiye nanofibriler PHB doku iskelesi	0.108 \pm 0.01	0.352 \pm 0.01	0.388 \pm 0.04	0.404 \pm 0.01	0.908 \pm 0.01
PEG modifiye nanofibriler PHB doku iskelesi	0.135 \pm 0.01	0.343 \pm 0.01	0.475 \pm 0.06	0.535 \pm 0.04	0.904 \pm 0.03
PHB geleneksel doku iskelesi	0.101 \pm 0.06	0.123 \pm 0.01	0.155 \pm 0.05	0.269 \pm 0.01	0.396 \pm 0.05
EDA modifiye PHB geleneksel doku iskelesi	0.136 \pm 0.02	0.153 \pm 0.02	0.166 \pm 0.05	0.205 \pm 0.04	0.420 \pm 0.05
PEG modifiye PHB geleneksel doku iskelesi	0.22 \pm 0.01	0.268 \pm 0.03	0.285 \pm 0.01	0.383 \pm 0.06	0.398 \pm 0.01

Nanofibriler ve geleneksel bakteriyel PHB doku iskelelerinin hücre çoğalma oranı testi sonuçlarına göre; nanofibriler yapıda genel olarak hücre çoğalma oranının geleneksel doku iskelelerine göre daha fazla olduğu bulundu. Aynı zamanda

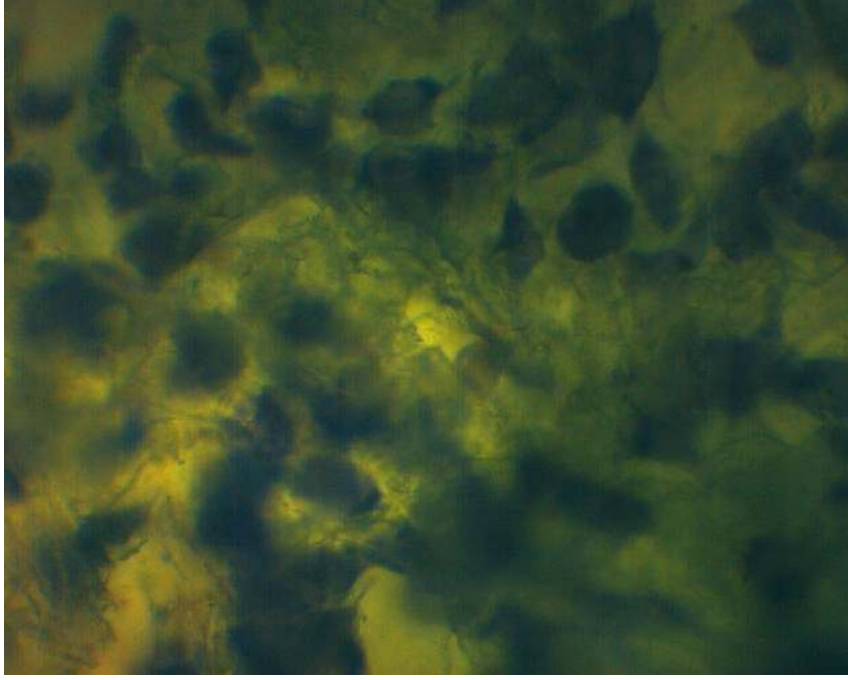
modifiye edilmiş nanofibriler doku iskelelerinde modifiye edilmemişlere göre hücre çoğalma oranının daha fazla olduğu görüldü.



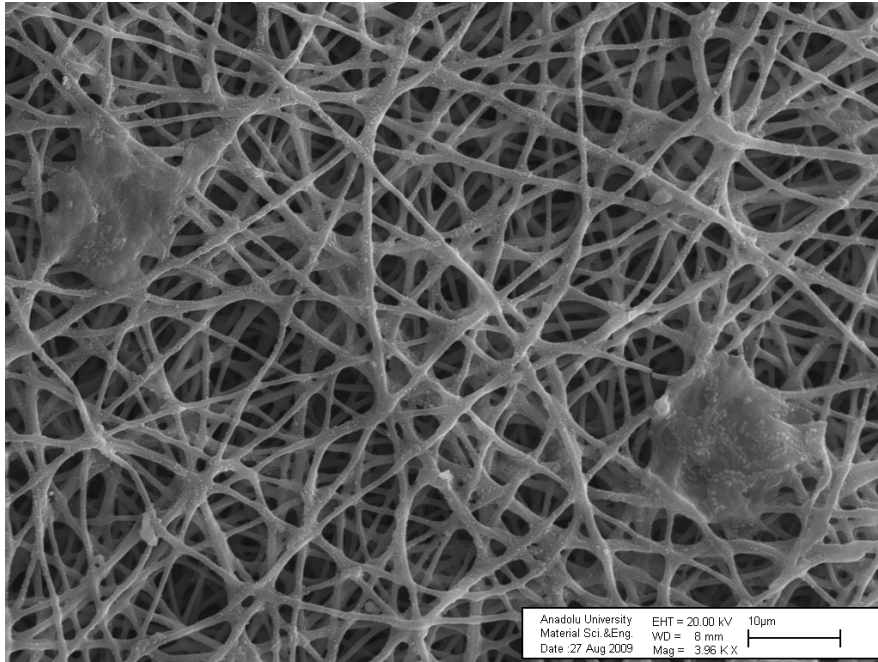
Şekil 4.22. Hücre yapışmış modifiye edilmemiş geleneksel bakteriyel PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü (10X20)



Şekil 4.23. Hücre yapışmış EDA ile modifiye edilmiş geleneksel bakteriyel PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü (10X20)



Şekil 4.24. Hücre yapışmış PEG ile modifiye edilmiş geleneksel bakteriyel PHB doku iskelesinin optik mikroskop görüntüsü (10X20)



Şekil 4.25. Hücre yapışmış sentez PHB nanofibriler doku iskelesinin SEM görüntüsü

SONUÇLAR

Sunulan çalışmalar kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- “*Alcaligenes eutrophus* (DSM 545)” suşundan PHB üretildi. NMR sonuçları ile üretilen PHB'nin yüksek saflıkta olduğu görüldü.
- Ticari PHB'den dondurarak kurutma ve elektrospinning yöntemi ile doku iskeleleri hazırlandı. Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan matrikslerin SEM ve optik görüntülerinde yüksek poroziteye sahip olduğu görüldü. Elektrospinning yöntemi ile hazırlanan doku iskelelerindeki fiber çapları ortalama 450 nm olarak ölçüldü.
- Ticari PHB'den hazırlanan nanofibriler doku iskelelerinin mekanik dayanıklılığına bakıldı.
- Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan ticari PHB doku iskelelerinin sitotoksosite çalışmalarında modifiye edilmemiş grubun modifiye edilenlere (EDA-PEG) kıyasla 5. gün sonunda daha az toksisite gösterdiği görüldü.
- Elektrospinning yöntemi ile hazırlanan ticari nanofibriler doku iskelelerinin sitotoksitesine bakıldığında modifiye edilmemiş grubun modifiye edilenlere (EDA-PEG) kıyasla daha az toksik olduğu görüldü, ancak 5. günün sonunda toksisitenin tüm gruplarda arttığı görüldü.
- Ticari geleneksel ve nanofibriler doku iskelelerinin hücre çoğalma oranına etkisi incelendiğinde nanofibriler yapının, hücre çoğalma oranını artırdığı bulundu. Ayrıca modifiye edilen ticari geleneksel ve nanofibriler doku iskelelerinin, modifiye edilmeyen gruba göre hücre çoğalma oranı bakımından daha iyi olduğu sonucuna varıldı. Bu sonuç SEM ve optik mikroskoptan elde edilen görüntülerle de desteklendi.
- Bakteriyel PHB'den dondurarak kurutma ve elektrospinning yöntemi ile doku iskeleleri hazırlandı. Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan matrikslerin optik görüntülerinde yüksek poroziteye sahip olduğu görüldü.

Elektrospinning yöntemi ile hazırlanan doku iskelelerindeki fiber çapları ortalama 800 nm olarak ölçüldü.

- Bakteriyel PHB'den hazırlanan nanofibriler doku iskelelerinin mekanik dayanıklılığına bakıldı. Bakteriyel PHB nanofibriler doku iskelesinin ticariye kıyasla dayanıklılığının daha düşük olduğu görüldü.
- Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan bakteriyel PHB doku iskelelerinin sitotoksosite çalışmalarında modifiye edilmemiş grubun modifiye edilenlere (EDA-PEG) kıyasla 5. gün sonunda daha az toksisite gösterdiği görüldü.
- Elektrospinning yöntemi ile hazırlanan bakteriyel nanofibriler doku iskelelerinin sitotoksitesine bakıldığında 5. günün sonunda toksisitenin tüm gruplarda arttığı gözlemlendi.
- Bakteriyel ve ticari kaynaklı, dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan PHB doku iskelelerinin hücre çoğalma oranı etkilerine bakıldığında aralarında fazla fark olmamasına rağmen bakteriyel kaynaklı geleneksel PHB doku iskelelerinde hücre çoğalma oranının daha iyi olduğu görüldü.
- Bakteriyel ve ticari kaynaklı, elektrospinning yöntemi ile hazırlanan PHB doku iskelelerinin hücre çoğalma oranına etkisi incelendiğinde; genel olarak bakteriyel kaynaklı PHB nanofibriler yapıların hücre çoğalma oranı üzerinde etkisinin daha fazla olduğu görüldü.

Genel çıkarım;

- Elektrospinning ve dondurarak kurutma yöntemlerle hazırlanan doku iskelelerinin hücre çoğalma oranına etkisi incelendiğinde nanofibriler yapının hücre çoğalma oranını arttırdığı bulundu.
- Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan ticari ve bakteriyel kaynaklı doku iskelelerinin sitotoksik etkilerine bakıldığında aralarında çok fazla fark olmadığı görüldü. Yalnızca 5. gün sonunda bakteriyel kaynaklı PHB doku iskelesinin ticari formuna göre biraz daha toksik olduğu görüldü.
- Ticari ve bakteriyel kaynaklı PHB nanofibriler doku iskelelerinin mesane epitel hücrelerine olan toksisitelerine bakıldığında; ticari PHB'den elde edilen nanofibriler doku iskelelerinin bakteriyel kaynaklı PHB nanofibriler doku iskelesine göre daha toksik olduğu bulunmuştur. Örneğin beşinci gün bakteriye kaynaklı modifiye edilmemiş PHB %12,75; EDA modifiye % 12,2; PEG modifiye PHB nanoscaffold %13,9 oranında toksikken ticari modifiye edilmemiş PHB %21,5; EDA modifiye % 25,3; PEG modifiye PHB nanoscaffold %25 oranında toksiktir.

Yararlanılan Kaynaklar

- Anderson, A., Dawes, E. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiological Reviews*, 54, 4, 450-472.
- Andrady Anthony L. (2008). *Science and Technology of Polymer Nanofibers*, John Wiley & Sons, ISBN 978-0-471-79059-4, Kanada, 28p.
- Aslım B., Yüksekdağ N. Z., Beyatlı Y. (2002). Production of Poly-b-Hydroxybutyrate (PHB) by Some Rhizobium Bacteria, *Turk J Biol* 26: 215-219.
- Aussawasathien Darunee, (2006). *Electrospun Conducting Nanofiber-Based Materials and Their Characterizations: Effects of Fiber Characteristics on Properties and Applications*, Doctor of Philosophy, University of Akron, Polymer Engineering, 14-20p.
- Barham, P.J., Keller, A., Otun, E.L. and Holmes, P.A. (1984). Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate, *Journals of Materials Science*, 19; 2781-2794.
- Barhate R S., Ramakrishna S. (2007). Nanofibrous filtering media: Filtration problems and solutions from tiny materials. *J Membrane Sci*, 296(1-2): 1-8.
- Barnes Catherine P., Sell Scott A., Boland Eugene D., Simpson David G., Bowlin Gary L. (2007). Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 1413–1433
- Baumgarten, P. K. J. Coll, (1971). Applications of electrospun nanofibers, *Interf. Sci*, 36, 71.

- Beyatlı, Y. (1996). Mikrobiyal Termoplastik Üretimi, KÜKEM Dergisi, 19, 2, 23-32.
- Bluhm, T.L., Hamer, G.K. and Sundararajan, P.R. (1998). Isodiorporism in poly(C-hydroxybutyrate-co-C-hydroxyvalerate) copolyesters, *Polymer Prepr.*, 29; 603.
- Braunegg, G., Lefebvre, G., Genser, K. L. (1998). Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects, *Journal of Biotechnology*, 65, 127-161.
- Brown P. J. and Stevens K. (2007). *Nanofibers and nanotechnology in Textiles*, CRC Press, ISBN 978-1-4200-4449-2, New York, 28p.
- Cheng Mei-Ling, Lin Chih-Chung, Su Hsiao-Lang, Chen Po-Ya, Sun Yi-Ming, (2008), Processing and characterization of electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) nanofibrous membranes, *Polymer* 49: 546-553.
- Choi, S.W., Kim, J.R, Jo, S.M., Lee, W.S. and Kim, B.C. (2004e). Electrospun PVdF based fibrous polymer electrolytes for lithium ion polymer batteries, *Electrochim. Acta.* 50, 1, pp. 69-75.
- Deitzel, J. M.; Kleinmeyer, J.; Harris D.; Tan, N. C. B. (2001). The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer* 42, 261-272.
- Doshi J, Reneker DH. (1995). Electrospinning process and applications of electrospun fibers, *J Electrostatics*;35(2-3):151-60.
- Du G., Chen J., Yu J., Lun S., 2001, Continuous Production of Poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system, *Journal of Biotechnology*, 88, 59-65.

- Edwards S.L., Mitchell W., Matthews J.B., Ingham E., Russell S.J. (June 2004). Design of Nonwoven Scaffold Structures for Tissue Engineering Of The Anterior Cruciate Ligament, Autex Research Journal, Vol. 4, No:2.
- Engelberg, I. and Kohn, J. (1991). Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications. *Biomaterials*, 12: 292.
- FANG Jian, NIU HaiTao, LIN Tong & WANG XunGai, (2008). *Chinese Science Bulletin*, vol. 53, no. 15, 2265-2286.
- Findlay, R.H. and White, D.C. (1983). Polymeric beta-hydroxyalkanoates from Environmental Samples and *Bacillus megaterium*, *Appl. Environ. Microbiol.*,45, 1, 71-78.
- Fong H., Chun I., Reneker D.H., 1999, Beaded nanofibers formed during electrospinning, *Polymer* 40: 4585–4592.
- Fong, H. & Reneker, H. R. (1999). Elastomeric nanofibers of styrene-butadiene-styrene triblock copolymer. *Journal of Polymer Science Part B- Polymer Physics* 37, 3488-3493.
- Gersbach CA, Byers BA, Pavlath GK, et al. (2004). Runx2/Cbfa1-genetically engineered skeletal myoblasts mineralize collagen scaffolds in vitro. *Biotechnol Bioeng*, 88:369–78.
- Guceri S., Gogotsi Y. G. and Kuznetsov V. (2004). Nanoengineered Nanofibrous Materials, NATO Science Series, II. Mathematics, Physics and Chemistry-Vol. 169, 1-18 p.
- Hahn S.K., Chang Y.K., Lee S.Y., 1995, Recovery and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) Synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and Recombinant *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 34-39p.

- Hartgerink J. D., Beniash E., Stupp S. I. (2001). Self-Assembly and Mineralization of Peptide-Amphiphile Nanofibers, *SCIENCE*, VOL 294
- He Ji-Huan, Liu Yong, Mo Lu-Feng, Wan Yu-Qin and Xu Lan (2008). *Electrospun Nanofibres and Their Applications*, iSmithers, ISBN: 978-1-84735-145-6, Shawbury, 8p.
- Helm Jana, 2002, *Methanotrophe Bakterien als Produzenten von Poly-(β -hydroxybuttersaure) (PHB) Charakterisierung des Prozesses, des Polymers und einer stabilen Mischkultur*, Dresden Technischen Universität, Doktoringenieur, 11p.
- Hong K H. (2007). Preparation and properties of electrospun poly(vinyl alcohol)/silver fiber web as wound dressings. *Polymer Eng Sci*, 47(1): 43—49.
- Hsieh Chung-Jen (2006). *Studies on Surface Modifications of Materials for Tissue Engineering Applications*, Master Tezi, Pittsburgh Üniversitesi, 24,25p.
- Ignatova M., Manolova N., Rashkov I. (2007). Electrospinning of poly(vinyl pyrrolidone)-iodine complex and poly(ethylene oxide)/poly(vinyl pyrrolidone)-iodine complex—a prospective route to antimicrobial wound dressing materials. *Europ Polym J*, 43(5): 1609—1623.
- Ikada Y.,(2006). *Tissue Engineering Fundamentals and Applications*, Elsevier, ISBN-13: 978-0-12-370582-2, New York, 26p.
- Jaeger R, Bergshoeff MM, Battle CMI, Schonherr H, Vancso GJ. (1998). Electrospinning of ultra-thin polymer fibers. *Macromol Symp*;127:141-50.
- Jiang, L., Li, Y., Wang, X., Zhang, L., Wen, J., Gong, M., Preparation and properties of nanohydroxyapatite/ chitosan / carboxymethyl cellulose composite scaffold, *Carbohydrate Polymers*, 74 (2008) 680–684.

- Jiao Y. and Cui F., (2007). Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering, *Biomed. Mater* 2, R24-R37.
- Khanna, S. and Srivastava, A.K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40; 607-619.
- Kisiday J, Jin M, Kurz B, et al. 2002. Self-assembling hydrogel peptide hydrogel fosters chondrocytes extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:9996–10001.
- Kozanoğlu Gün Sazak, (2006). Elektrospinning Yöntemiyle Nanolif Üretimi, Yüksek Lisan Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, s18.
- Lafferty, R.M., Korsatko, B. and Korsatko, W. (1988). Microbial production of poly-C- hydroxybutiric acid. *Biotechnology*, H.J. Rehm and G. Reed (eds.), Volume 6b, Special Microbial Processes, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Langer R, Vacanti JP. (1993). *Tissue Engineering*, Science; 260:920 –926.
- Larrondo, L., and Manley, J. (1981). Electrostatic Fiber Spinning from Polymer Melts, I. Experimental Observations on Fiber Formation and Properties, *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition* 19: 909-920.
- Larrondo, L., and Manley, J. (1981). Electrostatic Fiber Spinning from Polymer Melts, III. Electrostatic Deformation of a Pendant Drop of Polymer Melt, *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition* 19: 933-940
- Laurencin C T., Nair L. S., 2008, *Nanotechnology and Tissue Engineering The Scaffold*, ISBN: 978-1-4200-5182-7, 10p.

- Lee S. Y., (1996). Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 49, Pp. 1-14 .
- Lee, S.Y. and Choi, J. (1999). Polyhydroxyalkanoate: biodegradable polymer. In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2nd edn. Edited by Demain, A.L., Davies, J. E. Washington DC, ASM, 616-627.
- Lenz Robert W., and Marchessault Robert H. (2005). Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology, ,Biomacromolecules, Volume 6 Number 1.
- Li W-J, Laurencin C T, Caterson E J, Tuan R S and Ko F K (2002). Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering *J. Biomed. Mater. Res.*, 60 613–21.
- Li WJ, Laurencin CT, Caterson EJ, et al. 2002. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res*, 60:613–21.
- M.C.Rocco, R.S. William, and P. Alivisatos (1999). Nanotechnology Research Directions: IWGN Workshop Report, National Science and technology Council.
- Ma Peter X., Elisseff J. (2006). Scaffolding in Tissue Engineering, JRC Press, ISBN: 978-1-57444-521-3, New York, 27p.
- Ma PX, Zhang R. 1999. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *J Biomed Mater Res*, 46:60–72.
- Megelski S, Stephens JS, Chase DB, Rabolt JF. (2002). Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers, *Macromolecules* 22;35(22):8456-66.

- Misra S. K., Valappil S. P., Roy I., and Boccaccini A. R. (2006). Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications, *Biomacromolecules*, Vol. 7, No. 8.
- Pham Q. P., Sharma U., Mikos A. G. (2006). Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review, *Tissue Engineering*, 12(5): 1197-1211.
- Poirier, Y. (2002). Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism, *Progress in Lipid Research*, 41, 2, 131-155.
- Poirier, Y., Nawrath, C. and Somerville, C. (1995). Production of polyhydroxyalkanoates, a family of Biodegradable plastics and elastomers, in bacterial and plant. *Biotechnol.* 13; 142-150.
- Pool, R. (1989). In search of the plastic potato, *Science*, 245; 1187-1189.
- Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W, Lim T.C. & Ma Z., (2005). An Introduction to Electrospinning and Nanofibers, *National University of Singapore*, World Scientific, 282p.
- Sawicka K. M. and Gouma P., (2006). Electrospun composite nanofibers for functional applications, *Materials Science and Engineering*, 8:769–781.
- Shields KJ, Beckman MJ, Bowlin GL, et al. (2004). Mechanical properties and cellular proliferation of electrospun collagen type II. *Tissue Eng*, 10:1510–17.
- Shishatskaya EI, Volova TG. (2004). A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for in vitro cell cultures. *J Mater Sci Mater Med*;15:915–23.

- Skalak R, Fox CF (1988). Tissue engineering. Granlibakken, Lake Tahoe: Proc wrkshop; New York: Liss.
- Slater, S., Gallaher, T. and Dennis, D. (1992). Production of polyhydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant Escherichia coli strain, Applied and Environmental Microbiology, 58, 4, 1089-1094.
- Smith L.A., Ma P.X., (2004). Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering, Biointerfaces 39: 125–131.
- Steinbüchel A. and Füttenbush B. (1998). Bacterial and other biological systems for polyester production, TIBTECH, (VOL 16), 419-427.
- Travis J., Sill, Horst A. von Recum, (2008). Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering, BIOMATERIALS 29 :1989-2006.
- Vasita R., Katti Dharendra S. (2006). Nanofibers and their applications in tissue engineering, International Journal of Nanomedicine;1(1) 15-30.
- Williams F. S., Martin P.D., Horowitz M. D., Peoples P. O. (1999). PHA applications: addressing the price performance issue I. Tissue engineering, Biological Macromolecules, 25: 111–121.
- Wu TP, Hu P, Zhang XB, Li W, Chen F. (2004). Biocompatibility of modified poly-beta-hydroxybutyric acid to adrenocortical cells, J Wuhan Univ Technol Mater Sci;19:38–40.
- Zhang CX, Yuan XY, Wu LL, Han Y, Sheng J. (2005). Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats, Eur Poly J;41(3):423-32.
- Zhang Lijie, Webster Thomas J. (2009). Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration, Nano Today 4: 66—80.

Zuo, W.W., Zhu, M.F., Yang, W., Yu, H., Chen, Y.M., and Zhang, Y., 2005, Experimental study on relationship between jet instability and formation of beaded fibers during electrospinning. *Polym. Eng. Sci.* 45, 704.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zeynep Karahaliloğlu

Doğum Yeri : Delice- KIRIKKALE

Doğum Yılı : 1984

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu :

Lise 1998-2001 Aydınlıkevler İnönü Lisesi, ANKARA

Lisans 2001-2007 Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Eğitimi Bölümü

Yüksek Lisans 2007-2009 Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Nanoteknoloji ve Nanotıp Ana Bilim Dalı

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi :

2009- : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi,
Nanoteknoloji ve Nanotıp Ana Bilim Dalı