

**ENJEKTE EDİLEBİLİR HEMOSTATİK FİBROİN
MİKROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF INJECTABLE HEMOSTATIC
FIBROIN MICROGELS**

GÜLSEHER MANAP

PROF. DR. KEZBAN ULUBAYRAM
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Polimer Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

GÜLSEHER MANAP'ın hazırladığı “**Enjekte Edilebilir Hemostatik Fibroin Mikrojellerin Geliştirilmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **POLİMER BİLİMİ ve TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Murat ŞEN
Başkan



Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM
Danışman



Doç. Dr. İrem EREL GÖKTEPE
Üye



Doç. Dr. Sedat ODABAŞ
Üye



Doç. Dr. Eda Ayşe AKSOY
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ Tezimin/Raporumun 03.06.2018 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- ☐ Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

03 / 07 / 2018

Gülşen
(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı

Gülşen MANAP

Annem Semire & Babam Çetin'e

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

05/06/2018

GÜLSEHER MANAP

ÖZET

ENJEKTE EDİLEBİLİR HEMOSTATİK FİBROİN MİKROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ

GÜLSEHER MANAP

Yüksek Lisans, Polimer Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

Haziran 2018, 94 sayfa

Hemostatik yara örtüleri ve kanamayı durdurucu biyomalzemelerin geliştirilmesi son yıllarda gelişmiş ülkelerin askeri ve sivil alanda çalışan araştırmacılar tarafından üzerinde durulan önemli bir araştırma konusudur. Günümüzde trafik ve iş kazalarının artması, halen devam etmekte olan savaşlar ve cerrahi alandaki yetersizlikler travmatik yaralanmaların sıklığını arttırmaktadır. Yaralanmalar sonucu meydana gelen kontrolsüz kanamaları durdurmak için konvansiyonel olarak gazlı bez veya çeşitli hemostatik yara örtüleri kullanılmaktadır. Ancak mevcut hemostatik yara örtüleri yara bölgesinin şeklini almada, iyileşme süreci boyunca mekanik bütünlüğünü korumada ve vücudun her bölgesindeki kanamaları güvenli bir şekilde durdurmada yetersiz kalmakta ve iyileşme sürecinde ısı artışı, pıhtılaşma bozukluğu gibi yan etkiler oluşturmaktadır. Bu nedenle her türlü kontrolsüz kanamanın güvenli bir şekilde durdurulabilmesi için yeni nesil hemostatik biyomalzemelerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Bu tez çalışmasının amacı yaralanmalar sonucu oluşan kontrolsüz kan kayıplarında kanamayı durduracak, enjekte edilebilir hemostatik fibroin temelli mikrojellerin geliştirilmesidir. Bu amaçla, *Bombyx mori* kozalarından düşük molekül ağırlıklı fibroin (<200 kDa) ekstrakte edilmiştir. Daha sonra, ipek fibroinin polimerik konformasyonel geçişleri (İpek I ve İpek II) kullanılarak, herhangi bir yüzey aktif madde veya organik çözücü kullanılmadan fibrinojen ve K Vitamini içeren 5 mikrondan küçük partikül boyutunda fibroin mikrojeller faz ayırma yöntemleri ile hazırlanmıştır. Fibroin mikrojeller, kimyasal,

morfolojik, termal, şişme özellikleri açısından geniş ölçüde karakterize edilmiştir. Ayrıca, mikroenjellerin viskoelastik davranışları reolojik analizler ile değerlendirmek. Hazırlanan mikroenjellere kayma gerilimi uygulanarak, enjekte edilebilirliği test edilmiştir. Daha sonra, biyouyumlulukları hücre canlılığı ile değerlendirilerek onaylanmıştır. Mikroenjellerin hemostatik performansı kan pıhtılaşma testleri ile gerçekleştirilmiştir.

Tüm mikroenjellerin, kararlı Silk II (β -kristalin) konformasyonunda olup, termal kararlılık ve yüksek biyouyumluluk sergiledikleri gözlenmiştir. Mikroenjeller arasında fibrinojen konjuge örneklerin (Fibgel-FngC) en yüksek termal kararlılığa sahip olduğu gözlenmiştir. Reolojik test sonuçları, yüksek molekül ağırlığına sahip fibroin (HM-Fibgel) ve fibrinojen konjuge edilmiş fibroin mikroenjeller (Fibgel-FngC ve Fibgel-KFngC) için depolama modülü (G') kayıp modülünden (G'') daha yüksek bulunarak, bu mikroenjellerin tipik bir jel davranışı gösterdikleri gözlenmiştir. Buna karşılık, düşük molekül ağırlıklı fibroin (Fibgel) ve K vitamini içeren mikrojel (Fibgel-K) örneklerinde ise G' , G'' 'den daha düşük bulunarak bu örneklerin hala sol durumunu koruduklarını göstermiştir. Fibrinojen yüklü fibroin mikroenjeller (Fibgel-Fng) için G' , G'' 'den biraz daha düşük bulunmuştur. Mevcut bulgular, HM-Fibgel, Fibgel-FngC ve Fibgel-KFngC örneklerinin viskoelastik özellik göstererek enjekte edilebilir formda olduklarını göstermiştir. Sitotoksikite testi, mikroenjellerin L929 fibroblast hücrelerine hiçbir toksik etki göstermediklerini, aynı zamanda hücre tutunmasını ve proliferasyonunu artırdıkları göstermiştir. Ayrıca, mikroenjeller üzerindeki kan 60 s içinde değişen derecelerde pıhtılaşırken, taze kan 60 s içinde pıhtılaşmamıştır. Bu sonuçlar fibroin bazlı mikroenjellerin hepsinin hemostatik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında enjekte edilebilir hemostatik fibroin mikroenjeller başarılı bir şekilde geliştirilmiştir. Bu mikroenjellerin uygulanan yaranın şeklini alması açısından hastanın uyumunu arttıracakı düşünülmektedir Aynı zamanda bu mikroenjellerin, protein yapısı ve morfolojik özellikleri nedeniyle, yara iyileşme sürecini başlatarak hasarlı bölgenin hızlı iyileşmesinde kritik öneme sahip olacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen TSA-2017-15397 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: ipek fibroin, mikrojel, hemostatik, enjektabl, yara jeli

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF INJECTABLE HEMOSTATIC FIBROIN MICROGELS

GÜLSEHER MANAP

Master of Science, Department of Polymer Science and Technology

Supervisor: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

June 2018, 94 pages

Recently, developing of homeostatic wound dressings and biomaterials capable of stopping the bleeding have been the important research subjects of military and civil trauma researchers of developed countries. At the present time, the increase in the traffic and work accidents, still continuing wars and inadequacies in the field of surgical operation are increasing the frequency of traumatic injuries. Conventionally, in order to stop the uncontrollable bleedings after traumatic injuries, gauze or different homeostatic wound dressings are being used. However, commercially available homeostatic wound dressings are insufficient in terms of getting the shape of the wound area, contributing to the wound healing process, stopping the bleeding safely in every region of the body and are containing side effects such as lack of heat increase for recovery process and clotting disorder. For this reason, a new generation of hemostatic biomaterials is needed to be developed in order to safely stop any uncontrolled bleeding.

The aim of this thesis is to develop an injectable fibroin based hemostatic microgel that capable of stopping the bleeding in an effective way in traumatic injuries in which there is an uncontrollable bleeding. In this regard, low molecular weight of silk fibroin protein (<200 kDa) was prepared by extraction from *B. mori* cocoons. Then, by using the polymeric conformational transitions (Silk I and Silk II) of silk fibroin, fibrinogen or Vitamin K containing fibroin microgels less than 5 micron was prepared by phase separation methods without using any surfactant or organic solvent. Thus, fibroin microgels were extensively characterized in terms of chemical, morphological, thermal, swelling properties. Moreover, rheological measurements were employed to assess the viscoelastic behavior of

the microgels. Adaptability to the injectable form was studied and optimized by applying shear stress to the microgels prepared microgels. Then, their biocompatibility was approved by assessing cell viability. Blood coagulation tests was performed to examine the hemostatic performance of the microgels.

It has been observed that all microgels were in stable Silk II (β -crystallin) conformation and exhibit thermal stability and high biocompatibility. Among them, fibrinogen conjugate microgels (Fibgel-FngC) had the highest thermal stability. The rheological test results demonstrated that yielding storage (G') for high molecular weight fibroin microgel (HM-Fibgel) and fibrinogen conjugated fibroin microgels (Fibgel-FngC, Fibgel-KFngC) was higher than loss modulus (G''), indicating the typical gel state. In contrast, G' was lower than G'' in low molecular weight fibroin microgel (Fibgel) and Vitamin K loaded microgel (Fibgel-K), indicating that they still maintained the sol state. For fibrinogen loaded fibroin (Fibgel-Fng) samples, G' was slightly lower than G'' . The current findings suggest that HM-Fibgel and fibrinogen conjugated microgels (Fibgel-FngC, Fibgel-KFngC) exhibit viscoelastic properties and these microgels which gives a fully injectable. Cytotoxicity test indicated that they are nontoxic on L929 fibroblast cells and also microgels induce cell attachment and proliferation. Further, the blood on the all microgels clotted with varying degree after 60 s, whereas fresh blood did not clot within 60 s. These results indicated that all fibroin based microjel exhibit hemostatic activity.

In conclusion, injectable hemostatic fibroin microgel was successfully developed. Also, in terms of getting the shape of the applied wound, it will improve the patient compliance. Further, due to its protein structure and morphological properties, by initiating the wound healing process, it will have a critical importance for the rapid healing of the damaged tissue.

This thesis was funded by a grant from Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Grant No.TSA-2017-15397).

Keywords: silk fibroin, microgel, fibrinogen, Vitamin K, hemostatic, injectable, wound gel

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında beni yönlendiren, yüksek lisans eğitimim boyunca kıymetli bilgi, birikim ve tecrübelerini benden esirgemeyen, yol gösterici yapısıyla akademik ortamda olduğu kadar sosyal ilişkilerde de kendisinden çok şey öğrendiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM'a,

Laboratuvar çalışmalarımda yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, bu çalışmayı hazırlarken geçirmiş olduğum süreçte tezime önemli katkılar sağlayan Semih ÇALAMAK'a,

Reolojik çalışmalar için laboratuvarını açan, deneylerime bizzat eşlik eden ve değerli yorumları ile tezime katkıda bulunan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Murat Şen'e,

Tez çalışmam boyunca bilgi ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Eda Ayşe AKSOY'a,

Tez çalışmamı, TSA-2017-15397 nolu proje kapsamında destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi'ne

Her zaman yüzümü güldüren Özlem YURTALAN'a

Birlikte çalışmaktan her zaman zevk aldığım, yüksek lisans eğitimim boyunca birçok şey paylaştığım canım arkadaşım Betül Süyümbike YAĞCI'ya,

Desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Ecem TANSIK'a,

Tez çalışmam boyunca hep yanımda olan, güler yüzü ve sabrı ile her zaman bana destek olan Ece KORUCU' ya,

Son olarak tüm hayatım boyunca bana her türlü imkanı yaratarak bugünlere gelmemi sağlayan, varlıklarından her zaman güç duyduğum, daima mutluluk ve huzur kaynağım olan canım aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLOLAR.....	viii
ŞEKİLLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ ve TEZİN AMACI	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hemostaz	3
2.1.2 Kan Koagülasyon Sistemi	4
2.2. Kan-Biyomalzeme Etkileşimi.....	7
2.3 Hemostatik Ajanlar.....	9
2.3.1. Hemostatik Ajanların Sınıflandırılması.....	9
2.3.2. Hemostatik Polimerler	9
2.3.3. Ticari Ürünler ve Karşılaşılan Zorluklar	20
2.4. Biyomedikal Alanda İpek Fibroin	20
2.4.1. İpek Fibroin Yapısı ve Özellikleri	20
2.4.2. İpek Fibroinin Biyomalzeme Olarak Kullanımı.....	24
2.4.3 İpek Fibroinin Hemostatik Özellikleri.....	28
2.5. Fibroin Mikroküre Elde Edilmesinde Kullanılan Yöntemler	29
3. MALZEME ve METOD	31
3.1. Malzeme	31
3.2. Metod.....	31
3.2.1. Fibroin Proteininin <i>B.Mori</i> Kozalarından Ekstraksiyonu.....	31
3.2.2. Düşük Molekül Ağırlıklarına Sahip İpek Fibroinlerin Eldesi	32
3.2.3. Faz Ayrımı Yöntemi ile Fibroin Mikrojellerin Hazırlanması	35
3.2.4. Hemostatik Mikrojellerin Hazırlanması	36

3.2.5. Mikrojellerin Karakterizasyonu.....	38
3.2.6. Enjekte Edilebilir Hemostatik Jellerin Hazırlanması ve Reolojik Karakterizasyonları	40
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	42
4.1. Fibroinin Molekül Ağırlığı Dağılımı	42
4.2. Fibroin Mikrojeller	45
4.3. Hemostatik Fibroin Mikrojeller.....	51
4.3.1. K Vitamini İçeren Fibroin Mikrojeller	51
4.3.2. Fibrinojen Yüklü/Konjuge Fibroin Mikrojeller.....	52
4.4. Fibroin Mikrojellerin Yapısal Özellikleri.....	55
4.4.2 K Vitamininin Mikrojel Yapısına Etkisi	58
4.4.3. Fibrinojenin Kimyasal Yapıya Etkisi	59
4.4.5. Konjuge Mikrojellerin X-Işınları Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) Analizi.....	61
4.6. Fibroin Mikrojellerin Şişme Özellikleri	63
4.7 Mikrojellerin Termal Özellikleri	66
4.8. Mikrojellerin Enjekte Edilebilir Özellikleri	72
4.10. Mikrojellerin Sitotoksitesi	77
4.11. Fibroin Mikrojellerin Hemostatik Etkileri.....	78
SONUÇLAR.....	81
KAYNAKLAR.....	82
EKLER	90
ÖZGEÇMİŞ.....	94

TABLÖLAR

Sayfa

Tablo 2.1 İpek fibroinin biyomedikal uygulamaları.....	25
Tablo 2.2. Fibroin mikroküre elde edilmesinde kullanılan yöntemler.	30
Tablo 4.1. Fibroin çözeltilerine ait ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı ve jirasyon katsayıları	44
Tablo 4.2. Fibroin mikrojellerin özellikleri	49
Tablo 4.3. Hemostatik mikrojellerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli	53



ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Koagülasyon sisteminin çeşitli elemanlarının bir arada antikoagülasyon ve prokoagülasyon arasındaki hassas dengeyi kurması ve hemostaz dengesinin korunması. ...	4
Şekil 2.2. Ekstrinsik koagülasyon yolağı. Kutu içerisinde olanlar reaksiyon ürünlerini göstermektedir [12].....	5
Şekil 2.3. İntrinsik koagülasyon yolağı. Kutu içerisinde olanlar reaksiyon ürünlerini göstermektedir [12].....	6
Şekil 2.4. Protein adsorbsiyonunun fazları A) Göç, B) Adsorpsiyon, C) Değişim, D) Denaturasyon, E) Adsorpsiyonun devam etmesi [16].	8
Şekil 2.5. a) Kollajenden jelatin eldesi, b) Jelatinin kimyasal yapısı [20].	11
Şekil 2.6. Selülozun oksidizasyonu sonucu oksidize selüloz elde edilmesi.....	13
Şekil 2.7. Kitosanın kimyasal yapısı	14
Şekil 2.8. Schiff-baz reaksiyonu	14
Şekil 2.9. Fibrinojen yapısı.....	16
Şekil 2.10. Fibrin polimerizasyonu	16
Şekil 2.11. Poli(siyano akrilat) kimyasal yapısı	17
Şekil 2.12. Poliakrilik asitin kimyasal yapısı	18
Şekil.2.13. Poliüretanın kimyasal yapısı	19
Şekil 2.14. K vitamininin molekül yapısı.....	19
Şekil 2.15. İpek böceği larvası, kozası ve yapısı.....	21
Şekil 2.16. İpek fibroinin kimyasal yapısı [57].	22
Şekil 2.17. İpek fibroine ait polipeptit zinciri	23
Şekil 2.18. Paralel ve antiparalel beta tabakalar.....	23
Şekil 3.1. İpek fibroinin <i>B.mori</i> kozalarından ekstraksiyon basamakları. A) İpek kozalar, B) Böcekleri çıkartılmış olan kozalar, C) Kozaların % 0.5 (w/v)'lik NaHCO ₃ çözeltisi içerisinde kaynatılması, D) İpek fiberlerin 9M LiBr içerisinde çözülmesi, E) Çözeltinin diyaliz kasedinde saf suya karşı diyaliz edilmesi, F) İpek fibroin sulu çözeltisi.	32
Şekil 3.2. Farklı yöntemlerle elde edilen fibroin örnekleri. A) %5 (w/v)'lik NaHCO ₃ sulu çözeltisinde farklı sürelerde hidroliz edilerek hazırlanan fibroin fiberler, B) LiBr içerisinde farklı sıcaklıklarda hidroliz edilerek hazırlanan fibroin çözeltileri, C) Farklı derişimlerde α -kemotripsin enzimleri kullanılarak hazırlanan fibroin sulu çözeltileri.....	33
Şekil 3.3. Faz ayrımı yöntemi ile ipek fibroin mikrojellerin elde edilmesi	36

Şekil 3.4. Fibroin/ PVA harman filmler. A) K vitamini içeren Fibroin/ PVA film, B) Fibrinojen içeren Fibroin/ PVA film.	37
Şekil 4.1. PVA derişimin mikrojel morfolojisine etkisi. A) ve B) % 5 (w/v) PVA, C) ve D) % 4 (w/v) PVA.	46
Şekil 4.2. Ultrasonikasyon süresinin fibroin mikrojel morfolojisine etkisi. A) 30 s, B) 90 s, C) 180 s, D) 300 s.....	48
Şekil 4.3. Farklı hidroliz sıcaklıkları uygulanarak hazırlanan fibroin mikroküreler; A) ve B) Fibgel -H70, C) ve D) Fibgel-H90.	48
Şekil 4.4. Farklı molekül ağırlığına sahip fibroin çözeltilerinden hazırlanan fibroin mikrojeller. A) ve B) Fibgel-D60, C) ve D) Fibgel-D90, E) ve F) Fibgel-D120, G) ve H) Fibgel-D180.....	50
Şekil 4.5. K vitamini içeren fibroin mikrojeller. A) ve B) % 1 (v/v) K vitamini içeren fibroin mikrojeller, C) ve D) % 3 (v/v) K vitamini içeren fibroin mikrojeller, E) ve F) % 5 (v/v) K vitamini içeren fibroin mikrojeller.	51
Şekil 4.6. Fibrinojen yüklü fibroin mikrojeller. A) ve B) % 1 (w/v) fibrinojen içeren mikrojeller, C) ve D) % 3 (w/v) fibrinojen içeren mikrojeller, E) ve F) % 5 (w/v) fibrinojen içeren mikrojeller.....	53
Şekil 4.7 Fibrinojen konjugasyonu ile elde edilen konjuge mikrojeller. A) ve B) Fibrinojen derişimi % 10 (w/v) olan Fibgel-FngC mikrojeller, C) ve D) Fibrinojen derişimi % 5 (w/v) olan Fibgel-FngC mikrojeller, E) ve F) Fibrinojen derişimi % 10 (w/v) olan Fibgel-KFngC mikrojeller, G) ve H) Fibrinojen derişimi % 5 (w/v) olan Fibgel-KFngC mikrojeller.	54
Şekil 4.8. Yüksek molekül ağırlıklı fibroin mikrojellerin (HM-Fibgel) FTIR spektrumu..	56
Şekil 4.9. Düşük molekül ağırlığına sahip fibroin örneklerin FTIR spektrumu.....	57
Şekil 4.10. K vitamini içeren mikrojellerin FTIR spektrumu.	58
Şekil 4.11. Fibrinojen içeren mikrojellerin FTIR spektrumu.....	60
Şekil 4.12. Fibrinojen konjuge mikrojellerin FTIR spektrumu.....	60
Şekil 4.13. Azot 1s temel seviye spektrumu	61
Şekil 4.14. Oksijen 1s temel seviye spektrumu.....	62
Şekil 4.15. Karbon 1s temel seviye spektrumu	63
Şekil 4.16. Fibroin mikrojellerin şişme davranışları.	64
Şekil 4.17. Hemostatik mikrojellerin şişme davranışları.	65
Şekil 4.18. Fibrinojen konjuge mikrojellerin şişme davranışları	66
Şekil 4.19. HM-Fibgel ve Fibgel örneklerine ait TGA termogramları.	67
Şekil 4.20. K vitamini ve Fibrinojen içeren mikrojellerin TGA termogramları.	68

Şekil 4.21. Fibrinojen ve K vitamininin TGA termogramları.	68
Şekil 4.22. HM-Fibgel ve Fibgel örneklerine ait DSC termogramları.	70
Şekil 4.23. Fibrinojen ve K vitamininin DSC termogramları.	70
Şekil 4.24. K vitamini ve fibrinojen içeren mikrojellerin DSC termogramları.	71
Şekil 4.25. Mikrojellerin jel davranışlarının makroskopik görüntüleri.	72
Şekil 4.26. Mikrojellerin viskozite özellikleri.	73
Şekil 4.27. Mikrojellerin viskoelastik bölgeleri	74
Şekil 4.28. Mikrojellerin viskoelastik davranışları.	76
Şekil 4.29. Hemostatik mikrojellerin L929 hücre canlılığına etkisi.	78
Şekil 4.30 <i>In vitro</i> tam kan pıhtılaşma testi. A) Mikrojellerin yüzeyinde pıhtı oluşumunu, B) yıkama çözeltisinde (fosfat tamponu) süspanse olan eritrositlerin görüntüleri.	79
Şekil 4.31 <i>In vitro</i> tam kan pıhtılaşma testi. A) % Hemoglobün (Antikoagölün içermeyen kan), B) % Hemoglobün (Sitratlı kan ile yürütölen), (Kontrolle kıyasla **** P<0.0001, *** P<0.0005, **P<0.001).	80
Şekil 4.32. Molekül ağırlığının azaltılması için herhangi bir işlem uygulanmamış fibroine ait Guiner eğrisi	90
Şekil 4.33. 60 dakika hidroliz edilerek molekül ağırlığı azaltılmış olan fibroine ait Guiner eğrisi	90
Şekil 4.34. 90 dakika hidroliz edilerek molekül ağırlığı azaltılmış olan fibroine ait Guiner eğrisi	91
Şekil 4.35. 120 dakika hidroliz edilerek elde edilen fibroine ait Guiner eğrisi.	91
Şekil 4.36. 180 dakika hidroliz edilerek elde edilen ipek fibroine ait Guiner eğrisi.	92
Şekil 4.37. 70 °C’ de hidroliz edilerek hazırlanan ipek fibroine ait Guiner eğrisi	92
Şekil 4.38. 90 °C’ de hidroliz edilerek hazırlanan fibroine ait Guiner Eğrisi	93

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Θ	Ölçüm yapılan açı değeri
R_{Θ}	Θ ölçüm açısındaki Rayleigh oranı
M_w	Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
A_2	İkinci viral katsayı
λ_0	Lazer dalga boyu
n_0	Çözücünün kırılma indisi
d_n/d_c	Kırılma indisinin derişimle değışimi
R_g	Jirasyon katsayısı
q	Saçılma vektörü
M_i	Mikrojellerin kuru ağırlığı
M_s	Mikrojellerin yaş ağırlığı
M_w	Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
eV	Elektron volt
T_g	Camsı geçiş sıcaklığı
T_m	Erime sıcaklığı
γ	Gerinim
G'	Depo modülü
G''	Kayıp modülü
η	Viskozite

Kısaltmalar

FTIR	Fouirer Dönüümlü Infrared Spektroskopisi
XPS	X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
TGA	Termogravimetrik Analiz
Fng	Fibrinojen
PVA	Polivinil Alkol
FDA	Food and Drug Administration
HMWK	Yüksek Molekül Ağırlığına Sahip Kininojen
CMC	Karboksimetil kitosan
Gly	Glisin
Pro	Pirolin
Hyp	Hidroksipirolin
RADA	Arginin, Alanin, Aspartik Asit
PAA	Poli(akrilik asit)
PVP	Polivinil prolidon
PEG	Poli(etilen glikol)
Ala	Alanin
Ser	Serin
EDC	N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodimid
NHS	N-Hidroksisüksinimid
PBS	Fosfat Tampon Tuzu
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SLS	Statik Işık Saçılımı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
ATR	Azaltılmış Toplam Yansıma
DMEM	Dulbecco'nun Minimum Esansiyel Besiyeri
FBS	Fetal Sığır Serum
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolyum bromür
PRP	Platelerce Zengin Plazma
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel
GPC	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
Hz	Hertz

1. GİRİŞ ve TEZİN AMACI

Hemostatik yara örtüleri genellikle vücut dışı yaralanmalar, travmatik kesikler, cerrahi girişimler sonrasında oluşan kanamalar, diş operasyonları veya çeşitli nedenlerle pıhtılaşma mekanizması bozuk bireylerin yaralanma veya cerrahi müdahaleler sırasında sıklıkla kullanılmaktadır. Yaralanmalar sonucu oluşan kontrol edilemeyen kanamalar konvansiyonel olarak, standart gazlı bez kullanılarak veya turnike uygulanarak durdurulmaya çalışılmaktadır. Ancak, turnike uygulanması kol ve bacak yaralanmalarının kontrolünde hayati önem taşıırken boyun, karın veya kasık gibi bölgelerde etkisiz kalmaktadır. Diğer taraftan klinikte kullanılan hemostatik yara örtüleri incelendiğinde kanama bölgesinde mekanik bütünlüğünü korumada yetersiz kalması, iyileşme sürecinde ısı artışı, pıhtılaşma bozukluğu gibi olumsuz etkilere sahip olduğu görülmektedir. Özellikle antikoagulant ilaçların kullanımına bağlı olarak bireylerde kanama süresinin uzaması, bireylerin yaralanmalar ve kesiklerinde kullanılmak üzere pratik olarak kullanılabilecekleri hemostatik yara örtülerine hala ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasında ipek fibroin mikrojel yapılı, biyobozunur, biyouyumlu ve aynı zamanda hemostatik özelliği sayesinde hafif kanamaların lokal kontrolünde etkin olacak ve sargılama ihtiyacını ortadan kaldıracak, enjekte edilebilir bir yara örtüsü geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Biyomalzeme olarak ilk kez ameliyat ipliklerinde kullanılan ipek fibroin, FDA onaylı bir polimer olup, yüksek biyouyumluluk, oksijen geçirgenliği, biyodegradasyon, minimum inflamatuvar etki, morfolojik elastikiyet ve mekanik özellikleri içerisine alan eşsiz bir biyomalzemedir. İpeğin sahip olduğu bu üstün özellikleri nedeniyle biyomedikal alanda jel, sünger, film ve fiber formlarında kullanılmaktadır. Ancak fibroin proteininin hemostatik özellikleri ile ilgili çalışmalar çok kısıtlıdır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada ipek fibroinin hemostatik özelliklerini incelenmiş ve molekül ağırlığı azaltılmış ipek fibroinin klinik olarak hemostatik uygulamalarda kullanılabileceği rapor edilmiştir. Hemostaz testlerinin yapılması sonucu düşük molekül ağırlıklı ipek fibroinin kan koagülasyonunun intrinsik yolunu aktive ettiği belirtilmiştir [1].

Mikrojeller; biyolojik, kimyasal ve mekanik özellikleri ayarlanabilen mikro ölçekli hidrojellerdir. Birbirinden ayrık ve kolloidal bir yapıya sahip olan mikrojeller, yığın jellere göre daha fazla yüzey alanı sağlarken, pH veya ısıya karşı duyarlılığı yığın jellere göre daha fazladır. Mikrojellerin yara örtüsü olarak tasarlanması ile ilgili literatür çalışmaları incelendiğinde sentezlenen mikrojellerin genellikle tekstil fiberlerin, filmlerin veya

kompozit hidrojenlerin içerisine entegre edilerek kullanıldığı görülmektedir [2, 3]. Literatürde hemostatik mikrojenlerle ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada K vitamini ve fibrinojenin fibroin mikrojenlere yüklenerek hemostatik etkisi incelenmesi planlanmıştır.

Fibrinojen, kan pıhtılaşma sürecinin en önemli bileşenlerinden biri olup aynı zamanda yara iyileşme sürecini desteklemede önemli bir yere sahiptir. Fibrinojen, disülfid bağları ile bağlı üç çift polipeptit zincirinden oluşan bir glikoprotein yapısıdır. Hemostazın ana substratı olan fibrinojenin eklenmesi koagülasyonun yönetilmesinde başlangıç basamağını oluşturmaktadır [4, 5]. Fibrinojen molekülünün uç kısımlarında, fibrin-fibrin bağlanma bölgelerini maskelemekte olan örtüler bulunmaktadır. Bu kısımlar uzaklaştırıldığında fibrin monomerleri polimerleşerek fibrin polimerini oluşturmaktadır. Oluşan fibrin fiberler bir ağ yapısı oluşturur ve pıhtılaşma faktörü olan faktör XIII sayesinde kararlı hale getirilir. Kararlı hale getirilmiş olan bu ağ yapısı kan hücrelerini tutarak kan pıhtısı oluşturur ve kan akışını durdurur [6]. Fibrinojen gibi kanın pıhtılaşmasını hızlandıran ajanları içeren hemostatik örtülerin kullanımı uygulamadaki kolaylığı ve etkinliği sebebiyle artmaktadır [7]. Diğer taraftan K vitamini pıhtılaşma proteinlerinin aktif formlarının sentezinde etkili, normal koagülasyonun sağlanmasında hayati öneme sahip bir vitamindir. K vitamini, faktör II, VII, IX, X, protein C ve protein S'in biyosentezlerinde görev almaktadır. K vitamini, faktörlerin glutamik asit kalıntılarının karboksilasyonunu sağlar ve böylece faktörlerde GIa oluşur. Oluşan GIa ve Ca^{+2} birlikteliğiyle de faktörlerin membranlara bağlanması sağlanarak koaglasyon sistemi desteklenir. K vitamini eksikliği durumunda faktörlerin karboksilasyonu gerçekleşemez buna bağlı olarak da koaglasyon sistemi aktive olamaz [8].

Kan koaglasyon sistemi açısından önemli bir yere sahip olan diğer bir etken ise Ca^{+2} iyonlarının varlığıdır. Ca^{+2} iyonlarının kan koaglasyon sisteminin içsel ve dışsal yolaklarında aktif rol aldığı literatürden bilinmektedir. Kan pıhtısının oluşumunda rol alan trombin enzimi Ca^{+2} iyonları varlığında aktive olabilmektedir.

Bu bilgiler ışığında ipek fibroin polimerinin konformasyonel geçişlerinden yararlanılarak ve molekülü ağrılığı dağılımı kontrol edilerek, fibrinojen ve K vitamini yüklü fibroin mikrojenlerin hazırlanmış ve daha sonra $CaCl_2$ zeltisi ile formüle edilerek enjekte edilebilir hemostatik jeller geliştirilmiştir.

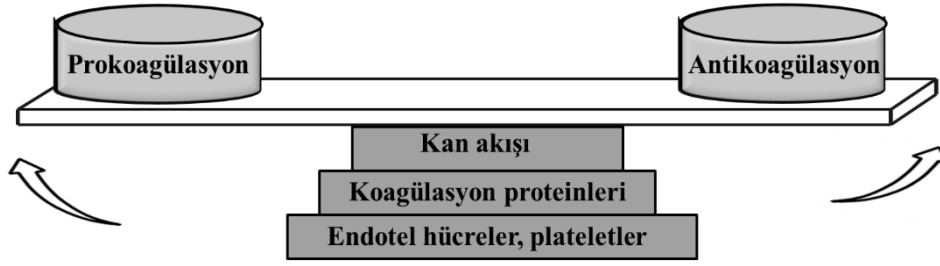
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hemostaz

Yunanca “aynı” ve “stabil” sözcüklerinden oluşan hemostaz, sadece organların bir arada bulunması anlamına gelmekle kalmayıp aynı zamanda tüm vücudu dengede tutan bedensel işlevlerin tamamını oluşturmaktadır. Kanın prokoagülasyonu ve antikoagülasyonu arasındaki çok hassas bir denge olan hemostaz, kan proteinleri, kan hücreleri ve kanın akış hızı gibi faktörlerin en ufak değişiminden oldukça fazla etkilenen çok hassas bir dengedir (Şekil 2.1). Herhangi bir yaralanma durumunda kanamanın durdurulmasını ve bu esnada da vücudun normal kan döngüsünün devamını sağlayan karmaşık bir fizyolojik süreçtir. Bu süreçte çeşitli plazma proteinleri plateletler, hücreler ve koagülasyon faktörleri görev yapmaktadır [9].

Hemostaz 3 etki mekanizmasının senkronize olarak aktive olması ile gerçekleşir. Bunlardan ilki vazokonstriksiyon, ikincisi plateletlerin birikerek yığın oluşturması ve son olarak kan koagülasyonu ile pıhtı oluşumudur [10]. Kan damarları zarar gördüğünde ilk olarak kan damarlarının kasılarak büzülmesi olarak bilinen vazokonstriksiyon meydana gelir. Hedefin kan kaybının minimuma indirilmesini sağlamak olduğu bu süreçte hasar görmüş olan bölgeye giden kan akışı yavaşlatılır. Kan eş zamanlı olarak damarlardaki bazal membranda bulunan kollajenlerle karşılaştığında plateletler kollajene yapışarak aktive olurlar ve adenosin difosfat, tromboksan ve serotonin gibi kimyasalların salımı başlar. Devamında plateletler hasar görmüş bölgeye giderek birikmeye başlar. Primer hemostaz olarak bilinen bu faz genellikle kısa süreli olup hemostatik pıhtı olumu ile sonuçlanmaktadır.

Bir sonraki aşama sekonder hemostaz olarak bilinmekte ve primer hemostaz aşamasında oluşan yumuşak platelet pıhtısı bu fazda çapraz bağlanarak kararlı pıhtı yapısının oluşmasıyla sonuçlanır [11].



Şekil 2.1. Koagülasyon sisteminin çeşitli elemanlarının bir arada antikoagülasyon ve prokoagülasyon arasındaki hassas dengeyi kurması ve hemostaz dengesinin korunması.

2.1.2 Kan Koagülasyon Sistemi

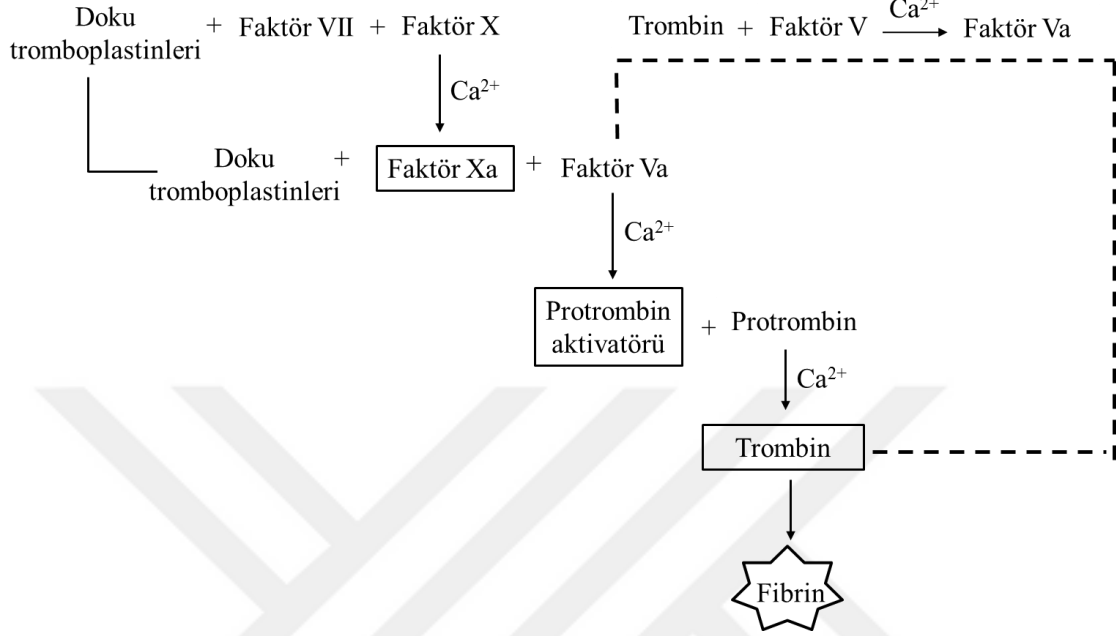
Çeşitli plazma proteinleri, koagülasyon faktörleri, kalsiyum iyonları ve plateletlerin görev yaptığı koagülasyon sistemi fibrinojenin fibrine dönüşümü ile tamamlanan bir süreçtir. Koagülasyon sistemi ekstrinsik (dışsal) yolak ve intrinsik (içsel) yolak olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır.

2.1.2.1 Ekstrinsik Yolak

Doku faktör yolağı olarak da bilinen ekstrinsik yolak tromboplastinler ve faktör III gibi doku faktörleri tarafından başlatılmaktadır. Bu proteinler kanda bulunmayan fakat damar çeperlerinden veya hasar gören damarları çevreleyen dokulardan salınan proteinlerdir [11]. Dokuda travma meydana gelmesi doku tromboplastinlerinin salımını başlatır. Doku tromboplastinlerinin faktör VII ile birleşmesi sonucu faktör VII aktive edilmiş olur. Oluşan bu kompleks enzimatik olarak faktör X'u aktive eder. Faktör Xa doku tromboplastinlerindeki veya plateletlerdeki fosfolipidlerle ve faktör Va ile birleşerek protrombin aktivatörünü oluştururlar. Ekstrinsik yolak fibrin oluşumu ile sonlanmakta olup bu yolağa ait diagram Şekil 2.2'de verilmiştir.

Ekstrinsik Yolak

Doku travması ve doku tromboplastinlerinin salımı



Şekil 2.2. Ekstrinsik koagülasyon yolağı. Kutu içerisinde olanlar reaksiyon ürünlerini göstermektedir [12].

2.1.2.2 İntrensik Yolak

İntrensik yolak, faktör XII tarafından tetiklenmektedir. Bu enzimin kanın yabancı bir yüzey ile temas etmesiyle birlikte aktive olmasından dolayı aynı zamanda temas-aktif yolak olarak da isimlendirilmiştir. İntrensik yolda öncelikle faktör XII, yabancı yüzey alanına bağlanarak aktive olur. Bu yüzey, sağlıklı endotel hücrelerine ait olan membranların haricindeki bir yüzey olarak tanımlanmakta olup, biyomalzeme yüzeyi de bu grubun içerisine dahil edilmektedir. Yabancı yüzeye tutunmuş plateletler veya hasar görmüş olan plateletler, membranlarındaki fosfolipidleri salarlar. Salınan bu bileşiğe platelet faktör III ismi verilmiş olup bu platelet türevi bileşikler intrinsik yolun iki farklı kısmında katılımda bulunurlar. Bunlardan biri faktör X'un aktivasyonu sırasında diğeri ise protrombin aktivatörünün oluşumu esnasındadır (Şekil 2.3). İntrensik yolak ve ekstrinsik yolak sonuç olarak ortak yolak olarak birleşir ve protrombini Ca^{2+} iyonları varlığında trombine dönüştüren faktör X'un aktivasyonu sağlanır. Trombin, çözünebilir bir plazma proteini olan fibrinojeni çözünmeyen fibrin proteinine dönüştürmekle kalmayıp aynı zamanda faktör

İntrinsik Yolak

Kanın yabancı bir yüzey ile temas etmesi

Faktör XII aktivasyonu

Faktör XII → Faktör XIIa

Faktör XIIa + Faktör IX → Faktör IXa (Ca²⁺)

Faktör IXa + Faktör X + Faktör VIIIa → Faktör Xa (Ca²⁺)

Faktör Xa + Faktör V → Faktör Va (Ca²⁺)

Faktör Va + Faktör Xa → Protrombin Aktivatörü (Ca²⁺)

Protrombin Aktivatörü → Trombin (Ca²⁺)

Trombin → Fibrin

Trombin + Faktör VIII → Faktör VIIIa (Ca²⁺)

Trombin + Faktör V → Faktör Va (Ca²⁺)

Platelet fosfolipidleri + Platelet faktör 3

Platelet fosfolipidleri + Faktör Xa + Faktör Va → Protrombin Aktivatörü (Ca²⁺)

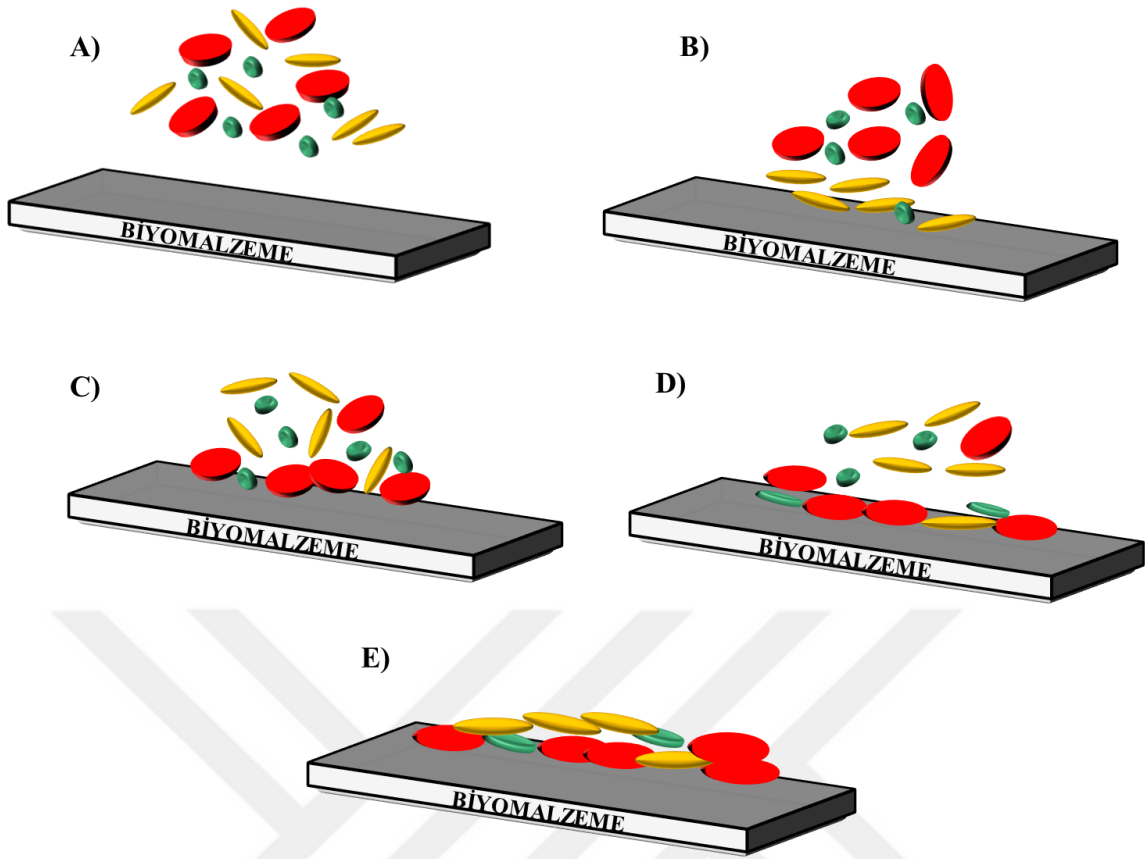
Platelet fosfolipidleri + Faktör Xa + Faktör VIIIa → Faktör Xa + Faktör VIIIa (Ca²⁺)

İntrinsik yolun başlangıç mekanizmasının anlaşılması özellikle kan ile temas edecek biyomalzemelerin geliştirilmesi açısından oldukça önemli bir yere sahiptir. Biyomalzeme kan ile temas ettiğinde kanda bulunan çeşitli proteinler malzeme yüzeyine adsorbe olurlar. Özellikle yüksek molekül ağırlığına sahip kininojen (HMWK) ve faktör XII biyomalzeme yüzeyine hızlıca yapışan iki bileşiktir. Adsorpsiyonda bazı faktör XII çeşitlerinden biri olan faktör XIIa aktive olur ve bu faktör XIIa prekallikreini kallikreine dönüştürme görevine sahiptir. Kallikrein daha sonra aktive olmamış herhangi bir faktör XII çeşidini karşılıklı olarak aktive eder. Faktör XIIa faktör XI'i aktive eder ve intrinsik yolak devam eder.

2.2. Kan-Biyomalzeme Etkileşimi

Biyomalzemelerin kan ile temas etmesi in vivo uygulamalara yönelik fonksiyonları belirlemektedir. Kan uyumlu biyomalzemeler literatürde kan koagülasyon sistemi üzerine etkisi olmayan biyomalzemeler için kullanılan bir tanım olsa da cerrahi müdahaleler, travma ve hemoraj kontrolünün sağlanması gibi durumlarda kan koagülasyon sisteminin harekete geçirilmesi hayati önem taşımaktadır. Diğer bir taraftan kardiyovasküler uygulamalarda pıhtı oluşumu istenmeyen bir durum olarak karşılanmakta ve bunu engellemek amacıyla antikoagülant özellik kazandırılmış biyomalzemelere ihtiyaç duyulmaktadır [14]. Bu sebeple kan-biyomalzeme etkileşiminin anlaşılması farklı amaçtaki uygulamaların kontrol edilebilmesi adına oldukça önem taşımaktadır [15].

Bir biyomalzeme kan ile temas ettiğinde gerçekleşen ilk olay plazma proteinlerinin biyomalzeme yüzeyine adsorbe olmasıdır. Plateletlerin aktivasyonu, koagülasyon sisteminin tetiklenmesi gibi birçok biyolojik reaksiyonların başlaması protein adsorpsiyonuna bağlı olarak gerçekleşmektedir. Biyomalzeme ile temas eden proteinlerin intrinsik koagülasyon yolununun aktivasyonunda etkili olması ve adsorbe olan fibrinojen, fibronektin gibi plazma proteinlerin platelet aktivasyonunu sağlaması bu biyolojik olaylara örnek olarak verilebilir [16]. Kan plazmasında farklı yüklere sahip, konsantrasyonları ve molekül ağırlıkları birbirinden farklı 150'den fazla protein bulunmaktadır. Herhangi bir biyomalzemenin kan ile temas etmesi durumunda malzeme yüzeyinin özelliklerine bağlı olarak gerçekleşen ilk olay plazmada bulunan bu proteinlerin biyomalzeme yüzeyine adsorbe olmasıdır. Saniyeler içerisinde gerçekleşen bu süreç göç, adsorbsiyon, değişim, denaturasyon ve devam eden adsorpsiyon olmak üzere beş fazda incelenebilmektedir. Bu fazlar Şekil 2.4'te şematik olarak verilmiştir.



Şekil 2.4. Protein adsorbsiyonunun fazları A) Göç, B) Adsorpsiyon, C) Değişim, D) Denaturasyon, E) Adsorpsiyonun devam etmesi [16].

Göç fazında taşınabilir protein molekülleri yüzeye doğru taşınmakta ve olay difüzyon sabitleri ve farklı türlerin konsantrasyonu ile kontrol edilmektedir. İkinci faz olan adsorpsiyonda protein molekülleri hidrofobik veya elektrostatik etkileşimler ile yüzeye tersinir olarak bağlanır. Değişim fazında yüksek molekül ağırlığına ve yüzey afinitesine sahip olan protein molekülleri yüzeye daha erken gelen diğer protein molekülleri ile yer değiştirmektedir. Adsorbe olan proteinler zamanla yüzeyde yayılmaya başlar ve bunun sonucunda konformasyonlarında değişiklikler meydana gelir. Bu nedenle bu faza denaturasyon ismi verilmektedir. Son fazda adsorpsiyon devam etmekte ve yüzeye adsorbe olan proteinler biyomalzeme yüzeyinde bir çeşit protein kaplaması oluşturmaktadır.

2.3 Hemostatik Ajanlar

Hemostatik ajanlar, kanamanın meydana geldiği durumlarda hastane öncesinde hemostazın sağlanmasında önemli bir role sahiptir. Bu amaçla kanama durumunda ilk uygulanacak adım turnike uygulamasıdır. Fakat turnike uygulanması olanaksız olan boyun, koltuk altı ve kasık gibi bölgelerdeki kanamalarda topikal hemostatiklerin kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Topikal hemostatikler hemostazın sağlanması amacıyla kullanılan ve küçük çaplı damarların hasar görmesiyle oluşan kanamalarda dokuların yüzeyine bölgesel olarak uygulanan ajanlardır. İdeal bir hemostatik ajandan beklenen özellikler kolay ve ucuz olması, enfeksiyon riski taşıması, alerjik etki yaratmaması ve raf ömrünün minimum iki yıl olmasıdır.

2.3.1. Hemostatik Ajanların Sınıflandırılması

Baskı ve turnike uygulamasının uygun olmadığı kanama bölgeleri için hemostatik polimerik jeller, mikro süngerler gibi çeşitli hemostatikler uygulanmaktadır. Hemostatik ajanlar etki mekanizmalarına göre faktör yoğunlaştırıcılar, mukoadhezif örtüler ve prokoagülant destekleyiciler olmak üzere 3 sınıfta incelenmektedir. Faktör yoğunlaştırıcılar; kanın sulu fazını hızlı bir şekilde absorbe ederek hücresel ve protein bileşenlerinin artması sonucunda pıhtı oluşturur. Dokuya güçlü bir şekilde adhere olan mukoadhezif örtüler yara bölgesindeki kanamayı fiziksel olarak bloke edici özelliğe sahiptir. Prokoagülant destekleyicilerin mekanizması ise kanamakta olan bölge üzerine prokoagülant faktörlerin iletimini sağlayarak ilerlemektedir [17].

Hemostatik ajanlar kullanılan malzemenin kaynağına göre genel olarak biyolojik kaynaklı ve sentetik kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar arasından polimer bazlı olanlar işlenebilirlikleri, iyi mekanik özelliklere sahip olmaları ve ayarlanabilir fonksiyonalliteye sahip olmaları sayesinde hemostatik ajan üretiminde en çok tercih edilen malzemelerdir.

2.3.2. Hemostatik Polimerler

Polimer bazlı hemostatik örtüler tasarlanırken etki mekanizmasının belirlenmesi dışında genel yapı-özellik ilişkilerinin de aydınlatılması gerekir. Literatürde polimer zinciri içerisindeki elektriksel yüklerin hemostazın sağlanmasında etkili olduğu belirtilmektedir. Özellikle pozitif ve negatif yükler çeşitli yollarla koagülasyon faktörlerini aktive ederek koagülasyon sistemini tetikleyebilmektedir. Bunlar aynı zamanda plateletleri aktive edebilir ve diğer kan proteinleri ile bir araya gelerek yara bölgesinde bir çeşit pıhtı oluşturabilirler.

Ayrıca hidroksil ve amin grupları gibi farklı yüklere sahip olan fonksiyonel grupların hidrojen bağı yapabilir olması polimeri daha hidrofilik bir yapıya ulaştırarak mukoadhezif özellik kazandırabilir. Hidrofilitesinin artırılması polimerin kanın sulu fazını absorplamasına ve böylece yara bölgesinde koagülasyon faktörleri ile plateletlerin birikmesiyle hemostazın sağlanmasına yardımcı olur. Bu nedenle hemostatik olarak kullanılacak polimerlerin geliştirilmesinde araştırmacının moleküler tasarımı belirlerken çevreye zararlı olmayan bir kimyasal prosesin seçilmesine, ekonomik olmasına ve endüstriyel üretiminin zor olmamasına, biyouyumlu ve biyobozunur özellikte olmasına önem vermelidir [10].

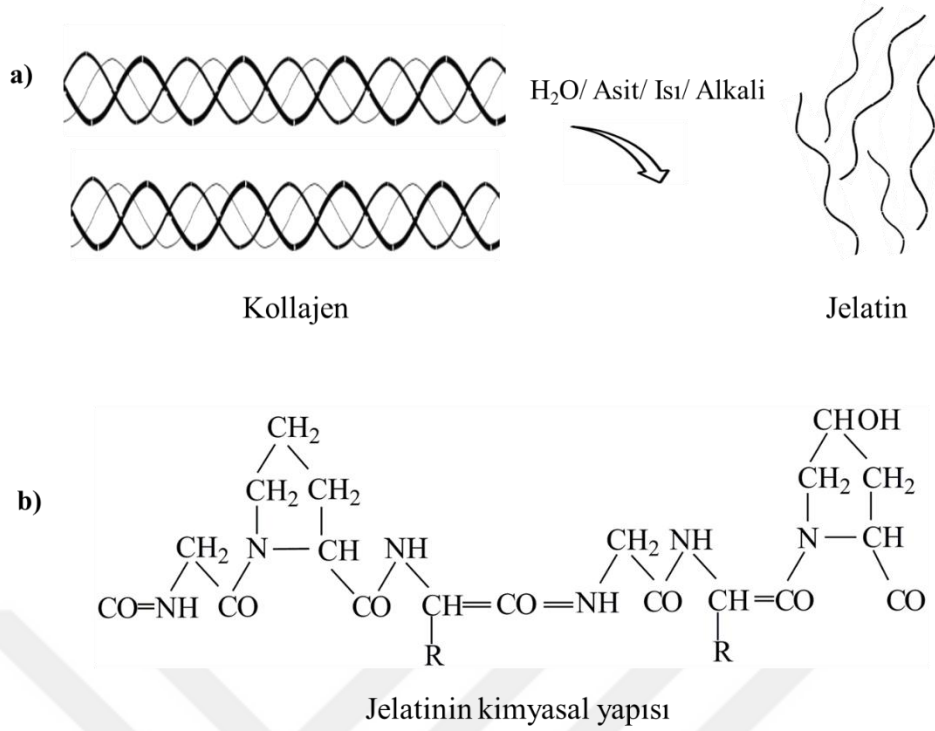
Literatürde hemostatik ajan olarak kullanılan çeşitli sentetik ve doğal polimerler bulunmaktadır. En çok çalışılan sentetik polimerler poli(siyanoakrilat)lar, poliakrilik asit, polimerik nanopartiküller ve bazı poliüretanlardır. Polipeptidler, kollajen, jelatin, oksidize selüloz, kitosan ve dekstran en çok tercih edilen doğal polimerlerdir.

2.3.2.1. Hemostatik Ajan Olarak Doğal Polimerler

Kollajen ve jelatin

Deri ve kas dokularının ana bileşeni olan kollajen insan vücudunda en fazla bulunan protein çeşididir. Doğal bir biyopolimer olan kollajenin 25 farklı türü olduğu ve bunlardan kollajen tip I ve kollajen tip III' ün hemostazın sağlanmasında kullanıldığı bilinmektedir [18]. Kollajen yapısal olarak üçlü helikal bölgeler içeren polipeptid zincirlerinden oluşmakta ve etki mekanizmasına göre fizyolojik hemostaz sağlamaktadır. Kanayan bölgeye adhere olan kollajen, kan plazmasında bulunan aktivasyon faktörleri ile etkileşerek platelet adhezyonunu tetikler. En bilinen kollajen hemostatik ajanlar Colgel, Helitene ve Avitene'dir. Mikrofibriller yapıda olan bu hemostatikler diğer ürünlerle karşılaştırılmış ve enfeksiyon riskini azaltmada diğer ürünler kadar etkili olmadığı belirtilmiştir [19].

Kollajen türevi bir protein olan jelatin asit prosesi, alkali prosesi, sıcaklık-basınç yöntemi ve enzimatik prosesi gibi çeşitli yöntemler uygulanarak memelilerden, çeşitli kuş ve balık türlerinden ekstrakte edilen kollajenin kısmi hidrolizi ile elde edilmektedir. Jelatin, hayvan derisi ve kemiğine ait bağ dokularının esas yapısal proteindir. Fibröz bir yapıya sahiptir ve kollajende olduğu gibi glisin (Gly), pirolin (Pro), hidroksipirolin (Hyp) temel amino asitlerinin tekrarlayan birimlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.5).



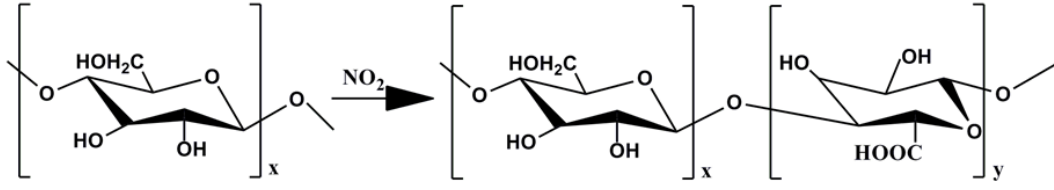
Şekil 2.5. a) Kollajenden jelatin eldesi, b) Jelatinin kimyasal yapısı [20].

Suda çözündüğünde kolloidal bir jel formunu alan jelatinin hemostatik uygulamalarında genel olarak sünger formu tercih edilmekle birlikte toz ve jel formları da mevcuttur [18, 21]. Jelatin bazlı ticari hemostatik ürünlerden en yaygın olanları Gelfoam (Pharmacia & Upjohn), Surgifoam (Ethicon) ve FloSeal (Baxter Healthcare) olarak bilinmektedir. Gelfoam, suda çözünmeyen, poröz, bükülebilir bir yapıya sahip, domuz derisinden ekstrakte edilen jelatinden üretilmiş sünger formunda ticari bir üründür. Kanama bölgesine uygulandığında şişme özelliği göstermesi omurilik veya beyin gibi kanama bölgesi dar olan alanlardaki sinirleri sıkıştırabileceğinden uygulamaları kısıtlamaktadır. Toz formunda da üretilmiş olan Gelfoam steril su ile birlikte kullanılarak daha çok damar kanamalarının durdurulmasında kullanılmaktadır. Gelfoam uygulandıktan sonra yapılan incelemelerde üründe bakteri üremesi sonucu enfeksiyon oluşması veya hastada toksik şoka sebep olabildiği rapor edilmiştir [21]. Surgifoam sünger, toz veya yapıştırıcı formları mevcut olan, şekli belli olmayan düzensiz yara bölgeleri için kullanımı uygun ve yine domuz derisinden ekstrakte edilen jelatinden üretilmiş ticari bir üründür. FloSeal ise sığır jelatininden üretilen ve içerisinde insan trombini bulunan viskoz jel formundaki diğer bir ticari üründür.

Oksidize selüloz

Doğada en fazla bulunan polisakkarit olarak bilinen selüloz, yapısında β -1,4-glikozidik bağlar içeren doğal bir polimerdir. Bitkilerden, bakterilerden ve pamuktan elde edilebilen selülozun özellikleri ve buna bağlı olarak hangi uygulamada kullanılacağı elde edildiği kaynağa göre değişiklik göstermektedir. Selülozun antihidroglukoz birimlerinin her birinde bulunan hidroksil grupları güçlü moleküller arası bağlar yaparak selüloza yüksek kristallik özelliği kazandırır. Selülozun suda ve genel organik çözücülerde çözünmemesinin sebebi sahip olduğu kristalin yapısıdır. Kristalinite selülozun elde edildiği kaynağa göre çeşitlilik göstermekle birlikte genel olarak %40 - %60 arasında değişmektedir [22]. Selülozun endüstriyel alanda ve laboratuvarında kullanılabilmesi için yapıdaki hidroksil gruplarının oksidize edilmesi oldukça önemli bir yere sahiptir. Oksidize selüloz primer -OH gruplarının oksidize edilmesi sonucu elde edilen ve genel olarak absorbe olabilen hemostatik örtü olarak uygulama alanı bulmaktadır. Oksidizasyon işlemi kloroformla azot dioksitin kullanımı, alkali metal nitrit ve nitratların kullanımı ve güçlü asitlerin kullanıldığı çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 2.6). Hemostatik etkilerinin yavaş olması ve yüzeyinin asidik özellik göstermesi oksidize selüloz bazlı hemostatik örtülerin kullanımını sınırlamaktadır.

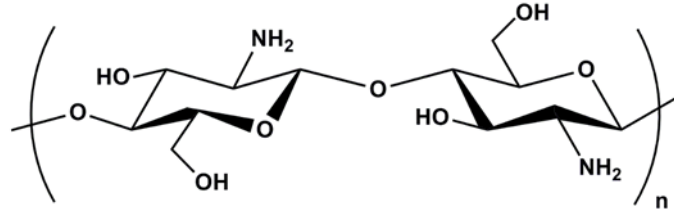
Cheng ve ark. yapmış oldukları çalışmada oksidize selülozu karboksimetil kitosanla birlikte kullanarak antibakteriyel ve hemostatik etkisi iyileştirilmiş kompozit örtü geliştirmişlerdir [23]. Bu çalışmada öncelikle kitosan kloroasetik asitin eterifikasyon ajanı olarak kullanıldığı alkali çözelti içerisinde suda çözünebilir hale getirilmiştir. Kitosanın karboksimetil gruplarının N ve O pozisyonlarına geçmesiyle karboksimetil kitosan (CMC) elde edilmiştir. Bu yapının oksidize selüloz ile birlikte kullanılmasıyla suda çözünebilir, antibakteriyel ve hızlı hemostatik etki gösteren örtüler geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan oksidize selüloz bazlı ticari ürün Surgicel'dir. Bitki kaynaklı selülozdan üretilen Surgicel, pıhtı oluşumunu tetikleyen ve pıhtı oluşumuna elverişli üç boyutlu yapının elde edilmesini sağlayan topikal bir hemostattır. Adhezyon özelliğinin düşük olması sebebiyle ıslak çevre koşullarında yara bölgesine etkili bir şekilde yerleştirilememesinden dolayı sadece hafif şiddetteki kanamalar için kullanımının uygun olacağı belirtilmiştir [24].



Şekil 2.6. Selülozun oksidizasyonu sonucu oksidize selüloz elde edilmesi

Kitosan

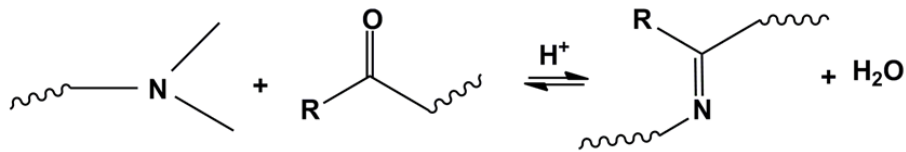
Kitinin deasetilizasyonu sonucu elde edilen kitosan, yara bölgelerinde hızlı iyileşme sağlayan katyonik doğal bir polimerdir. Lineer bir yapıya sahip olan kitosan D-glukozamin ve N-asetil glukozamin birimlerinden oluşmakta ve amino/asetamid grubu, primer ve sekonder hidroksil grupları olmak üzere üç reaktif fonksiyonel grup içermektedir (Şekil 2.7) [25]. Kitosanın biyobozunurluk ve hemostatik özellikleri deasetilizasyon derecesine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Düşük deasetilizasyon derecesine sahip kitosanın biyobozunma hızının daha yüksek olduğu, ayrıca deasetilizasyon derecesinin düşmesiyle kitosanın daha iyi hemostatik aktivite gösterdiği literatürde belirtilmiştir [26]. Kitosanın hemostatik etki mekanizmasının kitosanın protonlanmış amin grupları ile kan hücrelerinin negatif yüklü hücre membranı arasındaki elektrostatik etkileşim üzerinden yürüdüğü bilinmektedir. Bu etkileşim sonucunda kan hücrelerinin kanama olan bölgede birikmesi sonucu pıhtı oluşturduğu belirtilmiştir. Örtü formundaki kitosanların ise dokuya adhere olarak kanamayı engellediği ve yara alan bölgenin üzerini kapladığı belirlenmiştir [27]. Bu ürünler arasında HemCon ve QuickClot kullanımı en yaygın olan hemostatik ürünler olup Birleşik Devletler ve Birleşik Krallık askeri kuvvetlerinde ilk yardım uygulamalarında kullanılmak üzere onaylanmıştır [28]. HemCon, kitosan bazlı bandaj formunda bir hemostatik ürün olup etki mekanizmasına göre mukoadhezif gruba dahildir. Yapısındaki kitosanın protonlanmış amin grupları ile kırmızı kan hücrelerinin negatif yüklü membranları elektrostatik olarak etkileşimi ile aktive olmaktadır.



Şekil 2.7. Kitosanın kimyasal yapısı

Dekstran

Dekstran α -(1 $\rightarrow$ 6) bağlarına sahip D-glukoz ana zincirlerinden oluşan, lineer yapıya sahip suda çözünabilirliği yüksek doğal bir polisakkarittir [29]. Yapısındaki hidroksil gruplarının varlığı sayesinde çeşitli proteinler ve farmasötik ajanların yapıya entegre edilmesi sağlanmaktadır [30]. Biyouyumluluğu, biyobozunurluğu, antijenik ve immunojenik etkisinin olmaması dekstranın medikal alanda farklı uygulamalarda kullanılmasını sağlamaktadır. Bunlara ek olarak yumuşak doku mühendisliğinde kullanılması, *in vivo*da protein ve enzimlerin immünojenitesi düşürmesi gibi çeşitli fizikokimyasal özellikleri dekstranın hemostatik malzeme olarak kullanımını sağlamaktadır [31]. Literatürde dekstranın birçok hemostatik malzeme ile beraber kullanılarak hemostatik etkisi artırılan ürünler elde edildiği görülmektedir. Balakrishnan ve ark. yapmış oldukları çalışmada oksidize edilmiş dekstranın kitosan hidroklorid ile etkileşime girererek Schiff-baz reaksiyonu aracılığıyla *in situ* jelleşme özelliğinde hemostatik etkili doku yapıştırıcısı geliştirmişlerdir [32]. Schiff- baz reaksiyonu oksidize dekstran ile primer amin gruplarına sahip olan polimerlerin bir araya gelerek oluşturduğu karışımın polimerizasyonudur (Şekil 2.8). Schiff- baz reaksiyonundan yararlanarak hemostatik aktiviteye sahip adhezifler üretilmektedir [33].



Şekil 2.8. Schiff-baz reaksiyonu

Polipeptitler

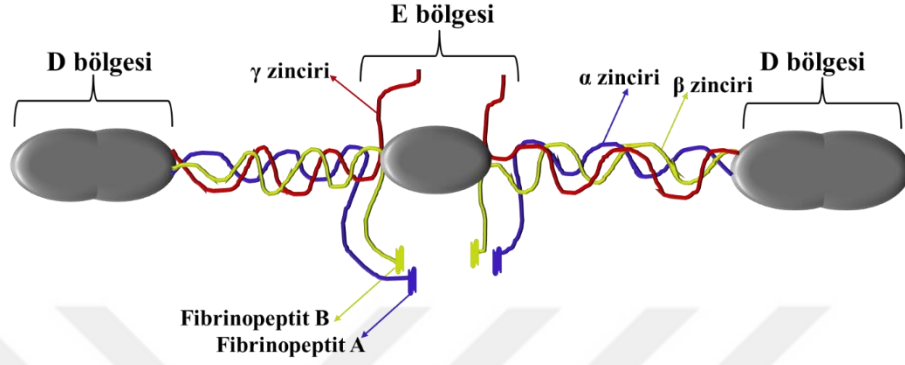
Protein ve enzimleri oluşturmak üzere bir araya gelebilen 20 farklı aminoasit çeşidi bulunmaktadır. Bu aminoasitlerin iskelet yapıları aynı olup yalnızca α - karbon atomlarına bağlı olan sübstitüentler farklılık göstermektedir. Peptit molekülleri hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler, Van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimler gibi kovalent olmayan bağların etkisiyle kendiliğinden bir araya gelerek kararlı yapılar oluşturmaktadır. Kendiliğinden bir araya gelme özelliği (self assembly) olarak bilinen bu durum, peptitlerin hemostatikler dahil pek çok alanda kullanımını sağlamaktadır. Kendiliğinden bir araya gelen polipeptitler hemostaz alanında genellikle nanofiber ve hidrojel formunda kullanılmaktadır [34]. RADA16 (R: arginin, A: alanin, D: aspartik asit) hemostatik ajan olarak kullanılan jel formunda bir polipeptittir. Düşük pH özelliğinden dolayı canlı dokuların zarar görmesi ve fizyolojik koşullar altında kararlı yapısını koruyamaması hemostatik kullanımını sınırlamaktadır [35]. Nie ve ark nın yapmış oldukları çalışmada Michael katılması ile çapraz bağlanmış polipeptit /polisakkarit bazlı in situ jelleşen hidrojel hemostatik ajan geliştirilmiştir. Bu çalışmada ϵ -Polylysine ve tiyol ile modifiye edilmiş kitosan birlikte kullanılmıştır. ϵ -Polylysine bir homopoliamit olup sahip olduğu primer amin grupları sayesinde nötral çözeltilerde katyonik özellik göstermekte ve bu sayede hedef doku ile iyonik etkileşimler sağlanarak adhezif özellik kazanmaktadır [36].

Fibrinojen

Kan koagölasyon mekanizmasının en önemli faktörlerinden olan fibrinojen sadece hemostaz dengesinin sağlanması değil, aynı zamanda doku hasarına bağlı olarak gerçekteşen inflamasyon cevabında, yara iyileşmesinde ve hücresel etkileşimlerde de önemli rollere sahiptir [4]. Kan sirkölasyonunda bulunan koagölasyon proteinleri içerisinde en yüksek konsantrasyona sahip olan fibrinojendir ve sağlıklı bir bireyde bulunan fibrinojen miktarı 2.0- 4.5 g/L aralığındadır. Kanamanın olduğu durumlarda ise bu miktar 1 g/L'nin altına düşebilmekte ve bu miktar kritik seviyeyi ifade etmektedir [37]. Faktör I olarak da bilinen fibrinojen, kanama durumunda konsantrasyonu kritik seviyeye düşen ilk koagölasyon faktörüdür. Bu nedenle hastanelerde hemoraj durumundaki hastaya genellikle ilk olarak fibrinojen desteği verilmektedir [38].

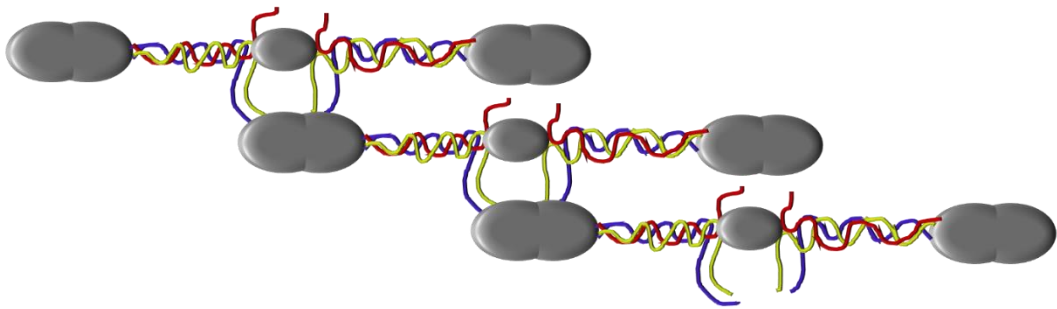
Fibrinojen 340 kDa molekül ağırlığına sahip ve boyutu 45 nm olan bir glikoproteindir. Yapısal olarak incelendiğinde dışta iki D kısımlarından ve bu iki D kısımlarının bağlı olduğu merkezde bulunan E kısmından oluşmaktadır. Her bir D bölgesi α , β ve γ olarak adlandırılan

üç polipeptit zincirinden oluşmaktadır (Şekil 2.9). Bu üç polipeptit zinciri birbirine disülfid köprüleri ile bağlıdır ve bu yapının tamamı çift kıvrımlı bir konfigürasyon oluşturmaktadır. D kısımları da merkezdeki E kısmına çoklu disülfid bağları ile bağlıdır ve her bir zincir serbest –COOH terminal grubuna sahiptir [39, 40].



Şekil 2.9. Fibrinojen yapısı

Koagülasyon sırasında trombin fibrinojen molekülüne α ve β polipeptit zincirleri üzerinde yer alan spesifik aminoasit sekansları üzerinden bağlanarak sonda bulunan fibrinopeptitleri (N-terminal peptitler) uzaklaştırır ve polimerizasyona katılacak bölgeler açığa çıkar. Bu polipeptitler ile komşu fibrinojen monomerinin D kısımlarında bulunan bağlanma noktaları arasında kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla Şekil 2.10’ da gösterilen fibrin polimerizasyonu gerçekleşir [41].

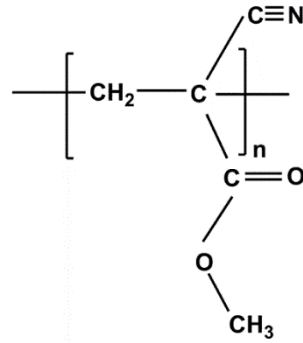


Şekil 2.10. Fibrin polimerizasyonu

2.3.2.2. Sentetik Kaynaklı Malzemeler

Poli(siyanoakrilat)lar

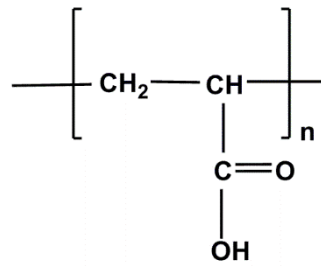
Siyanoakrilatlar, dokular arasındaki adhezyonu sağlayan ve fiziksel bir bariyer oluşturarak kan kaybının artmasını engelleyen polimerizasyon hızı yüksek sıvılardır [42]. Siyanoakrilatların yapısında bulunan C=C bağlarının yüksek elektron eksikliği göstermesi sayesinde siyanoakrilatlar kan içeriğindeki su gibi nükleofillerin varlığında çok hızlı bir şekilde polimerize olmaktadır. Şekil 2.11’de kimyasal yapısı verilmiş olan siyanoakrilatların polimerizasyon sonucu yüksek molekül ağırlığına sahip, amorf yapıda renksiz bir polimer oluşmaktadır. Oluşan polisiyanoakrilatlar, yüksek polariteye sahip olması sayesinde dokulara hızlı adhere olabilmekte ve dokuları bir arada tutarak kanamayı durdurabilmektedir. Polisiyanoakrilatlar zincir uzunluklarına göre sınıflandırılmaktadır. Kısa zincir yapısına sahip olan etil ve metil-siyanoakrilatlar dokularda yüksek toksisiteye sebep olmakta, uzun zincir yapısına sahip olan bütül ve oktil-siyanoakrilatların ise toksik özellik göstermemekte fakat dokularda inflamasyona sebep olabildikleri belirtilmektedir. Siyanoakrilat bazlı ürünler yüksek maliyete sahip olup genellikle yüzeysel yaralanmalardan kaynaklanan kanamaların durdurulmasında kullanılmaktadırlar. HistoAcryl®, LiquiBand® ve PeriAcryl® ise genel olarak en bilinen siyanoakrilat bazlı ticari ürünleri oluşturmaktadır.



Şekil 2.11. Poli(siyano akrilat) kimyasal yapısı

Poli(akrilik asit)

Poli(akrilik asit) (PAA) çeşitli ilaç formülasyonlarında kullanılan, polimer zincirindeki –COOH grupları (Şekil 2.12) sayesinde çevresel uyarılara cevap verebilen çapraz bağlı hidrojeller oluşturabilen ve biyoadhezif özelliğe sahip bir sentetik polimerdir [43]. Suda şişebilen çapraz bağlı poli(akrilik asit) hidrojeller kullanımı kolay ve güvenilir olan hidrojellerdir. Ito ve ark. yapmış oldukları çalışmada her ikisinin de farmasötik uygulamalardaki kullanımı güvenli olan PAA ve PVP (polivinil prolidon) polimerlerini birlikte kullanmış ve hemostatik alanda kullanılmak üzere dokuya adhere olarak vücut sıvılarını absorplayabilen yapışkan bir hidrojel geliştirmişlerdir [44]. PAA çözeltisinden elde edilen PAA filmi, PVP sulu çözeltisinde çözölmüş ve aralarında oluşan H bağı sayesinde PAA-PVP hidrojelini elde edilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise karboksimetil kitosan üzerine graft edilmiş poliakrilik asitten oluşan porlu yapıda ve “superabsorbent” olarak tanımlanan jel formunda hemostatik yara örtüsü geliştirilmiştir. Yüksek şişme kapasitesine sahip olan superabsorbent biyomalzemenin, Yeni Zelanda tavşanları üzerinde yapılan hayvan deneylerinde, modifiye edilmiş olan bu polimerin hemostatik özellikleri incelenmiş ve piyasadaki diğer ürünlerle karşılaştırma yapıldığında hemostatik özelliğinin diğer ürünlere kıyasla daha iyi olduğu belirtilmiştir [45].

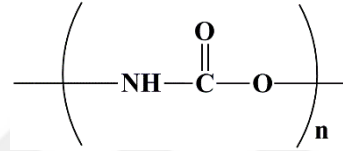


Şekil 2.12. Poliakrilik asitin kimyasal yapısı

Poliüretan

Poliüretanlar segmental polimer yapısı sayesinde göstermiş oldukları mekanik özellikleri, farklı fiziksel özelliklerde kullanılabilmeleri ile kan ve doku uyumlulukları sayesinde biyomedikal alanda sıklıkla kullanılan polimerlerdendir [46]. Literatürde poliüretanların hemostatik etki mekanizmasına dair net bilgi bulunmamakla birlikte, poliüretanların prokoagülant desteği veya farklı polimerlerin eklenmesiyle hemostatik etki kazandırıldığı

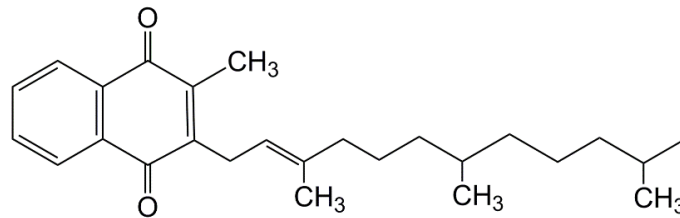
belirtilmiştir. Poliüretan köpüklerin hemostatik etkisinin *in vitro* olarak incelendiği bir çalışmada hemostatik etki gösteren biyobozunur poliüretan sentezlenmiştir. Bu sentezde bütandiol ve 1,4-bütandiizosiyanat sert segment olarak, DL-laktid, ε-kaprolakton ve poli(etilen glikol) (PEG) yumuşak segment olarak kullanılmış olup PEG oranının artırılmasıyla malzemenin hidrofilik özelliği artırılmıştır. Bunun dışında poliüretan yüzeyi belirli miktarlarda prokoagulantlarla kaplanarak hemostatik etkinin artırılması sağlanmıştır [47]. Üretan grubunun yapısı Şekil 2.13’ te verilmiştir. Lundin ve ark. yapmış olduğu diğer bir çalışmada ise poliüretan köpük içerisine farklı konsantrasyonlarda kaolin eklenerek hemostatik etkisinin artırılması planlanmıştır [48].



Şekil.2.13. Poliüretanın kimyasal yapısı

K vitamini

Vitamin K (fitonadion), Dünya Sağlık Örgütü'nün insan sağlığı sisteminde gerekli olan önemli temel ilaçlar listesinde yer alan hayati bir medikaldir. Yağsı bir yapıya sahip olan K vitamini hidrofobik özellikte olup kanama durumunda veya kanama riskinin bulunduğu durumlarda kullanılan önemli bir prokoagülandır. K vitamininin molekül yapısı Şekil 2.14.’te görülmektedir. K vitamini kan koagülasyon sisteminde aktif rol alan Faktör II, Faktör VII, Faktör IX, Faktör X koagülasyon proteinlerinin karaciğerde sentezlenmesi sonrasında pıhtılaşma sırasında aktifleşmesini sağlamaktadır [49, 50].



Şekil 2.14. K vitamininin molekül yapısı

2.3.3. Ticari Ürünler ve Karşılaşılan Zorluklar

Çok sayıda üretici firma herhangi bir cerrahi müdahaleye gerek duyulmadan hemostazın sağlanabilmesi amacıyla çeşitli hemostatik örtüler üretmektedir. Piyasada travmatik yaralanmaların tedavisine yönelik kanamayı durdurucu çok sayıda ticari malzeme bulunmakla birlikte literatürde halen uygun bir tedavi yönteminin geliştirilemediği belirtilmektedir [17]. Askeri ve sivil uygulamalarda kullanımı onaylanmış olan hemostatik ürünler ticari olarak ilk jenerasyon, ikinci jenerasyon ve üçüncü jenerasyon olmak üzere gruplandırılmışlardır.

Bu hemostatik ürünlerde karşılaşılan sorunlar biyobozunurluğun zayıf olması, ekzotermik reaksiyonların gerçekleşmesi, granül formunda olanların damar lümeni içerisinde kalıntı bırakabilmesi ve bazı örtülerde viral ajanların barınabilme olasılığıdır. Travmatik yaralanmalar sonucunda hemostatik yara örtü malzemelerinin uygulanmasında karşılaşılan temel zorluk enjekte edilebilen ve enjekte edildikten sonra mekanik stabilitesini koruyabilecek ve yara iyileşme süreci boyunca o bölgede bulunan hücrelere destek hücre dışı matriks olarak görev yapacak biyomalzemelerin geliştirilmesidir.

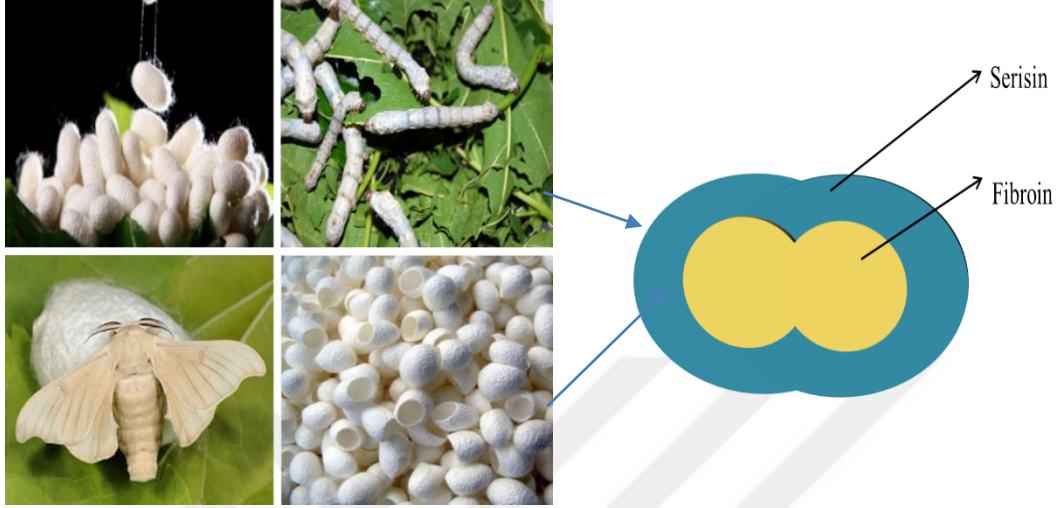
2.4. Biyomedikal Alanda İpek Fibroin

2.4.1. İpek Fibroin Yapısı ve Özellikleri

Dokusu, parlaklığı, mekanik dayanımı, yumuşaklığı, pürüzsüzlük özelliği, tüm mevsimsel koşullara adapte olabilmesi, boyanabilir özellikte olması gibi özellikler ipeği benzersiz bir tekstil malzemesi haline getirmiştir [51].

İpek proteini tırtıllar, örümcekler, akrepler tarafından üretilen; bileşenlerinin, yapı ve özelliklerinin spesifik kaynağa göre farklılıklar gösterdiği doğal bir polimerdir [52]. En iyi karakterize edilmiş olan ipek türleri *Nephila clavipes* örümceğine ait ip yapısında olan ipek türü ve evcilleştirilmiş *Bombyx mori* tırtıllarına ait kozalardan elde edilen ipek çeşididir. Örümceklerden elde edilen ipeğin, kozalardan elde edilen ipeğe göre daha karmaşık bir yapıya sahip olması ve örümceklerin agresif doğalarının yüksek yoğunlukta ipek üretimini engellemesinden dolayı kullanımları sınırlıdır [53]. Günümüzde tekstil, biyoteknoloji ve biyomedikal alanda en çok tercih edilen ipek çeşidi *Bombyx mori* tırtılları tarafından üretilen ipek proteindir (Şekil 2.15). İpek böceği kozalarından elde edilen ipek fibroin iyi derecede biyoyumumluluk göstermesi, biyobozunur olması, dikkat çekici değerdeki nemlilik özelliği, gaz geçirgenliği ve üstün mekanik özellikleri sayesinde zengin bir kaynaktır. Protein

yapısında doğal bir polimer olan ipek fibroin FDA tarafından kullanımı onaylanmış bir biyopolimer olup, eşsiz aminoasit kompozisyonu ve kimyasal yapısı sayesinde çeşitli uygulamalarda biyomalzeme olarak kullanılmaktadır.



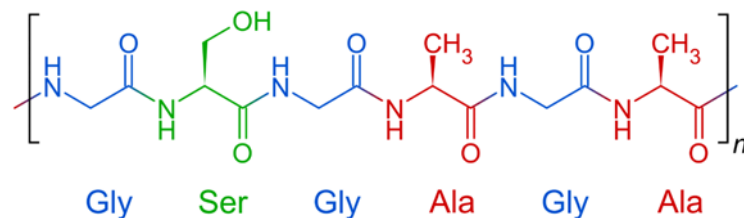
Şekil 2.15. İpek böceği larvası, kozası ve yapısı

İpek fibroin yapısal olarak incelendiğinde iki alt proteinden oluşan hiyerarşik bir yapıya sahiptir. Bunlardan ilki ipeğin dominant kısmını oluşturan fibroin proteini, diğeri ise fibroini dışarıdan bir katman halinde saran serisin proteinidir. Fibroini dışarıdan bir katman olarak saran serisin, adheziv özelliği sayesinde fibroin filamentlerini bir arada tutarak kozayı rüzgar, yağmur, buzlanma ve güneş ışığına karşı korur [54].

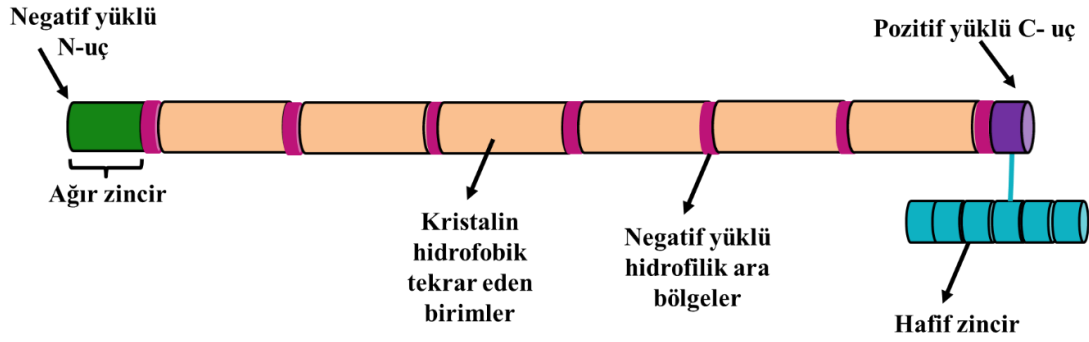
Serisin varlığında ipek fiberler sert ve tok bir yapıya sahipken, serisinin yapıda bulunmaması ipek fiberleri yumuşak ve parlak bir yapı haline getirmektedir. İpek endüstrisinde fiberlerin parlaklık, yumuşaklık, pürüzsüzlük, beyazlık ve boyanabilirlik özelliklerinin geliştirilebilmesi için serisin proteini fibroinden uzaklaştırılır. Biyomedikal uygulamalarda ise vücutta immünolojik reaksiyonlara sebep olduğu için serisin proteini, kozaların alkali çözeltilerde kaynatılmasıyla fibroinden uzaklaştırılır.

Makromoleküler bir yapıya sahip olan serisin proteininin moleküler ağırlığı 10-300 kDa arasında değişiklik göstermektedir. Serisin proteini 18 aminoasitten oluşmaktadır ve bunların çoğunluğu hidroksil, karboksil ve amino grupları gibi güçlü polar yan gruplara sahiptir. Hidrofilik bir yapıya sahip olan serisin proteini; polar bir çözücü içerisinde çözüldüğünde, asit içerisinde veya alkali çözeltilerde hidrolize olduğunda veya proteaz

İpek fibroin birbirini tekrar eden geniş hacimli modüler hidrofobik kısımlardan oluşan ve bu hidrofobik kısımların küçük hidrofilik gruplar tarafından bölümlere ayrıldığı protein yapısındadır. *B.mori* kozalarından elde edilen ipek fibroin proteininin primer yapısı temel olarak glisin (Gly) (%43), alanin (Ala) (%30) ve serin (Ser) (%12) aminoasitlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.16). Glisin, alanin ve serin aminoasitlerinin molar oranları sırasıyla 3:2:1 şeklinde olup, bir araya gelen bu aminoasitler ipek fibroin proteinine ait tipik –(–Ala–Gly)_n– tekrarlayan birimlerini oluşturmaktadır. Heterodimerik bir yapıya sahip olan ipek fibroin proteininin bu karakteristik aminoasit modeli üç polipeptit zincirinin katkısıyla oluşmuştur (Şekil 2.17) [56]. Bu polipeptit zincirlerinden ilki ağır zincir (Heavy- chain) (~325 kDa) olarak bilinen büyük protein, ikincisi ise hafif zincir (~ 25 kDa) (light- chain) olarak bilinen polipeptit zinciri olup bu iki protein birbirine tekli disülfid bağı ile bağlanmıştır. 25 kDa molekül ağırlığına sahip üçüncü polipeptit zinciri ise P25 olarak bilinen küçük bir glikoprotein olup zincir kompleksine kovalent olmayan etkileşimlerle bağlıdır. İpek fibroin proteini dört alt bölüme ayrılmıştır. N-uç (N-terminus), tekrarlayan birimler, C-uç (C-terminus) ve L-chain. Hidrofilik kısımlar N- ve C- uçlarını içermektedir. N-uç negatif yüke sahip olup izoelektrik noktası 4.6 iken C-uça ait izoelektrik noktası 10.5'tir. Tekrarlayan birimler; glisin ve alaninin oluşturduğu uzun hidrofobik kısımlar ile 12 aminoasitten oluşan çok kısa hidrofilik ara kısımlarından oluşmaktadır.



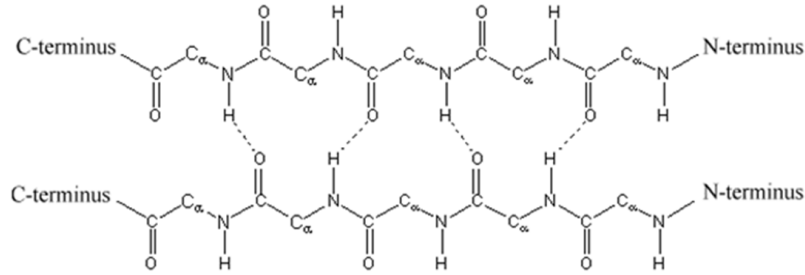
22



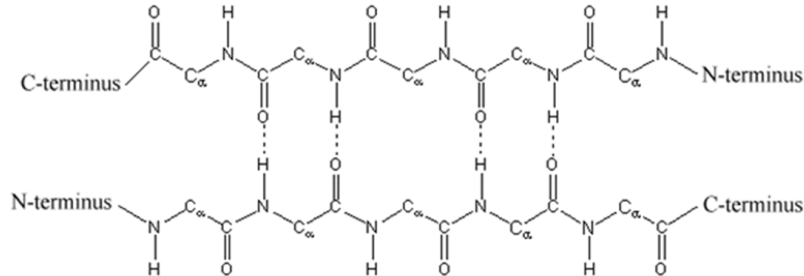
Şekil 2.17. İpek fibroine ait polipeptit zinciri

Glisin-alanin sekansları hidrofobik kısımları oluşturmakta ve esas olarak antiparalel beta tabakaların oluşumundan sorumludur (Şekil 2.18). Anti-paralel beta tabakaların oluşmasıyla fiberlerin kararlı yapısı ve mekanik özellikleri sağlanmış olur. Amorf bloklardaki zincir konformasyonu ipeğe elastikiyet özelliği veren düzensiz sarmal yapısıdır. L-zincir ise hidrofilik ve kısmen elastik bir yapıya sahiptir. P25 proteini ise kompleksin bütünlük ve sağlamlığını korumada önemli bir rol oynamaktadır. H- zincir, L- zincir ve P25 zincirlerinin molar oranları ise 6:6:1 şeklinde ifade edilmektedir.

Paralel β -tabaka



Antiparalel β -tabaka



Şekil 2.18. Paralel ve antiparalel beta tabakalar [58].

Son zamanlarda *B.mori* kozaları ve bunun esas proteinleri olan fibroin ve serisin, polimer, biyomateryaller, kozmetik ve yiyecek endüstrisi gibi alanlardaki potansiyel kullanımları sebebiyle bu alanlardaki önemli bir araştırma konusu olmuştur. Uzun yıllar boyunca ipek böcekçiliği alanında göz ardı edilen serisin proteini ile ilgili yapılan araştırmalar sonucunda dünya çapında 400.000 ton kuru kozadan 50.000 ton serisin üretilbildiği hesaplanmış, serisinin çoğunlukla atık sulara karıştığı belirtilmiştir. Bu durum suyun kontaminasyonuna sebep olduğu gibi yüksek derecede kimyasal ve biyolojik kontaminasyona da sebebiyet vermektedir. Bu sebeple serisinin uzaklaştırılması ve kullanımının özellikle Çin, Hindistan ve Brezilya gibi ipek böcekçiliğinin yaygın olduğu ülkelerde güçlü ekonomik, sosyal ve çevresel katkılar sağlayabileceği belirtilmiştir [59].

2.4.2. İpek Fibroinin Biyomalzeme Olarak Kullanımı

Yüzyıllardır tekstil malzemesi olarak kullanılan ipek proteininin biyouyumluluğu, kolay proses edilebilmesi ve mekanik özelliklerinin ayarlanabilir olması ipeği biyomedikal uygulamalar açısından uygun bir materyal haline getirmektedir. 1960'lı yıllarda hidrojellerin biyomalzame olarak girmesiyle dikkat çekmiş ve doku mühendisliği, ilaç salımı, implantlar, biyosensörler ve biyonanoteknolojide çeşitli uygulama alanları bulmuştur [60]. Buna ek olarak ipek fibroinin, insan derisine ait fibroblastların tutunmasını ve proliferasyonunu desteklemesi sayesinde yara örtüsü materyali olarak mükemmel bir uygunluk sağlamaktadır. İpek fibroin doku iskeleleri dondurarak kurutma, tuz ile yıkama, gaz köpükleştirme ve elektroegirme gibi çeşitli metodlar kullanılarak hazırlanabilmektedir. Bu metodlar temel alınarak ipek fibroin biyomalzemeler film, hidrojel ve üç boyutlu porlu doku iskelesi formlarında hazırlanabilmektedir.

Tablo 2.1 İpek fibroinin biyomedikal uygulamaları

Uygulama Alanı	Uygulama Formu	Fonksiyonu	Referans
Doku mühendisliği • Vasküler • Nöral • Kemik-Kıkırdak • Deri • 3 boyutlu doku ve organ üretimi	Nanofiber Sünger Film Hidrojel	Doku iskelesi Biyomürekkep	[61, 62]
Kontrollü salım sistemleri • İlaç salım sistemleri • DNA salımı • Kanser tedavisi	Mikrokapsül Film Mikro iğne Lipozom Hidrojel	İmplant ve enjekte edilebilen sistemlerin hedef dokuya ulaşması 3 boyutlu kanser modelleri	[60, 63]
Tekstil	Nanofiber Sünger	Yara örtüsü uygulamaları	[64, 65]
Cerrahi işlemler	Fiber	Biyorezorbe olabilen dikiş iplikleri	[60, 66]
Esnek elektronik cihazlar • Deri sensörleri • Beyin-makine arayüzleri	Film Membran	Biyomedikal tanı ve tedavi	[67]
Optikler ve sensörler	Nanofiber Mikro iğne	pH, oksijen, elektrik sensörleri	[64]
Dental uygulamalar	Kompozit	Dentin matriks proteini ile tedavi	[68]
Antikoagülant malzemeler	Kompozit malzeme	Kan uyumlu biyomalzemelerin geliştirilmesi	[69, 70]

2.4.2.1. Fibroin Hidrojeller

Hidrojeller, büyük bir yüzdesini suyun oluşturduğu kimyasal veya fiziksel yollarla çapraz bağlanmış üç boyutlu polimerik sistemlerdir. Hidrojeller çoğunlukla sıvıdan oluşmasına rağmen, yapılarındaki osmotik kuvvetler sayesinde, yüksek elastikiyet ve esneklik gibi katı-benzeri mekaniksel davranışlar sergilemektedirler. Hidrojel yapısı polimer zincirlerinin çapraz bağlanması sonucu oluşmaktadır.

Hidrojel sistemlerinde esas olarak kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki tip çapraz bağlanma görülmektedir. Kimyasal olarak çapraz bağlanmış hidrojellerde, monomerler veya polimerler gibi başlatıcı materyaller, çapraz bağlayıcılar aracılığıyla birbirine kimyasal reaksiyonlarla veya polimerizasyonla tutturulmuştur. Genellikle hidrojellerin polimerizasyonu UV ışınları, γ ışınları veya elektron demeti radyasyonuna maruz bırakılarak indüklenmektedir [71]. Kimyasal çapraz bağlanma, çapraz bağ yoğunluğunun kontrol edilmesi, çeşitli polimerler için uygun çapraz bağlanma modellerinin uygulanabilmesi açısından yararlı bir yöntem olmasına rağmen saflaştırma işleminden sonra reaktif ajanlar, polimerleşmiş kümeler ve sonlanmamış büyümekte olan zincirler gibi uzaklaştırılamayan sitotoksik kalıntıların bulunması hidrojellerin biyomedikal uygulamalarında çeşitli komplikasyonların oluşmasına sebebiyet vermektedir [72]. Buna karşılık, fiziksel olarak çapraz bağlanmış hidrojellerle bu komplikasyonlar engellenebilmektedir. Kristalizasyon, sıvı-sıvı faz ayrışması, iyonik etkileşimler, hidrojen bağları ve topolojik çapraz bağlanmalar bu tip hidrojellerde çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilir. Bu nedenle fiziksel olarak çapraz bağlanmış hidrojeller; toksik reaktif moleküllerin çapraz bağlanma işleminde uzaklaştırılması sayesinde sitokinler, hücreler gibi biyoaktif bileşiklerin yapı içerisine alınmasına fırsat sağlamaktadır [71]. Elektrik, kayma gerilimi ve ultrasonikasyon gibi çeşitli fiziksel uyarıcılarla hazırlanabilen hidrojeller, hiçbir kimyasal katkı maddesi olmadan tamamen fiziksel koşullar altında hazırlanmış hidrojellerdir.

Hidrojellerin hazırlanmasında çeşitli doğal ve sentetik polimerler kullanılmaktadır. Canlı sistemlerin önemli makromoleküllerinden olan proteinler, spesifik biyokimyasal, mekanik ve yapısal rolleri üstlenmişlerdir. Protein polimerleri biyomedikal uygulamalar açısından yararlı olan çok çeşitli özellikler sergilemektedir. Hiyerarşik olarak kendiliğinden bir araya gelebilmeleri hücresel çevreyi taklit edebilmelerini sağlarken aynı zamanda bu özelliği biyomedikal malzemelerin oluşturulmasında aşağıdan yukarı yaklaşımına olanak sağlamaktadır. Bazı proteinler, diğer protein ve ligandlarla etkileşimi sağlayan hücresel

sinyallere yardımcı olan çeşitli kısımlar içermektedir. Bu proteinlerden hazırlanan biyomalzemelerin bu özelliği devam ettirebileceği öngörülmektedir.

Gelişmiş materyallerin bir sınıfını oluşturan ipek hidrojeller yumuşak biyolojik dokuları fiziksel ve mekaniksel olarak taklit edebilme özelliğine sahiptir. İpek proteininden hazırlanmış olan hidrojeller kullanılarak konvansiyonel polimerlerden hazırlanan hidrojellerin yaratmış olduğu kısıtlamaların üstesinden gelinebilmektedir [60]. İpek fibroinin yüksek tekrar eden primer sekansı GAGAGS kristalin yapıdaki antiparalel beta tabakalarını oluşturmaktadır. Isıya maruz bırakma, fiziksel kayma veya bazı organik solventlerin kullanılması suda çözünmeyen kristalin yapıların oluşturulmasına katkıda bulunmaktadır. İpek fibroinin sulu çözeltisi, kendiliğinden bir araya gelme özelliği sayesinde direkt olarak hidrojel oluşturabilmekte, mekanizması protein zincirlerinin kendiliğinden toplanması ve fiziksel olarak çapraz bağlanmasıyla beta tabaka kristalin yapıya dönüşmesi şeklinde ilerler. İpek fibroinin hidrojelasyonu düşük pH, yüksek sıcaklık ve yüksek iyonik şiddet faktörlerinden etkilenebildiği gibi alternatif olarak ultrasonikasyon, vortexleme gibi enerji girdileri de çözeltinin fizyolojik koşullarına bağlı olarak tetiklenebilmektedir [73]. Hu ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada ultrasonikasyon yöntemi kullanarak ipek fibroin-hyaluronik asit blend hidrojeller hazırlamıştır. İçerisinde hücre farklılaşması ve hareketliliğinden sorumlu önemli bir glikozaminoglikan olan hyaluronik asit bulunan ipek fibroin jel, fiziksel olarak çapraz bağlanmış olup, yüksek kristalin bölgeler içermektedir [71]. Fiziksel olarak çapraz bağlanmış ipek hidrojeller elde etmenin diğer bir yolu ise elektrojelasyondur. Elektrojelasyonda ipek fibroinin sulu çözeltisi içerisine elektrotlar birbirine paralel olarak yerleştirilmekte ve bu çözeltiye sabit elektrik akımı sağlanarak elektriksel bir alan oluşturulmaktadır. Bir süre sonra pozitif elektrot etrafında jel oluşmasıyla elektrojelasyon tamamlanmış olur. Tabatabai ve ark. elektrojelasyon yöntemi kullanılarak ipek fibroin jeller sentezlemiş ve e-jel oluşumunun suyun hidrolizi sonucu ortaya çıkan H ve OH iyonlarının elektrodifüzyonuyla pozitif elektrot etrafındaki bölgesel pH değişikliğinin sonucu olduğunu belirtmişlerdir [74].

2.4.2.2. İpek Fibroin Mikrojeller

Mikrojeller; biyolojik, kimyasal ve mekanik özellikleri ayarlanabilen mikroskobik hidrojellerdir. Birbirinden ayrık ve kolloidal bir yapıya sahip olan mikrojeller yığın jellere göre daha fazla yüzey alanı sağlarken, pH veya ısıya karşı duyarlılığı yığın jellere göre daha fazladır. Bu porlu yapılar çözücü kalitesine ve dış uyarıcıların etkisine cevap olarak şişme ve büzülme davranışı gösterirler. Porlu yapıları sayesinde küçük molekülleri bünyelerine

alabildikleri gibi bunları difüze edebilirler. Mikrojellerin bu özelliği spesifik katkıların kontrollü bir şekilde salımını sağlar. İpek fibroin zincirlerinin bünyesinde hidrofilik ve hidrofobik özelliklerin bir arada bulunması, sulu çözeltilerde bir araya gelerek oluşan mikrojel, misel ve kesecik gibi farklı formlarının oluşmasını teşvik etmektedir [75]. İlaç yükleme kapasitelerinin yüksek olması ve etkin maddenin ortamın pH, sıcaklık ve iyon konsantrasyonu gibi çevresel koşullara bağlı olarak kontrollü salımını sağlayabilmesi sayesinde kontrollü ilaç salım sistemlerinde oldukça sık tercih edilmektedirler.

2.4.3 İpek Fibroinin Hemostatik Özellikleri

Bugüne kadar hemostazın sağlanması amacıyla farklı metodlarla hazırlanmış sentetik ve biyolojik kaynaklı olan çeşitli topikal hemostatikler üretilmiştir. Bunlar genellikle jelatin, fibril yapıda kollajen, oksidize selüloz, kitosan, platelet jeller ve fibrin bazlı örtüler olup alerjik reaksiyonlara, sebebi tam olarak saptanamayan enfeksiyonlara neden olabilmeleri ve raf ömürlerinin az olması gibi kullanım sınırlamalarına sahiptir. Medikal teknolojide hemostazı sağlamak amacıyla kullanılan mikro/nano yapıdaki hemostatik ajanların üretiminde kullanılan sentetik polipeptidlerin sentezlenmesi oldukça zor ve pahalı bir yöntemdir. İpek fibroinin kararlı amino asit yapısı, kristalin β -tabaka yapısı, düşük inflamasyon etkisi, dayanıklılığı ve tokluğu sayesinde üretimi hayli zor ve yüksek maliyetli sentetik peptidlere bir alternatif olarak sunulabilmektedir. İpek fibroinin medikal uygulamalarda film, hidrojel, fiber, mikroküre ve kompozit gibi çeşitli formlarda işlenebilirliği de ipek fibroinin avantajları arasında yer almaktadır.

İpek fibroinin hemostatik alanda kullanılmasıyla ilgili yapılan çalışmalarda genellikle koagülant destekleyici faktörlerden yararlanıldığı görülmektedir. Bu koagülasyon destekleyiciler kan koagülasyon sistemini tetikleyerek hemostazın başarılı bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan faktörlerdir. Teuschl ve ark. yapmış olduğu çalışmada sulu ipek fibroin çözeltisi içerisine farklı derişimlerde fibrinojen ve trombin çözeltileri ilave etmiş, oluşan bu karışım hücre kültürü kaplarına dökülerek dondurarak kurutma tekniği ile ipek fibroin bazlı koagülant destekli hemostatik ajan geliştirmişlerdir [7]. Karahaliloğlu ve ark. yapmış oldukları çalışma ise ipek fibroinin farklı doğal polimerlerle birlikte kullanıldığı ve biraz daha nanoteknolojik yaklaşımın olduğu diğer bir literatür örneğidir. Bu çalışmada nano/mikro çift tabakalı hemostatik örtü geliştirilmiş olup bu amaçla kitosan poröz yapıdaki alt tabakayı oluştururken ipek fibroin ve bakteriyel selüloz fibriler yapıdaki üst tabakayı oluşturmaktadır. Elde edilen çift katmanlı bu filmin üst katmanına K vitamini, protamin

sülfat ve kaolin gibi koagülasyon sistemini tetikleyecek ajanlar eklenmiş ve bunların hemostatik etkileri incelenmiştir [76].

Normal özelliklere sahip ipek fibroin proteininin tek başına kullanıldığında herhangi bir hemostatik özellik göstermediği bilinmektedir. Ancak Lei ve ark. düşük molekül ağırlığına sahip ipek fibroin üzerine yapmış oldukları çalışmada, farklı hidroliz sıcaklıkları uygulanarak elde edilen ipek fibroinin intrinsik yolağı aktive ederek hemostatik etki gösterdiğini belirlemişlerdir. 42 kDa, 22 kDa ve 10 kDa molekül ağırlıklarına sahip olan üç farklı ipek fibroinden 42 kDa molekül ağırlığına sahip olan örneğin en iyi hemostatik etki gösterdiği belirtilmiştir. Lei ve ark. yapmış oldukları bu çalışma herhangi bir koagülant destek faktörünün kullanılmadan ipek fibroinin tek başına hemostatik etki gösterdiği ilk literatür çalışması olup ipeğin hemostatik özellik kazanmasının değişen amino asit içeriğinden kaynaklandığını ileri sürmektedir [1].

2.5. Fibroin Mikroküre Elde Edilmesinde Kullanılan Yöntemler

İpek fibroin bazlı partikül sistemleri çeşitli etken maddelerin enkapsülasyonunu, adsorbsiyonunu ve iletimini kontrollü olarak gerçekleştirebilen stabil ve çok yönlü taşıyıcı sistemlerdir. Partikül sistemler birden fazla biyoaktif ajanın hedeflenmesini destekleyebilmesi sayesinde çoklu tanılama sistemlerinde [77], biyomimetik özellikleri sayesinde doku rejenerasyonunda, patojenlerle benzer boyut ve yapı özellikler kazandırılabilmesiyle aşı uygulamalarında [78] olmak üzere farklı alanlarda önemli avantajlar sunan sistemlerdir.

İpek fibroin bazlı partikül sistemlerin hazırlanması amacıyla kullanılan sistemler bottom up ve top down olmak üzere iki yaklaşım altında sınıflandırılmaktadır. Kimyasal prosesler uygulanmasıyla partikül formda ipek elde edilmesi aşağıdan yukarı yaklaşım olarak bilinmekte ve bu yaklaşımda farklı çözücüler kullanılarak ipek fibroindeki beta tabakalar arasındaki intermoleküler bağların kırılması sonucu partikül yapı elde edilmektedir. Sonrasında elde edilen partikül yapıya genellikle metanol veya water treatment yapılarak suda çözünmeyen kararlı bir forma ulaşması sağlanır. Yukarıdan aşağı yaklaşımında ise ipek fibroin çeşitli öğütme makineleri tarafından mekanik olarak parçalanarak ipek partiküller elde edilebilmektedir. Partikül yapıda ipek fibroin elde etmek amacıyla uygulanan yöntemler Tablo 2.2' de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Fibroin mikroküre elde edilmesinde kullanılan yöntemler.

Metod	Kimyasal Çözelti	Avantaj	Dezavantaj	Partikül Boyutu	Ref.
Elektrospreyleme	Formik asit	Basit yöntem, yüksek monodispersite	Düşük verim, uygulama sonrası işlem gerekliliği	80 nm < 100 nm	[79, 80]
Organik solvent içerisinde çöktürme	Çeşitli organik çözücüler	Küçük partikül boyutu	Organik solvent kalıntısı,	35-125 nm	[81]
Emülsiyonlaştırma	Parafin	Pürüzsüz yüzeyler için uygun teknik	Alkol ile muamele	80-150 µm	[82]
Tuz ile çöktürme	Potasyum fosfat	Yüksek verim, toksik çözücü kullanımı yok	Çöktürme ajanları uzaklaştırılmalı	486nm-2µm	[83]
PVA-faz ayrımı	PVA	Kolay yöntem, enerji etkili, organik çözücü kullanımı yok	PVA kalıntısı	300 nm - 20µm	[84]
Elektrik alan	Formik asit	Basit elektrojelasyon koşulları	Düşük monodispersite	10 nm- 1 µm	[73]
Donma kaynaklı kendiliğinden bir araya gelme	Etanol	Temiz yöntem, agregasyon yok	Etanol kalıntısı	210- 510 nm	[85]
Süperkritik CO ₂ teknolojisi	HFIP (1,1,1,3,3,3 heksafloro-2-propanol)	Daha az kalıntı çevre dostu yöntem	Yüksek maliyet	52.5- 102.3 nm	[86]
Mikroakışkanlar	Span 80, oleik asit, metanol	İyi monodispersite, homojen boyut dağılımı	Süpfaktan kalıntısı	1-10 µm	[87]
Kapiler Mikroyazdırma	SDS, kalsiyum nitrat tetrahidrat,	Kolay proses	Organik çözücü ve SDS kalıntısı	<100nm	[88]

3. MALZEME ve METOD

3.1. Malzeme

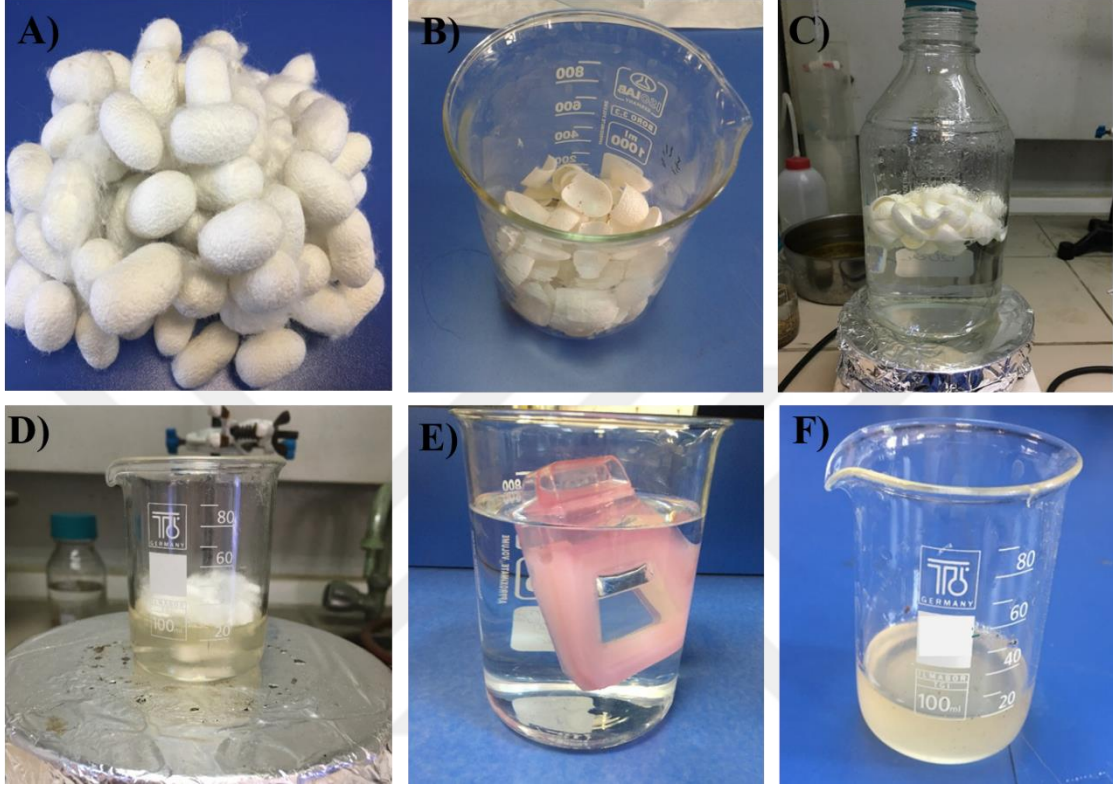
İpek fibroin ekstraksiyonunda kullanılan *Bombyx mori* cinsi ipek kozaları Kozabirlik (Bursa) firmasından satın alınarak temin edilmiştir. Serisin proteinin uzaklaştırılması işleminde NaHCO_3 (Sigma Aldrich, Almanya) çözeltisi, serisini uzaklaştırılan ipek fibroin fiberlerin çözülmesi amacıyla LiBr (Sigma Aldrich, Almanya) çözeltisi kullanılmıştır. Elde edilen ipek fibroin sulu çözeltisinin diyalizi için 3,5 kDa diyaliz kaseti (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. İpek mikrojel ele edilmesi amacıyla uygulanan faz ayrımı yönteminde poli(vinil alkol) (PVA, molekül ağırlığı 30.000-70.000 g/mol, Sigma Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. Koagülasyon destekleyici etkenler olarak K1 vitamini (Konakion, 10mg/ampül, Roche, İsviçre) ve fibrinojen (insan plazması, molekül ağırlığı 340 kDa, Sigma Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. Fosfat tamponunun hazırlanmasında, fosfat tampon tuzu (PBS, pH 7.4, Sigma Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. Fibrinojen konjuge mikrojeller hazırlanmasında tampon çözeltinin pH değeri %37 (v/v)' lik HCl (Sigma Aldrich, ABD) kullanılarak ayarlanmıştır. Konjugasyonda *N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil)* karbodimid (EDC, molekül ağırlığı 191.7 g/mol, Sigma Aldrich, Almanya) ve *N-Hidroksisüksinimid* (NHS, molekül ağırlığı 115.05 g/mol, Sigma Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. Sitotoksikite deneylerinde 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2-5-difeniltetrazolyum bromit (MTT, Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Fibroin Proteininin *B.Mori* Kozalarından Ekstraksiyonu

Fibroin proteininin *B.Mori* kozalarından ekstraksiyonu için standart yöntem uygulanmıştır. Bu amaçla, Bursa Kozabirlik'ten alınan ve içerisindeki böcekleri uzaklaştırılan ipek kozalar % 0.5 (w/v)'lik NaHCO_3 çözeltisi içerisinde 100°C de 30 dakika kaynatılarak serisin proteinini ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ipek fiberler ılık saf su içerisinde 3 kez yıkanarak parçalanmış serisin proteinlerin uzaklaşmasını sağlamış ve daha sonra 24 saat boyunca kurutulmaya bırakılmıştır. Kuruyan ipek fibroin fiberler 9M LiBr çözeltisi içerisinde alınarak 60°C'de 3 saat hidroliz edilmiş ve fibroin çözeltileri elde edilmiştir. Elde edilen homojen çözelti Li^+ ve Br^- iyonlarının ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla 3.5 kDa molekül ağırlıklı selüloz diyaliz kasetlerine alınarak saf suya karşı 48 saat boyunca diyaliz edilmiştir [89]. Diyaliz çözeltisi ilk 3 saat boyunca yarım saatte bir, diğer günlerde 12 saatte bir olmak üzere değiştirilmiştir. Elde edilen çözelti 7000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve

kozadan kaynaklanan çözünmeyen safsızlıkların ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır. Bu işlemlerin sonunda elde edilen ipek fibroin çözeltisi +4°C’ de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.1).



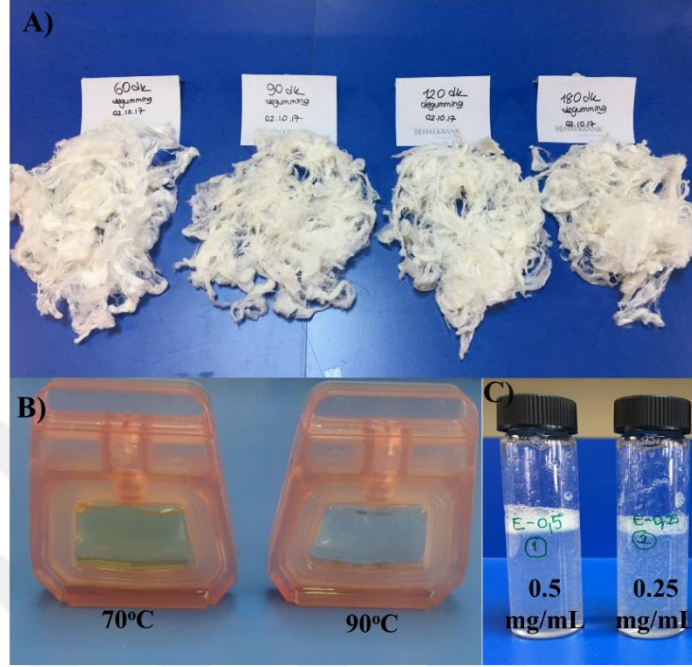
Şekil 3.1. İpek fibroinin *B.mori* kozalarından ekstraksiyon basamakları. A) İpek kozalar, B) Böcekleri çıkartılmış olan kozalar, C) Kozaların % 0.5 (w/v)’lık NaHCO_3 çözeltisi içerisinde kaynatılması, D) İpek fiberlerin 9M LiBr içerisinde çözülmesi, E) Çözeltinin diyaliz kasedinde saf suya karşı diyaliz edilmesi, F) İpek fibroin sulu çözeltisi.

3.2.2. Düşük Molekül Ağırlıklarına Sahip İpek Fibroinlerin Eldesi

Düşük molekül ağırlığına sahip fibroin elde etmek için standart serisin uzaklaştırma işlemi farklı sürelerde ve hidroliz işlemi farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilerek, fibroin molekül ağırlığı üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca enzimatik yöntem de uygulanarak, sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Bu amaçla öncelikle serisini uzaklaştırmak (degumming) için ipek kozalar % 0.5 (w/v)’lık NaHCO_3 sulu çözeltisi içinde 100°C’de 60, 90, 120 ve 180 dakika olmak üzere farklı sürelerde kaynatılmıştır. NaHCO_3 çözeltisinden alınan ipek fiberler ılık saf su ile 3 kez yıkanarak kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.2). Daha sonra ipek fiberler 60°C’de 9M LiBr

çözeltisi içerisinde alınarak, 3 saat karıştırılmıştır. Bu örnekler NaHCO_3 çözeltisinde kaynama süresine (60, 90, 120 ve 180 dakika) göre sırasıyla SF-D60, SF-D90, SF-D120 ve SF-D180 olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 3.2. Farklı yöntemlerle elde edilen fibroin örnekleri. A) %5 (w/v)'lık NaHCO_3 sulu çözeltisinde farklı sürelerde hidroliz edilerek hazırlanan fibroin fiberler, B) LiBr içerisinde farklı sıcaklıklarda hidroliz edilerek hazırlanan fibroin çözeltileri, C) Farklı derişimlerde α -kemotripsin enzimleri kullanılarak hazırlanan fibroin sulu çözeltileri.

Diğer taraftan sıcaklığın etkisini incelemek için serisini uzaklaştırılmış olan ipek fibroin fiberler 9M LiBr çözeltisi içerisinde 3 saat süreyle 70 °C ve 90 °C de hidroliz edilmiştir. Elde edilen ipek fibroin örnekler diyaliz kasetlerine alınmış, 3 gün boyunca saf suya karşı diyaliz edilerek sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Bu fibroin çözeltileri SF-H70 ve SF-H90 olarak isimlendirilmiştir.

3.2.2.2. Enzimatik Yöntem

Fibroin proteininin *B.Mori* kozalarından ekstraksiyonu için Bölüm 3.2.1'de verilen standart yöntem uygulanmıştır. Fibroin çözeltisi elde edildikten sonra yönteme enzimatik basamak eklenmiştir. Bu amaçla öncelikle 1 mg/mL konsantrasyonunda stok enzim çözeltisi hazırlanmıştır. İpek fibroin sulu çözeltisi içerisine (10 mL) 1mL % 0.25 mg/mL ve % 0.50 mg/mL olmak üzere iki farklı konsantrasyonda, α -kemotripsin enzim eklenmiştir. Bu çözeltiler SF-E0.25 ve SF-E0.50 olarak isimlendirilmiştir.

3.2.2.3. Fibroin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Fibroin sulu çözeltilerinin ağırlıkça molekül ağırlıkları Statik Işık Saçılımı (SLS, Malvern CGS-3) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. SLS yönteminde monokromik bir ışık demeti seyreltik polimer çözeltisi içerisinde geçer ve çözelti içerisinde geçen ışık saçılma uğrar. Bu saçılmalar Raman saçılması veya Rayleigh saçılması şeklinde gerçekleşebilmektedir. Rayleigh saçılımı taneciklerin küresel saçılması olarak kabul edilmekte ve statik ışık saçılımının temelini oluşturmaktadır. Bu amaçla yöntemde Rayleigh denklemi temel alınmaktadır. Bu temel, polimer molekülü tarafından saçılan ışığın şiddeti ile polimerin molekül ağırlığı ve boyutu arasındaki ilişkiye dayanmaktadır. Statik ışık saçılmasında şu eşitliklere göre hesaplama yapılmaktadır.

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \left(\frac{1}{M_w} + 2A_2C \right) \frac{1}{P_{\theta}}$$

Bu eşitlikte;

C: Polimer konsantrasyonu

θ : Ölçüm yapılan açı değeri

R_{θ} : θ ölçüm açısındaki Rayleigh oranı

M_w : Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı

A_2 : İkinci viral katsayı

K şu eşitlikle hesaplanan terimdir:

$$K = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(n_0 \frac{d_n}{d_c} \right)^2$$

λ_0 : Lazer dalga boyu

N_A : Avogadro sayısı

n_0 : Çözücünün kırılma indisi

$\frac{d_n}{d_c}$: Polimerin kırılma indisinin derişimle değışimi

P_{θ} şu eşitlikle hesaplanan terimdir:

$$\frac{1}{P_{\theta}} = 1 + \frac{R_g^2 16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} \sin^2 \frac{\theta}{2}$$

R_g : Jirasyon katsayısı

q , saçılma vektörü büyüklüğü olup şu eşitlikle hesaplanan terimdir:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2}$$

$\frac{KC}{R_\theta}$ verileri $\sin^2 \frac{\theta}{2} + KC$ verilerine karşı grafiğe geçirilerek $c \rightarrow 0$ 'a ve $q^2 \rightarrow 0$ 'a ekstrapole edilir ve Zimm eğrisi çizilebilir. Çizilen Zimm eğrisinde ekstrapole edilen eğrinin kesim noktasından ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı hesaplanır.

Zimm eğrisi ile lineer grafik elde edilemediği durumlarda diğer yaklaşımlar kullanılır. Bu yaklaşımlar Berry ve Guiner yaklaşımları olarak bilinmektedir. Berry yaklaşımında Zimm eğrisine benzer olarak $\left(\frac{KC}{R_\theta}\right)^{\frac{1}{2}}$ verisi $\sin^2 \frac{\theta}{2} + KC$ verisine karşı grafiğe geçirilerek Berry eğrisi çizilir.

Guiner yaklaşımında I saçılan ışığın şiddeti olmak üzere şu eşitlik temel alınır [90]:

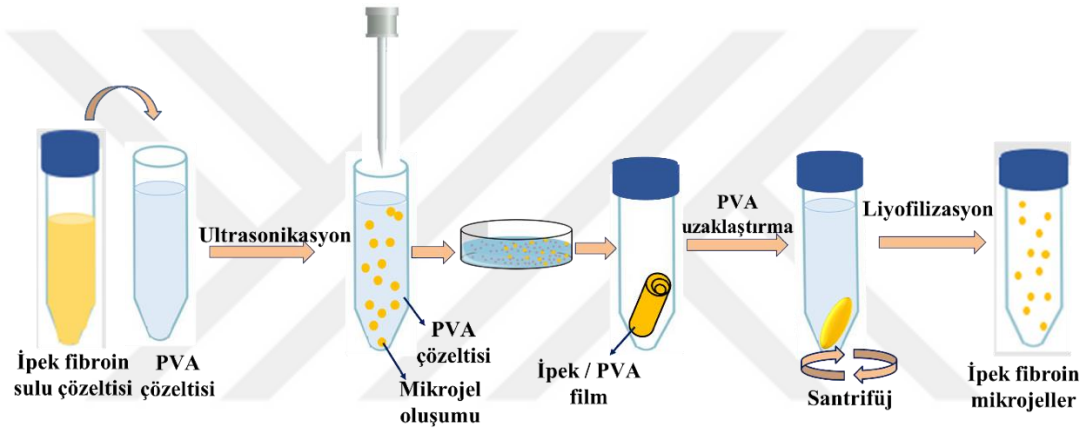
$$\ln(I(q)) = \ln(I(0)) - \frac{q^2 R_g^2}{3}$$

Guiner eğrisi $\ln I$ değerlerinin q^2 ye karşı grafiğe geçirilmesiyle çizilir. Bu çalışmada çözelti derişimi 40 mg/mL olacak şekilde stok olarak hazırlanmış ve bu stoktan 30, 20, 10 mg/mL olacak şekilde seyreltmeler yapılarak toplam 4 derişimde çalışılmıştır. Refraktometre (Schmidt+Haensch ATR W2) kullanılarak seyreltilen her bir örnek için kırılma indisleri ölçümleri alınmış, polimerin kırılma indisinin derişimle değişimini ifade eden dn/dc değerleri hesaplanmıştır. Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı sonuçları ve jirasyon yarıçapları Guiner yaklaşımına göre değerlendirilmiştir.

3.2.3. Faz Ayrımı Yöntemi ile Fibroin Mikrojellerin Hazırlanması

PVA ve fibroin çözeltileri derişimleri %4 (w/v) olacak şekilde stok olarak hazırlanmıştır. İpek fibroin sulu çözeltisi ile PVA çözeltisi hacim oranları sırasıyla 1:4 olacak şekilde konikal bir tüp içerisinde kabaca karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan hemen sonra problu ultrasonikatörde (Bandelin Electronic, UW 2070, Almanya) %25 enerji frekansı uygulanarak 30, 60, 90 ve 180 saniye olmak üzere farklı sürelerle ultrasonikasyon işlemi uygulanmış, ultrasonikasyon süresinin optimizasyonu sağlanmıştır. Ultrasonikasyondan sonra elde edilen homojen karışım 35 mm çapındaki polistiren petri kaplarına her birine yaklaşık 1 mL olacak şekilde dökülmüştür. Oda sıcaklığında 24 saat boyunca kurumaya bırakılan harman filmler, petri kap yüzeyinden soyularak çıkartılmıştır (Şekil 3.3). Daha sonra kuru halde olan harman filmler 30 mL ultrasaf su içerisine alınmış ve oda sıcaklığında

1 saat boyunca karıştırılarak PVA'nın çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözelti 50 mL'lik falkon tüplere alınarak santrifüj cihazında 7000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatli bir şekilde ortamdan uzaklaştırılmış, tüp içerisindeki pelet üzerine 30 mL ultra saf su eklenerek tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 kez tekrarlanmış ve PVA'nın ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır. En son elde edilen pelet üzerine 10 mL ultra saf su eklenmiş, problu ultrasonikatör cihazında %10 enerji büyüklüğünde 15 saniye ultrasonikasyon işlemi uygulanarak kümelenmiş halde bulunan ipek fibroin mikrokürelerin birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen homojen karışım N₂ (g) ortamında dondurulmuş, -80 °C'de 24 saat boyunca liyofilize edilerek mikroküreler elde edilmiştir.



Şekil 3.3. Faz ayrımı yöntemi ile ipek fibroin mikrojellerin elde edilmesi

3.2.4. Hemostatik Mikrojellerin Hazırlanması

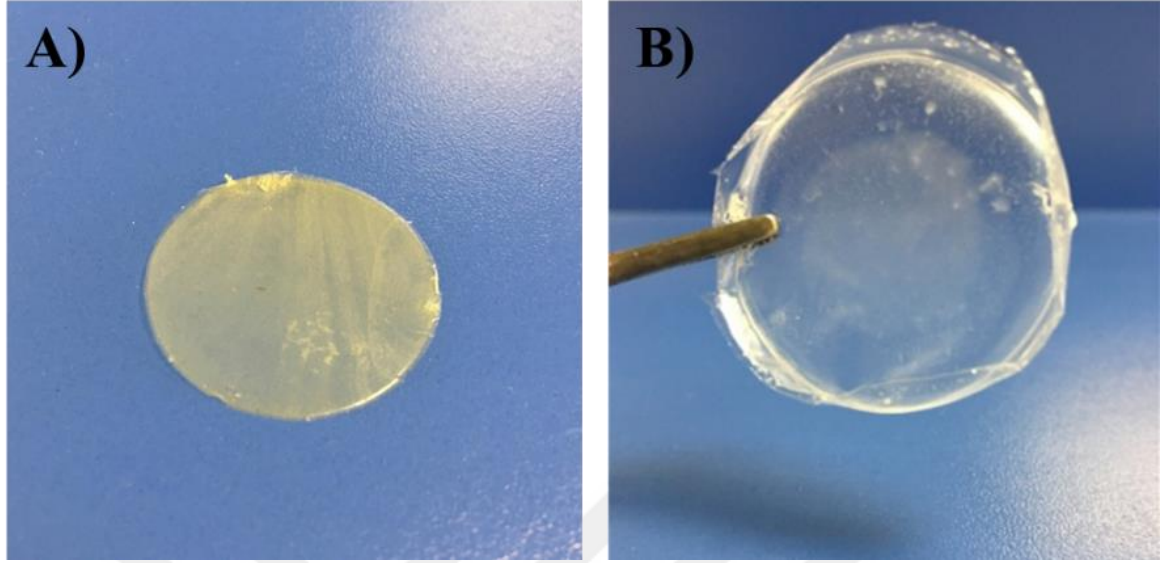
3.2.4.1. K vitamini Yüklü Mikrojellerin Hazırlanması

Suda çözünmeyen yağsı bir yapıya sahip olan K vitamini kanama durumunda veya kanama riskinin bulunduğu durumlarda kullanılan bir prokoagülant destekleyicidir. Bu nedenle K vitamini yüklü mikrojel oluşturmak için %1, %3 ve %5 (v/v) oranında K vitamini çözeltisi (10 mg) fibroin/PVA çözeltisine eklenerek ultrasonikasyon yapılmıştır. Bu aşamadan sonra PVA faz ayrımı yöntemindeki işlem basamakları uygulanmıştır. Bu işlemler ile hazırlanan %1 (v/v) K vitamini içeren fibroin film Şekil 3.4A'da verilmiştir

3.2.4.2. Fibrinojen Yüklü Mikrojellerin Hazırlanması

Fibrinojen yüklü mikrojel oluşturmak için fibroin/PVA çözeltisine %1 (w/w), %5 (w/w) ve %10 (w/w) oranında fibrinojen eklenmiştir. Eklenen fibrinojenin öncelikle fibroin çözeltisi içerisinde homojen karışması sağlanmış daha sonra bu karışım PVA çözeltisi ile

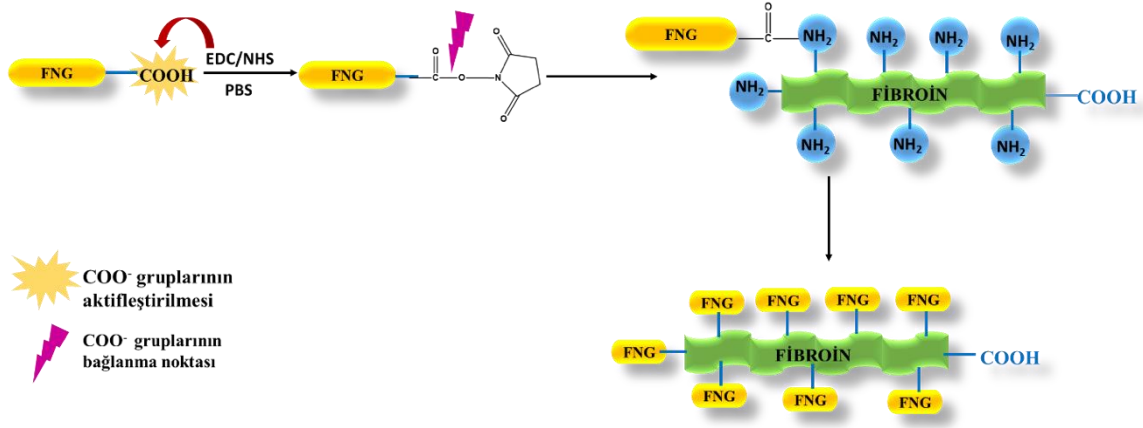
karıştırılarak ultrasonikasyon uygulanmıştır. Elde edilen fibrinojen içeren filmler Şekil 3.4B’ de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Fibroin/ PVA harman filmler. A) K vitamini içeren Fibroin/ PVA film, B) Fibrinojen içeren Fibroin/ PVA film.

3.2.4.3. Fibrinojen Konjuge Mikrojellerin Hazırlanması

Fibroin mikroküreler yüzeyine N-etil-N’-(3-dimetilaminopropil) karbodimid (EDC) ve N-hidroksisüksinimid (NHS) aracılığı fibrinojen kovalent olarak bağlanmıştır. EDC ve NHS çözeltileri 50Mm konsantrasyonda hazırlanmış ve +4°C’de 1:1 oranında karıştırılmıştır. Reaksiyon çözeltisi içerisine 10 mg fibrinojenin eklenmesiyle karboksilik asit grupları aktive edilmiştir. PBS (pH:5.5) içerisinde disperse edilerek hazırlanan fibroin mikroküreler reaksiyon çözeltisi içerisine eklenerek +4°C’de 1000 rpm’de 24 saat reaksiyona bırakılmıştır. Daha sonra fibrinojen konjuge mikrojeller PBS ile 3 kez yıkanmış ve liyofilize edilmiştir. Konjugasyon reaksiyonu Şekil 3.5’te şematik olarak verilmiştir.



Şekil 3.5. Fibrin-fibrinojen konjugasyon reaksiyonunun şematik gösterimi.

3.2.5. Mikrojellerin Karakterizasyonu

3.2.5.1. Morfolojik Özelliklerin İncelenmesi

Elde edilen mikrojellerin morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, FEI Quanta 400F Holland) kullanılarak incelenmiştir. Mikrojeller iki taraflı yapışkan bant aracılığıyla metal levhalar üzerine yerleştirilmiş ve örnekler kaplama cihazında 100 Å kalınlığında Au-Pd ile kaplanmıştır. Daha sonra örnekler SEM ile incelenmiştir.

3.2.5.2. Kimyasal Yapılarının Analizi

Fourier Transform Infrared Spektrometresinin Zayıflatılmış Toplam Yansıma (Attenuated Total Reflectance, ATR) eklentisi kullanılarak (ATR-FTIR, Perkin Elmer (L1600400, UK)) ipek fibroin bazlı mikrojellerin Silk I ve Silk II polimerik konformasyonal geçişleri incelenmiştir. Ayrıca ATR-FTIR kullanılarak mikrojellerin yüzeylerindeki moleküllerdeki çeşitli bağların titreşim frekanslarını ölçülmüş ve moleküldeki fonksiyonel gruplar belirlenmiştir. X-Işını Fotoelektron Spektrometresi (PHI, 50000 VersaProbe XPS, ABD) kullanılarak konjuge mikrojel yüzeylerinin moleküler bileşenleri incelenmiştir. Konjuge yüzeylerin karakterizasyonunda monokromatik Al-K α X-ışını kaynağı kullanılmıştır.

3.2.5.3. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli

Mikrojellerin zeta potansiyelleri ve ortalama partikül boyutları Malvern Zetasizer Nano-ZS (UK) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla oda sıcaklığındaki mikrojeller, partikül boyutu analizi için etanol içerisinde, zeta potansiyellerinin belirlenmesi için ise saf su

içerisinde disperse edilmiş ve partiküllerin agregasyonunun önlenmesi amacıyla 20 dakika sonikasyon uygulanarak mikrojellerin homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır.

3.2.5.4. Termal Karakterizasyon

Mikrojellerin oda sıcaklığı ve vücut sıcaklığındaki termal davranışı ve kararlılığının belirlenmesi amacıyla termogravimetrik analiz yapılmıştır. Mikrojellerin TGA analizleri TA Instruments, Q600 SDT (UK) cihazı kullanılarak yaklaşık 10 mg ağırlığındaki numunelerle, 10°C/dakika ısıtma hızında, 25–800°C sıcaklık aralığında N₂ (g) ortamında gerçekleştirilmiştir. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) analizleri TA Instruments, Q600 SDT (UK) cihazı kullanılarak 25-500°C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiş, mikrojellerin camsı geçiş sıcaklığı tayini, kristalleşme ve erime sıcaklıkları belirlenmiştir.

3.2.5.5. Şişme Davranışının İncelenmesi

Elde edilen ipek fibroin mikrojellerin şişme oranları gravimetrik olarak incelenmiştir. Bu amaçla 37°C’de PBS içerisine alınan fibroin mikrojeller 24 saat boyunca PBS ortamında tutulmuş, daha sonra mikrojeller üzerindeki PBS ortamdan uzaklaştırılarak ağırlıkları ölçülmüştür. Mikrojellerin ağırlıkça şişme oranları aşağıdaki denklemden hesaplanmıştır:

$$\text{Şişme oranı} = \frac{M_s - M_i}{M_i} \times 100$$

M_s : mikrojellerin çözeltiye daldırıldıktan sonraki ağırlığı

M_i : mikrojellerin kuru ağırlığı

3.2.5.6. Sitotoksosite Testi

Hemostatik mikrojellerin sitotoksisite testleri ISO 10993-5:2009(E) standardına göre incelenmiştir. Bu amaçla, mikrojeller ilk olarak laminar kabin içerisine konularak UV ışık altında 2 saat boyunca sterilize edilmiştir. Daha sonra %5 (w/v)’lik CaCl₂ çözeltisi hazırlanmış ve 0.22 µm por boyutuna sahip filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. 96 kuyucuklu petri kabı yüzeylerinde hemostatik filmler oluşturmak için mikrojellerin %5 (w/v)’lik CaCl₂ ile 100 mg/mL konsantrasyonunda jel karışımları hazırlanmış ve her bir kuyucuğa 100 µL jel dökülerek 24 saat boyunca jelleşmesi sağlanmıştır. Daha sonra hemostatik jel filmlerin üzerine her bir kuyucuğa 1x10⁴ L929 fibroblast hücresi ekilmiş ve daha sonra 100 µL DMEM besiyeri (%90 DMEM, %10 FBS %1 L-Glutamin %0,2

Penisilin/Streptomisin) eklenerek inkübatörde (Thermo Scientific HeraCell (Almanya)) (37°C ve %5 CO₂) 24 saat boyunca kültür edilmiştir. Bu süre sonunda kuyucuklardan besiyerleri çekilerek, üzerlerine PBS içinde hazırlanmış 1 mg/mL derişimindeki 50 µL MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) çözeltisi eklenerek 2 saat inkübatörde kültür edilmiştir. Daha sonra hücrelerin oluşturduğu formazan kristallerini açığa çıkarmak ve hücre zarlarını parçalamak amacıyla kuyucuklara 100 µL izoopropanol/HCl çözeltisi eklenmiştir. Yarım saat boyunca karanlık ortamda tutulan hücrelerin absorbansları 570 nm'de mikropilaka okuyucuda okunmuştur. Hücre canlılığı hesaplamaları için polistiren yüzeyinde kültür edilen hücrelerin verdiği absorbans %100 kabul edilip, % hücre canlılığı hesaplanmıştır. Deney 6 tekrarlı yapılarak, ortalama değerler alınmıştır. Hücre canlılığı testi için deney grupları arasındaki farklılıkların istatistiksel anlamlılığı, çift kuyruklu Student t testi kullanılarak değerlendirilmiş ve p <0.05 anlamlı kabul edilmiştir. Ayrıca, veri yorumlaması için ortalama ve standart sapma rapor edilmiştir. Tüm istatistiksel değerlendirmeler Microsoft Excel 2016 sürümü ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Enjekte Edilebilir Hemostatik Jellerin Hazırlanması ve Reolojik

Karakterizasyonları

Hazırlanan fibroin mikrojellerin enjekte edilebilir formunun oluşturulması amacıyla 100 mg kurutulmuş fibroin mikrojeller, farklı hacimlerde (0.5 mL, 1 mL ve 1.5 mL) % 5 CaCl₂ içeren PBS çözeltisinde dağıtılarak, enjekte edilebilirliği akış hızı 200 µL/ dk'ya ayarlanmış şırınga pompası ile test edilmiş ve mikrojellerin enjekte edilebilir formu için % 5 CaCl₂ içeren PBS hacmi optimize edilerek, 100 mg mikrojeller/mL PBS en uygun konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Reolojik deneyler için bu konsantrasyonda gerçekleştirilmiştir.

Mikrojellerin enjekte edilebilir özelliklerinin analizinde reolojik özellikler önemli olup, çalışmanın bu kısmında mikrojellerin depolama ve viskoz modülü, kayma (kesme) hızına karşı viskozitesi incelenmiştir. Bu amaçla bölüm 100 mg kurutulmuş fibroin mikrojeller %5 (w/v) CaCl₂ içeren PBS çözeltisi içerisinde 1 mL hacimlerinde hazırlanarak reolojik davranışları incelenmiştir. Mikrojellerin enerjiyi elastik olarak saklayabilmesini gösteren Depolama Modülü (G') (elastik gerilimin gerinime oranı) ve enerjiyi dağıtabilmesini temsil eden Kayıp Modülü (G'') (viskoz gerilimin gerinime oranı) incelenmiştir. Analizler 25mm koni-plaka geometrisine sahip Haake Mars II Rheometer (Thermo Scientific, ABD) ile gerçekleştirilmiş olup oda sıcaklığında, gerinim taraması, frekans taraması ve viskozite ölçümü yapılmıştır.

3.2.7. *In vitro* Tam Kan Pıhtılaşma Testi

In vitro tam kan pıhtılaşması testi için mikrojeller 10 mg/100 µL PBS derişiminde, testen 24 saat önce 96 kuyucuklu plakaların zeminine pipetlenmiştir. Örneklerin, kuyucukların zemininde jelleşmeleri sağlanmıştır. Daha sonra taze tam kandan 50 µL örneklerin yüzeyine zarar vermeyecek şekilde ve dikkatlice kuyucuklara pipetlenerek, 120 s oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresini takiben kuyucuklara 100 µL fosfat tamponu, örneklerin yüzeyinde pıhtılaşan kanının bozulmamasına özen gösterilerek ve kuyucukların kenarından sızdırılarak eklenmiştir. 96 kuyucuklu plaka, serbest eritrositlerin fosfat tamponunda süspande edilip ortamdan uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla çalkalayıcıda 30 s yavaşça çalkalanmıştır. Bu sürenin sonunda pıhtı oluşumuna katılmayan serbest eritrositleri içeren yıkama çözeltisinin absorbansı gerekli seyreltmeler yapılarak hemoglobinin 540 nm’de absorbansı okunmuştur. Referans değer (kontrol) olarak ise 50 µL taze tam kanın verdiği absorbans kullanılmıştır. % Hemoglobin aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır. Bu referans için okunan absorbans değeri 100 kabul edilmiş ve tüm veriler bu değere göre korele edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu deney aynı koşullarda yedi kere tekrar edilmiş; sonuçlar ortalama±SS olarak verilmiştir [91, 92].

$$\text{Hemoglobin absorbansı (\%)} = (I_h/I_k) \times 100$$

I_h = test örneklerinin indeksi, I_k = tam kan örneğinin indeksi

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Fibroinin Molekül Ağırlığı Dağılımı

İpek kozalarında bulunan serisin proteininin immünolojik reaksiyon göstermesi sebebiyle, biyomedikal uygulamalar için serisin proteini kimyasal veya enzimatik yöntemlerle yapıdan uzaklaştırılmaktadır. Serisini uzaklaştırılmış fibroin proteinin molekül ağırlığı literatürde 160-400 kDa arasında olduğu bilinmektedir [93]. Son yıllarda molekül ağırlığı 200 kDa'dan düşük olan ipek proteinin hemostatik olarak daha etkili olduğu bildirilmiştir [1]. Bu nedenle tez çalışmasında fibroin mikrojellerin eldesinde molekül ağırlığı 200 kDa'dan düşük olan fibroin proteinlerinin kullanılması planlanmıştır.

Serisinin uzaklaştırmak için farklı yöntemler kullanılmakla birlikte en yaygın olanı serisinin alkali ortamda ekstraksiyonudur. Bu amaçla ipek kozalar önce NaHCO_3 çözeltisinde 100 °C kaynatılarak serisin proteinin amorf yapısı bozularak fibroin fiberlerden ayrılır. Daha sonra fibroin fiberler LiBr çözeltisinde hidrolize edilerek ipek fibroin sulu çözeltisi elde edilir. Bu işlem basamaklarında NaHCO_3 çözeltisinde kalma süresi ve LiBr çözeltisinde hidroliz sıcaklığı fibroinin molekül ağırlığının belirlenmesinde rol oynamaktadır.

Literatürde serisin ekstraksiyonu için standart kabul edilen yöntemde, ipek kozalar NaHCO_3 çözeltisinde 30 dakika boyunca, 100°C'de kaynatılır. Çalışmamızda bu standart yöntemle yapılan serisin ekstraksiyonunda elde edilen fibroinin ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (M_w) 260 kDa olarak bulunmuştur ve bu değer literatürde belirtilen değerler arasındadır (Tablo 4.1). Düşük molekül ağırlığına sahip fibroin proteini elde etmek için NaHCO_3 içinde kaynatma süresi 30 dakikanın üzerinde uygulanması planlanmış ve bu süre 60, 90, 120 ve 180 dakikaya çıkarılarak serisin ekstraksiyon zamanının molekül ağırlığına etkisi incelenmiştir. Farklı sürelerde ekstraksiyona tabi tutulan fibroin örneklerinin (SF-D60, SF-D90, SF-D120 ve SF-D180) ağırlıkça ortalama molekül ağırlıkları Tablo 4.1'de ve her bir örnek için oluşturulan Guiner eğrileri Ek A'da verilmiştir Ekstraksiyon süresi 60 ve 90 dakika uygulanan SF-D60 ve SF-D90 örneklerinin, M_w sırasıyla 35.8 kDa ve 40.5 kDa olarak birbirine oldukça yakın bulunmuştur. SF-D120 ve SF-D180 örneklerinin M_w ise 13.4 kDa ve 9.3 kDa olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ekstraksiyon süresi arttıkça fibroin proteinin molekül ağırlığının düştüğü görülmüştür. Sıcak alkali çözeltilerde gerçekleşen ekstraksiyon sırasında amorf serisin yapısının ve serisin -fibroin arasındaki amit bağlarının kırılmasıyla serisin proteini fibroin fiberlerinden ayrılır [94]. Standart metotta ekstraksiyon süresi 30 dakika uygulanan fibroin örneğinin M_w 'nın 260 kDa olması bu

sürenin fibroin yapısını çok etkilemediğini göstermektedir. Ancak ekstraksiyon süresinin artmasıyla sadece serisinin yapıdan ayrılmadığı aynı zamanda fibroin yapısının amorf bölgelerden bozunmaya uğrayarak fibroin molekül ağırlığının 9.3 kDa'a kadar düştüğü izlenmiştir. Fibroin yapısının amorf bölgelerinden bozunmaya uğraması ile β -tabaka konformasyonunun arttığı bu nedenle daha kararlı bir yapıya geçtiği bildirilmiştir [93, 95]. Pritchard ve ark. benzer şekilde ekstraksiyon işleminde hidroliz süresinin 60 dakika uygulandığı ipek fibroinin molekül ağırlığını 170 kDa, 90 dakika uygulanan örneklerin ise 71 kDa'dan az olduğu belirtilmiştir [96].

Diğer taraftan hidroliz sıcaklığı da molekül ağırlığının düşürülmesinde etkili bir parametre olduğu görülmüştür. LiBr içerisinde 70°C'de hidroliz edilerek elde edilen ipek fibroin proteininin molekül ağırlığı 11.6 kDa olarak ölçülürken, 90°C'de hidroliz edilen SF-D90 proteinine ait molekül ağırlığı 20.7 kDa olarak ölçülmüştür. Bu durum hidroliz yönteminde yapıya ait protein zincirlerinin farklı bölgelerden kırılması ve böylelikle yapının hem amorf bölgelerinin hem de kristalin bölgelerinin hidroliz olmasıyla açıklanabilir. Kim ve ark yapmış oldukları çalışmada fibroin proteininin molekül ağırlığının fibroin hidrojenlerin fiziksel özellikleri üzerine olan etkisini incelemiş ve sıcak alkali çözelti içerisinde farklı sıcaklıklarda hidroliz ettikleri fibroin proteinlerinin molekül ağırlıklarını Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) ile belirlemişlerdir. Buna göre 10-180 dk hidroliz süresinde molekül ağırlığının 263.1-82.7 kDa aralığında değiştiğini belirtmişlerdir [94]. Hidrolizin farklı sıcaklıklarda uygulanmasının fibroin proteinin molekül ağırlığı üzerine olan etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada ise molekül ağırlıkları GPC ile ölçülmüş ve molekül ağırlıkları 10- 42 kDa arasında değişen fibroinler elde edilmiştir. Hidroliz sıcaklığının 50°C olduğu ortamda fibroinin ortalama molekül ağırlığı 42kDa, 75°C' de 22 kDa, 98°C'de ise ortalama molekül ağırlığının 10 kDa olduğu belirlenmiştir. Literatürde yer alan sonuçlar, bu çalışmada elde edilen fibroin proteinlerin ortalama molekül ağırlıklarına yakın sonuçlar olup, uyumluluk göstermektedir.

Diğer taraftan molekül ağırlığının kontrol edilmesinde kullanılan diğer bir yöntem ise enzim kullanımıdır. İpek kozalaklara standart serisinin ekstraksiyon prosedürü uygulandıktan sonra elde edilen fibroin sulu çözeltisine 0.25 mg/mL ve 0.50 mg/mL olmak üzere iki farklı derişimde α -kemotripsin enzimi eklenerek elde edilen E-0.25 ve E-0.50 örneklerinin ağırlıkça ortalama molekül ağırlıkları sırasıyla 40.7 kDa ve 43.5 kDa olarak belirlenmiştir. α -Kemotripsin enziminin fibroin proteinini amorf bölgelerinden parçaladığı bilinmekte olup, enzim miktarının arttırılmasıyla daha fazla amorf bölge parçalandığı ve buna bağlı olarak

molekül ağırlığındaki azalmanın daha fazla olduğu düşünülmektedir [97, 98] . Li ve ark. yapmış oldukları çalışmada farklı enzimler kullanarak fibroin proteininin degradasyon ürünlerini incelemiş ve fibroine ait temel bileşenlerin molekül ağırlıklarının 23.4, 30.2, 35.4 ve 42.4 kDa olarak değiştiğini göstermişlerdir [99]. Standart uygulanan serisin ekstraksiyonunun son basamağında α -kemotripsin enziminin kullanımıyla 260 kDa olan fibroin çözeltisinin molekül ağırlığı 40.7 kDa'a kadar düşürülmüştür.

Her bir örnek için dn/dc değerleri refraktometre ile ölçülmüş ve SLS analizlerinde jirasyon yarıçapları hesaplanmıştır. SLS analizi yapılan ipek fibroin örneklerine ait jirasyon yarıçapı değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Jirasyon yarıçapı polimer zinciri üzerindeki herhangi bir noktanın zincirin ağırlık merkezine olan ortalama uzaklığı olup, bir polimer zincirinin büyüklüğünün ifade edilmesinde kullanılmaktadır. R_g ile ifade edilen bu değer direkt olarak Guiner eğrilerinden elde edilmektedir. Uygulanan işlemlerde molekül ağırlığının düşürülmesi ile birlikte genel olarak R_g değerlerinin azaldığı görülmektedir.

Tablo 4.1. Fibroin çözeltilerine ait ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı ve jirasyon katsayıları

KİMYASAL YÖNTEM					
Örnek	NaHCO ₃ (aq)'de Degamming süresi (dakika)	LiBr (aq)'de Hidroliz sıcaklığı (°C)	Mw (kDa)	Jirasyon Yarıçapı (nm)	
HM-SF	30	60	260	97.5	
SF-D60	60	60	35.8	70.8	
SF-D90	90	60	40.5	71.4	
SF-D120	120	60	13.4	77.9	
SF-D180	180	60	9.3	68.9	
SF-H70	60	70	11.6	122	
SF-H90	60	90	20.7	118	
ENZİMATİK YÖNTEM					
Örnek	NaHCO ₃ (aq)'de ekstraksiyon süresi (dakika)	LiBr (aq)'de Hidroliz sıcaklığı (°C)	Enzim α -kemotripsin	Mw (kDa)	Jirasyon Yarıçapı (nm)
SF-E0.25	30	60	0.25 mg/mL	40.7	112.9
SF-E050	30	60	0.5 mg/mL	43.5	77.6

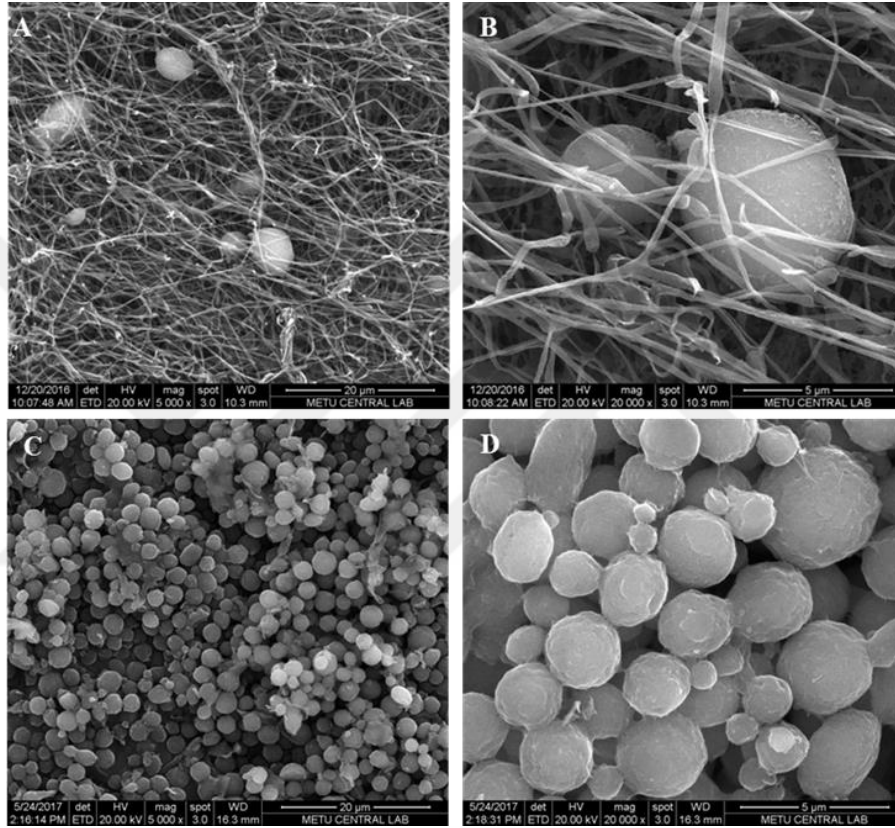
Farklı sürelerde serisin uzaklaştırma ipek fibroin örneklerine ait jirasyon yarıçapı değerleri incelendiğinde SF-D180 örneğinin en düşük jirasyon yarıçapına sahip olduğu görülmektedir. Bu durum serisin uzaklaştırma süresinin uzatılmasıyla değişen amorf yapı ile açıklanabilir. Fibroin proteininde polimer zincirlerinin esnekliği, şişme özellikleri amorf yapı ile ilgili özellikler olup serisin uzaklaştırma süresinin artmasıyla daha fazla amorf bölgenin bozunmaya uğradığı bilinmektedir [94]. Bozunan amorf bölgelerin artmasıyla birlikte çözücü içerisinde bulunan polimer zincirlerinin açılma ve şişme yeteneği azalmakta ve buna bağlı olarak jirasyon yarıçapları azalmaktadır.

4.2. Fibroin Mikrojeller

Mikrojeller genellikle emülsiyon polimerizasyonu, çökelti polimerizasyonu ve ters emülsiyon polimerizasyonu gibi farklı yöntemlerle hazırlanmaktadır. Bu çalışmada fibroin proteinin Silk I ve Silk II polimerik konformasyonel geçişlerinden faydalanılarak herhangi bir yüzey aktif madde veya organik çözücü kullanılmadan fibroin bazlı mikrojeller hazırlanmıştır. Ayrıca fibroin zincirlerinin bünyesinde hidrofilik ve hidrofobik özelliklerin bir arada bulunması polimer zincirlerinin sulu çözeltilerde bir araya gelerek mikrojel oluşumuna katkı sağladığı bilinmektedir [75]. Elde edilen mikrojellerin enjekte edilebilir olması için boyutlarının 5 mikrondan küçük olması hedeflenmiştir. Bu amaçla PVA faz ayrımı yöntemi kullanılarak fibroin/PVA filmler hazırlanmıştır. Faz ayrımı yönteminde polimerlerin karıştırılma oranları, PVA derişimi ve ultrasonikasyon süresi elde edilen mikrojellerin morfolojik özelliklerine doğrudan etki eden parametrelerdir. Harman filmler kullanılarak hazırlanan fibroin mikrojeller boyut olarak farklılıklar gösterebilmektedir. Elde edilen yapıların boyut dağılımının homojen olabilmesi için genel olarak iki farklı yöntem uygulanmaktadır. Fibroin ile PVA arasındaki hidrojen bağı sayısının azaltılması amacıyla derişimin seyreltilmesi veya makro-mikro fazları kırmak amacıyla belirli enerji frekansında ultrasonikasyonun uygulanması en sık başvuru yöntemlerdir [84]. Bu amaçla çalışmanın bu bölümünde iki farklı PVA derişimi kullanılarak ve farklı ultrasonikasyon süreleri uygulanarak hazırlanan fibroin mikrojeller elde edilmiş, değişen parametrelerin morfolojik yapı üzerine olan etkisi incelenmiştir. Ayrıca farklı yöntemler uygulanarak molekül ağırlığı düşürülmüş fibroin çözeltilerden elde edilen fibroin mikrojellerin morfolojik yapısı üzerine molekül ağırlığının etkisi incelenmiştir.

PVA derişimi % 4 (w/v) ve % 5 (w/v) kullanılarak hazırlanan filmlerden elde edilen mikrojellerin SEM görüntüleri Şekil 4.1’de verilmiştir. Genel olarak % 5 (w/v) PVA

derişiminde ve ultrasonikasyon uygulanmadığı filmlerden elde edilen mikrojellerin veriminin oldukça düşük olduğu ve PVA'nın mikrojellerin çevresinde ağ yapısı oluşturduğu izlenmiştir (Şekil 4.1A ve B). PVA derişimi % 4'e (w/v) düşürüldüğünde, PVA'nın ortamdaki uzaklaştırıldığı ve mikrojellerin düzgün ve homojen partikül boyutu dağılımına sahip izlenmiştir. Bu nedenle mikrojellerin üretiminde PVA derişimi % 4 (w/v) olarak belirlenmiştir.

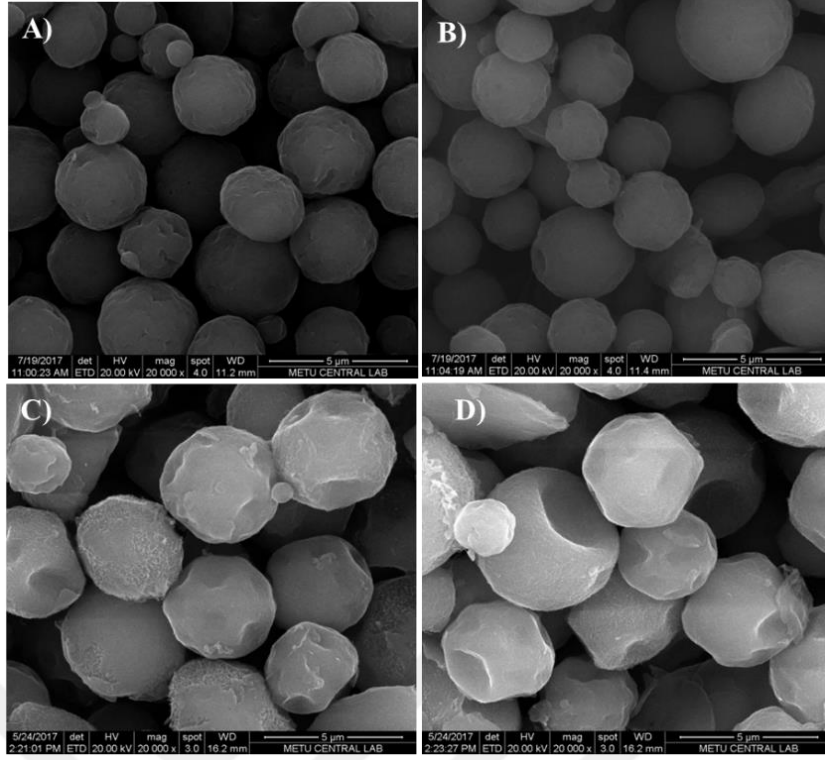


Şekil 4.1. PVA derişimin mikrojel morfolojisine etkisi. A) ve B) % 5 (w/v) PVA, C) ve D) % 4 (w/v) PVA.

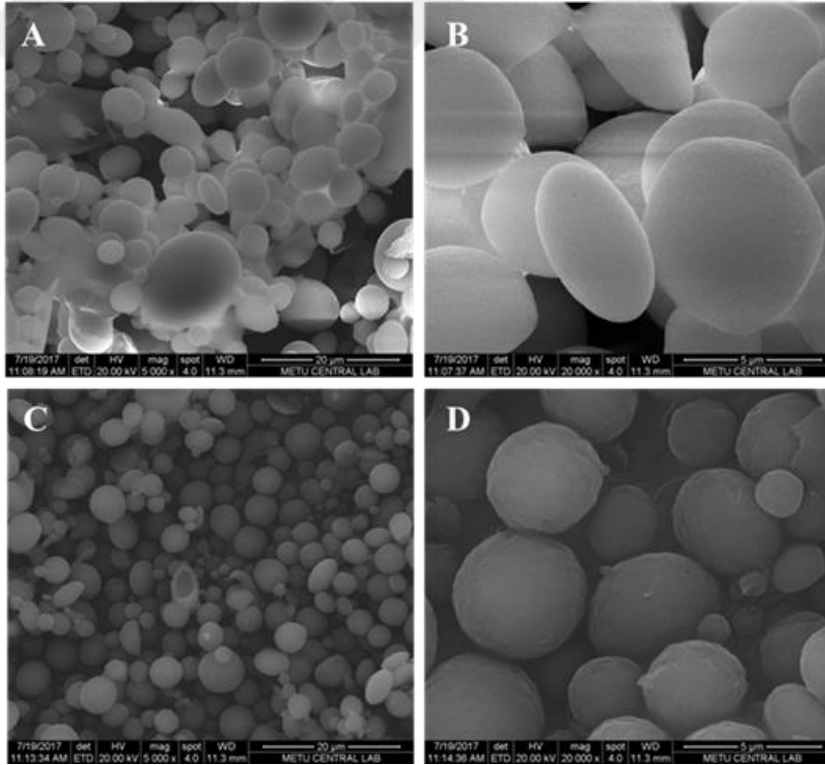
Mikrojel üretiminde uygulanan ultrasonikasyonun süresi ve enerjisinin değeri partikül morfolojisine etki eden önemli parametrelerdir. Ultrasonikasyonun uygulanması daha yüksek verimde mikrojeller elde edilmesine olanak sağlarken, ultrasonikasyon süresi ve uygulanan enerji değeri optimize edilerek istenilen boyutta mikro-nano yapılar elde edilebilmektedir. Wang ve arkadaşlarının farklı ultrasonikasyon enerjileri kullanarak elde ettikleri mikrojellerin liyofilize edildikten sonraki verimliliği incelenmiş ve % 25 enerji frekansı ile yapılan ultrasonikasyonda % 30-40 verimlilikte mikro yapılar elde edilmiştir [84]. Bu nedenle bu çalışmada da uygulanacak ultrasonikasyon enerji frekansı % 25 olarak

seçilmiş ve bu enerji değerinde farklı ultrasonikasyon süreleri kullanılarak yöntem optimizasyonu sağlanmıştır. Bu amaçla SF-D180 ve PVA çözeltilerinin 1:4 hacim oranında karıştırılmasıyla elde edilen filmlerden hazırlanan mikrojellere farklı sürelerle (30, 90, 180 ve 300 saniye) ultrasonikasyon uygulanarak, mikrojellerin morfolojisi üzerine olan etkisi incelenmiştir. Liyofilize edilen mikrojellere ait SEM görüntüleri Şekil 4.2’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre ultrasonikasyon uygulanma süresinin fibroinin mikrojel yapıya geçişi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı fakat ultrasonikasyon uygulamasıyla daha yüksek verimlilikte ve istenilen boyutta mikrojeller elde edilmesi üzerine önemli etkisi olduğu görülmüştür. Ultrasonikasyon uygulanmayan örneklerde molekül boyutu dağılımının homojen olmadığı ve mikrojellerin birbirlerine yapışık halde olduğu gözlenmiştir. Ultrasonikasyon süresinin 30 saniye süreyle uygulanmasından sonra yapışık halde bulunan mikrojellerin birbirinden ayrıldığı, 180 saniye süreyle uygulanan ultrasonikasyon sonucu elde edilen mikrojellerin sonikasyon dalgalarına uzun süre maruz kalmalarından dolayı yapılarının deformasyona uğradığı görülmüştür. Ultrasonikasyon süresinin uzatılmasıyla da mikrojellerin ultrasonikasyon dalgalarının etkisiyle birbirlerine çok daha fazla çarptığı ve bunun etkisiyle deformasyonun arttığı gözlenmiştir. Bu nedenle devam eden çalışmalar için ultrasonikasyon süresi 30 saniye olarak belirlenmiştir.

Fibroinin molekül ağırlığının mikrojel morfolojisine etkisini incelemek için farklı molekül ağırlığına sahip fibroin çözeltilerinden faz ayırım yöntemi ile mikrojeller elde edilmiştir. Fibroin fiberlerin LiBr içerisinde farklı sıcaklıklarda hidroliz edilmesiyle hazırlanan SF-H70 (11.6 kDa) ve SF-H90 (20.7 kDa) çözeltilerinden hazırlanan fibroin mikroküreler sırasıyla Fibgel-H70 ve Fibgel-H90 olarak isimlendirilmiş olup, SEM görüntüleri Şekil 4.3’te verilmiştir. Mikrojel morfolojileri incelendiğinde Fibgel-H70 mikrojellerin oval bir yapıya sahip oldukları ve ayrıca Fibgel-H90 mikrojellerine göre daha büyük partikül boyutuna sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 4.2. Ultrasonikasyon süresinin fibroin mikrojel morfolojisine etkisi. A) 30 s, B) 90 s, C) 180 s, D) 300 s.



Şekil 4.3. Farklı hidroliz sıcaklıkları uygulanarak hazırlanan fibroin mikroküreler; A) ve B) Fibgel -H70, C) ve D) Fibgel-H90.

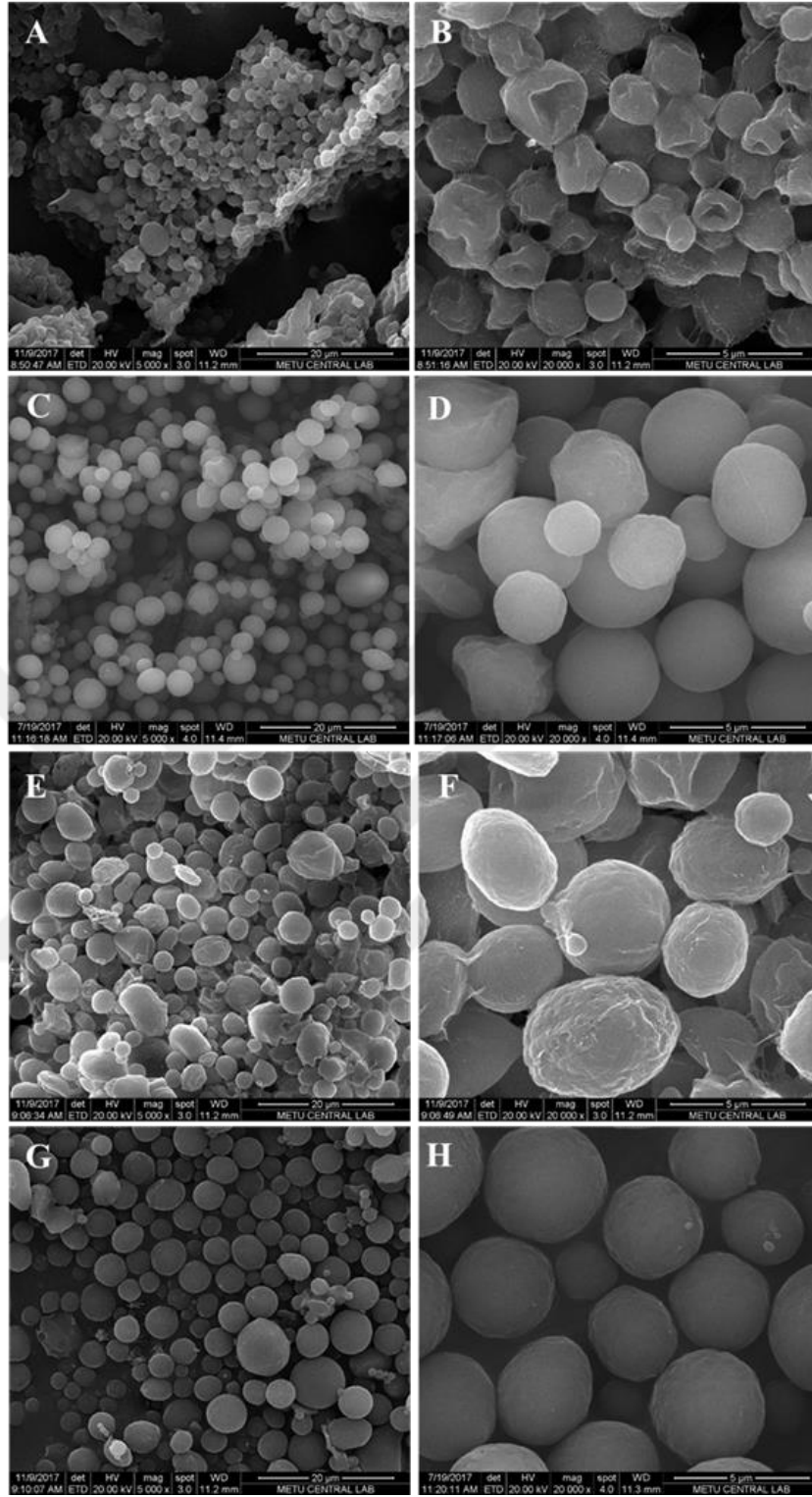
Diğer taraftan 60 dakika-180 dakika arasında değişen ekstraksiyon süreleri uygulanarak elde edilen düşük molekül molekül ağırlıklarına sahip SF-D60 (35.8 kDa), SF-D90 (40.5 kDa), SF-D120 (13.4 kDa) ve SF-D180 (9.3kDa) fibroin çözeltilerinden hazırlanan mikrojeller sırasıyla Fibgel-D60, Fibgel-D90, Fibgel-D120 olarak isimlendirilmiş olup SEM görüntüleri Şekil 4.4’de verilmiştir.

NaHCO₃ sulu çözeltisinde farklı sürelerde ekstraksiyon yapılan fibroin çözeltilerinden elde edilen mikrojellerin, farklı sıcaklıklarda hidroliz edilen mikrojellere (Fibgel-H70 ve Fibgel-H90) göre daha küresel morfolojiye sahip oldukları ve daha homojen partikül boyutu dağılımında oldukları gözlenmiştir. Bunun sebebinin hidroliz sırasında fibroine ait peptit zincirlerinin hem amorf hem de kristalin bölgelerden hidroliz olması sonucu kimyasal yapısında meydana gelen değişimler olduğu düşünülmektedir. H.H Kim ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada yapının LiBr içerisinde reaksiyona bırakıldığında, fibroinin β -tabaka içeriğinin değiştiğini ve buna bağlı olarak elde edilen fibroin çözeltisinin jelleşme göstermediğini belirtmişlerdir [94].

Farklı moleküler ağırlığına sahip fibroin çözeltilerinden elde edilen mikrojellerin partikül boyutları 2.8 ve 3.7 μ m arasında değiştiği ve zeta potansiyellerinin ise -16.7 ve -11.3 arasında olduğu bulunmuştur (Tablo 4.2). Fibroin çözeltilerinin molekül ağırlığı değişiminin partikül boyutunu çok etkilemediği izlenmiştir. Tüm mikrojellerin partikül boyutları enjekte edilebilir büyüklüktedir. Aynı zamanda ekstraksiyon süresi 180 dakika olarak uygulanan ve molekül ağırlığı 9.3 kDa olan fibroin çözeltilerinden elde edilen SF-D180 olarak isimlendirilen mikrojellerin diğer örneklerle göre daha küresel morfolojiye sahip olması nedeniyle ileriki çalışmalar için bu mikrojellerin kullanılması planlanmıştır. Bu mikrojeller bundan sonra Fibgel olarak isimlendirilmiştir.

Tablo 4.2. Fibroin mikrojellerin özellikleri

Fibroin Çözeltisi		Fibroin Mikrojel		
Örnek	Mw (kDa)	Örnek	Partikül Boyutu (μ m)	Zeta potansiyel (mV)
SF-D60	35.8	Fibgel-D60	2.8	-12.0
SF-D90	40.5	Fibgel-D90	3.1	-15.3
SF-D120	13.4	Fibgel-D120	3.7	-11.3
SF-D180	9.3	Fibgel-D180	2.9	-16.7

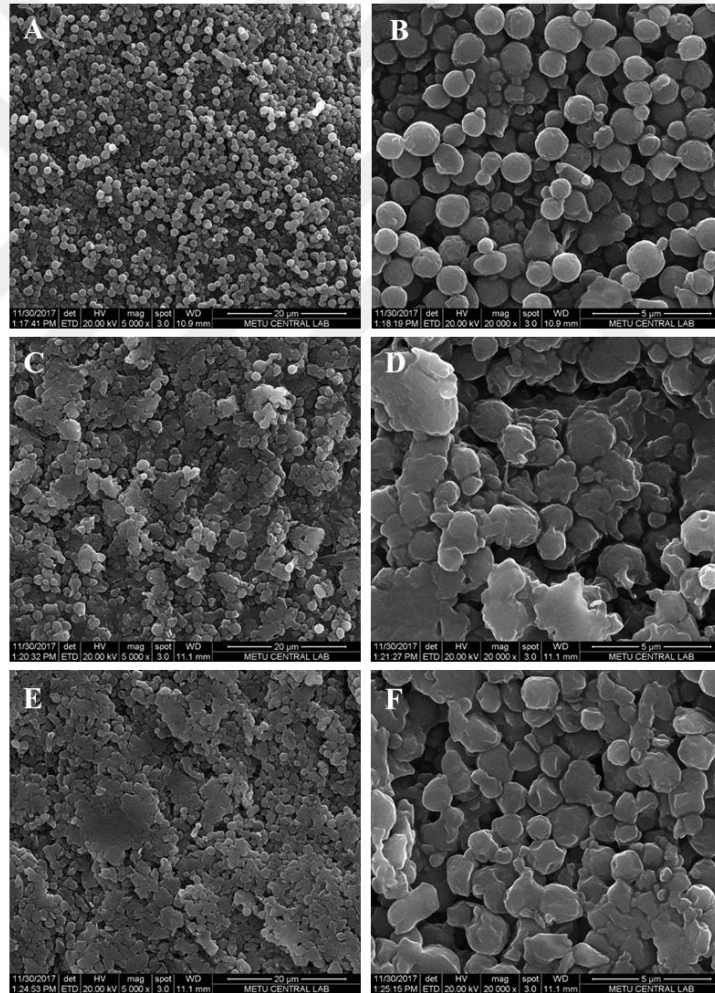


Şekil 4.4. Farklı moleköl ağırlığına sahip fibroin çözeltilerinden hazırlanan fibroin mikrojeller. A) ve B) Fibgel-D60, C) ve D) Fibgel-D90, E) ve F) Fibgel-D120, G) ve H) Fibgel-D180.

4.3. Hemostatik Fibroin Mikrojeller

4.3.1. K Vitamini İçeren Fibroin Mikrojeller

K vitamini, kanama riskinin bulunduğu durumlarda kullanılan önemli bir prokoagülant olup koagülasyon sisteminde rol alan faktörlerin (II, VII, IX, X) aktifleşmesini sağlamaktadır. Bu amaçla fibroin/PVA çözeltisine %1 (v/v), %3 (v/v) ve %5 (v/v) oranında K vitamini eklenerek hemostatik mikrojeller elde edilmiştir (Şekil 4.5). Mikrojel morfolojileri incelendiğinde, K vitamini derişimin artmasıyla fibroin mikrojellerin morfolojisinin bozulduğu görülmüştür. Bunun K vitaminin hidrofobik yapısından kaynaklandığı düşünülmüştür. %1 (v/v) oranında K vitamini içeren mikrojellerin küresel morfolojiyi koruduğu, 2.0 µm partikül boyutuna ve -16.0 mV zeta potansiyel değerine sahip olduğu bulunmuştur. Bu mikrojeller Fibgel-K olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.5. K vitamini içeren fibroin mikrojeller. A) ve B) % 1 (v/v) K vitamini içeren fibroin mikrojeller, C) ve D) % 3 (v/v) K vitamini içeren fibroin mikrojel, E) ve F) % 5 (v/v) K vitamini içeren fibroin mikrojeller.

4.3.2. Fibrinojen Yüklü/Konjuge Fibroin Mikrojeller

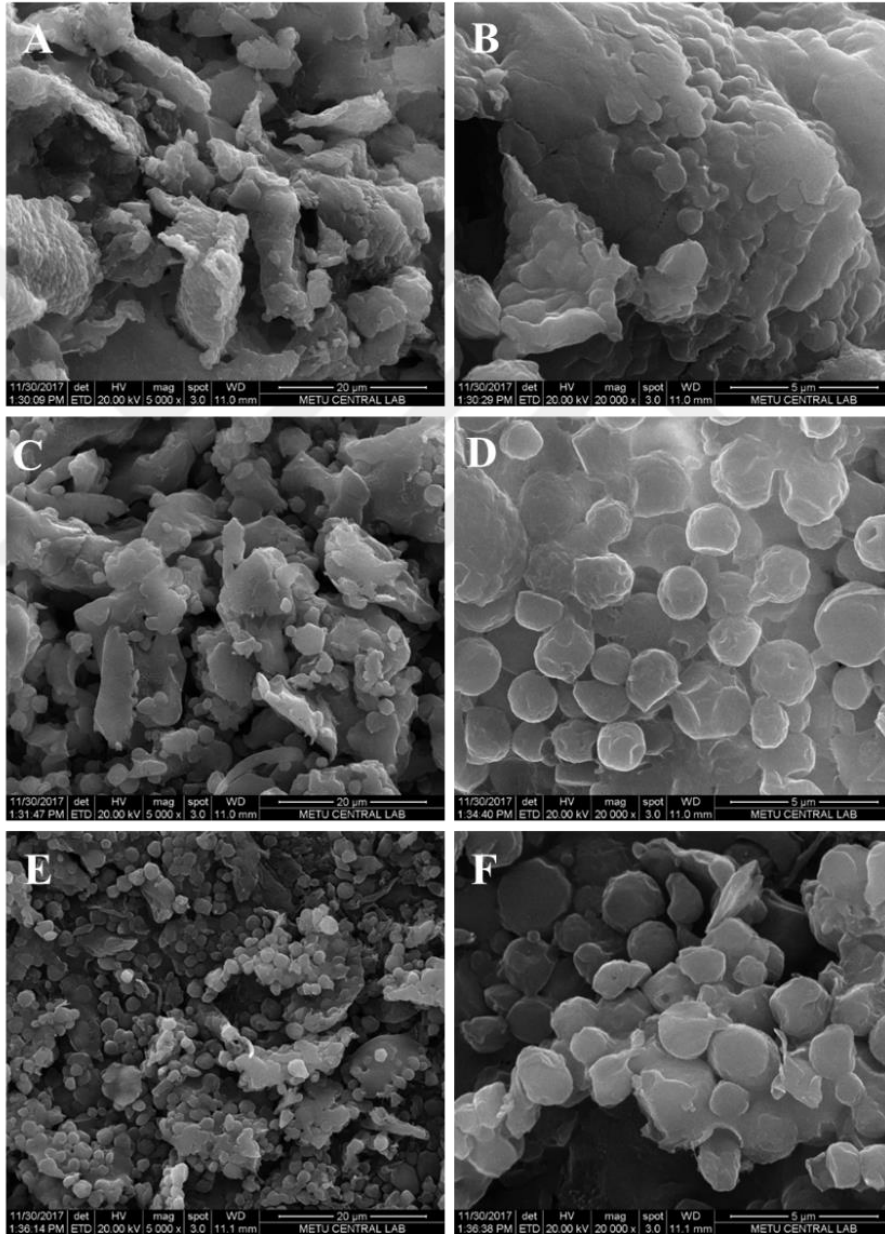
Faktör I olarak bilinen fibrinojen kan koagülasyon mekanizmasının en önemli faktörlerinden biridir. Fibrinojen miktarı sağlıklı bir bireyde 2.0- 4.5 g/L aralığındadır. Ancak kanama durumunda derişimi kritik seviyeye düşen (<1 g/L) ilk koagülasyon faktörü olup [37], hemoraj durumundaki hastaya genellikle ilk olarak fibrinojen desteği verilir [38]. Fibrinojen hemostaz dengesinin sağlanmasında önemli bir protein olmakla birlikte yara iyileşmesinde ve hücrel etkileşimlerde de önemli rollere sahiptir [4]. Bu nedenle hemostatik mikrojellerin hazırlanmasında önemli rol oynayacağı düşünülmüş ve fibroin/PVA çözeltisine %1 (w/v), %3 (w/v), %5 (w/v) oranında fibrinojen eklenerek yığın mikrojeller elde edilmiştir (Şekil 4.6). Yüksek enerjiye sahip fonksiyonel gruplar, termodinamik olarak minimum enerji konformasyonuna geçebilmek için içeriye doğru kapanırlar. Bu nedenle fibroin yapısına fibrinojenin eklenmesiyle birlikte, yüksek enerjiye sahip fonksiyonel grupların PVA fazına doğru yönelmesi ile yığın mikrojel morfolojilerinin oluştuğu görülmektedir. % 3 (w/v) oranında fibrinojen içeren ve Fibgel-Fng olarak isimlendirilen mikrojellerin partikül boyutunun 2.5 µm ve zeta potansiyel değerinin -11.5 mV olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.3). Fibrinojenin fibroin yapısına eklenmesinin partikül boyutunu etkilemediği izlenmiştir.

Fibrinojenin hemostatik etkisinin partikül yüzeyinde daha etkili olacağı düşünülerek, fibroin mikrojeller fibrinojen ile konjuge edilmiştir (Fibgel-FngC) (Şekil 4.7). Fibrinojen derişimi % 10 (w/v) olan örneklerin, konjugasyonun etkisiyle kümeleştiği, fibrinojen derişiminin % 5 (w/v)' ye indirilmesi ile daha düzgün morfolojiye sahip konjuge mikrojeller elde edilmiştir. Bu mikrojeller 2.9 µm partikül boyutuna ve -12.3 zeta potansiyel değerine sahip olduğu izlenmiştir (Tablo 4.3). Hemostatik etkinin artırılması amacıyla K vitamini fibroin mikrojellere yüklendikten sonra fibrinojen ile konjuge edilmiştir. Bu mikrojeller Fibgel-KFngC isimlendirilmiştir. Fibrinojen konjuge mikrojellere K vitaminin yüklenmesi partikül boyutunda bir değişim yaratmamıştır.

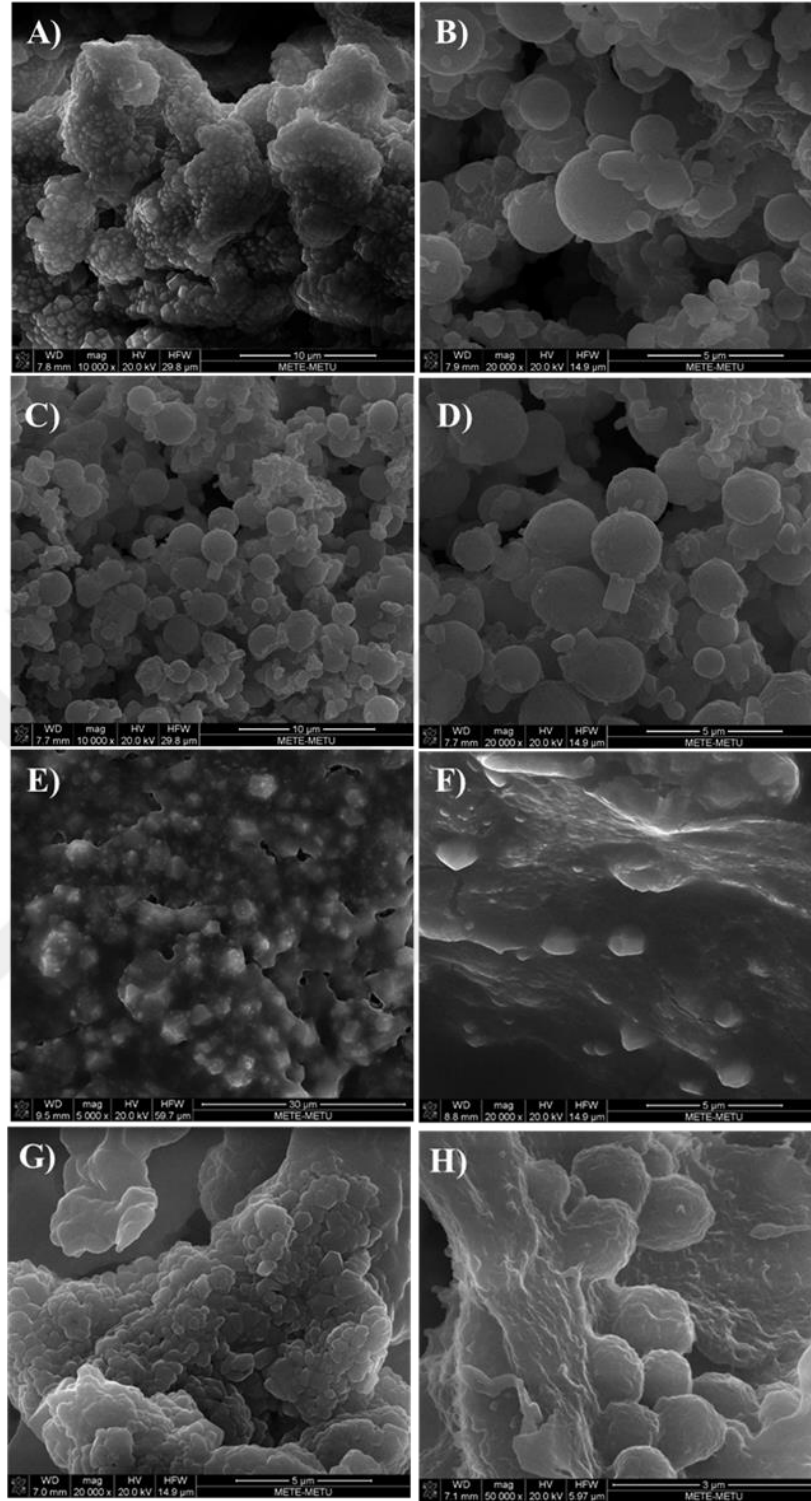
Hemostatik mikrojellerin partikül boyutları plandığı gibi <5 µm'den küçük olup, enjekte edilebilir boyutlardadır.

Tablo 4.3. Hemostatik mikrojellerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli

Örnek	Hemostatik Ajan	Ortalama Partikül Büyüklüğü (μm)	Zeta Potansiyeli (mV)
Fibgel-K	%1 (v/v)	2.0	-16.0
Fibgel-Fng	% 3 (w/v)	2.5	-11.5
Fibgel-FngC	% 5 (w/v)	2.9	-12.3
Fibgel-KFngC	% 5 (w/v)	2.7	-10.2



Şekil 4.6. Fibrinojen yüklü fibroin mikrojeller. A) ve B) % 1 (w/v) fibrinojen içeren mikrojeller, C) ve D) % 3 (w/v) fibrinojen içeren mikrojeller, E) ve F) % 5 (w/v) fibrinojen içeren mikrojeller.

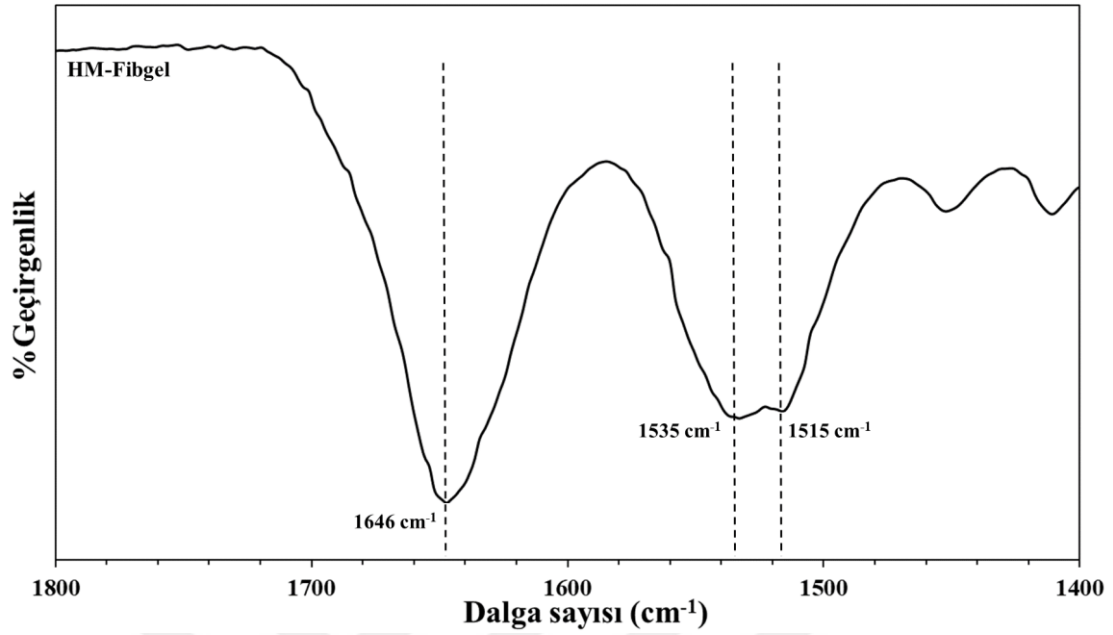


Şekil 4.7 Fibrinojen konjugasyonu ile elde edilen konjuge mikrojeller. A) ve B) Fibrinojen derişimi % 10 (w/v) olan Fibgel-FngC mikrojeller, C) ve D) Fibrinojen derişimi % 5 (w/v) olan Fibgel-FngC mikrojeller, E) ve F) Fibrinojen derişimi % 10 (w/v) olan Fibgel-KFngC mikrojeller, G) ve H) Fibrinojen derişimi % 5 (w/v) olan Fibgel-KFngC mikrojeller.

4.4. Fibroin Mikrojellerin Yapısal Özellikleri

Fibroin proteinleri düzensiz sarmal (amorf, Silk I) ve kristalin β - tabakalı (silk II) yapı olmak üzere 2 konformasyona sahiptir. Farklı metod ve prosesler uygulanarak bu konformasyonlar arasında geçişler mümkündür. Örneğin doğada ipek proteini silk I yapısındayken eğirme sırasında ipek böceği larvası tarafından silk II yapısına dönüştürülerek kararlı hale getirilir. Fibroin proteinlerin FTIR spektrumları incelendiğinde amorf yapıyı ifade eden silk I konformasyonuna ait karakteristik absorpsiyon bantları $1648 - 1654 \text{ cm}^{-1}$ ve $1535 - 1542 \text{ cm}^{-1}$ dir. $1610 - 1630 \text{ cm}^{-1}$, $1695 - 1700 \text{ cm}^{-1}$, $1510 - 1520 \text{ cm}^{-1}$ aralıklarında bulunan IR bantları fibroinin ikincil yapısı olarak bilinen silk II konformasyonuna ait karakteristik bantlardır [100]. $1700 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ arasında görülen absorpsiyon bantları genel olarak amit I ve amit II yapılarına ait absorpsiyon bantlarıdır. İpek fibroinin yapısına ait fraksiyonlar olan düzensiz sarmal, α -heliks ve β -tabakaya ait değişiklikler genel olarak bu bölgede incelenir (Wang et.al.2010). Amit III bölgesinde $1220 - 1240 \text{ cm}^{-1}$ aralığı ve amit IV bölgesinde 740 cm^{-1} yakınındaki bantlar β -tabakaya ait karakteristik absorpsiyon bantlarıdır [56, 101]. $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ arasındaki infrared spektral bölge peptit ana zincirlerinin absorpsiyon bantlarını kapsayan amit I bölgesidir ve bu bölge daha çok C=O bağ gerilmesiyle ilişkilidir. $1600 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ arasındaki spektral bölge ise amit II yapısına sahip peptit zincirlerine ait olan absorpsiyon bantlarını kapsamakta olup bu bölge N-H bağ bükülmesi ve C-H gerilme titreşimleriyle ilişkilidir. Amit I titreşimleri protein ana zincirinin ikincil yapısı ile doğrudan ilişkili olup, protein yan zincir gruplarına ait konformasyonel değişimler amit II bölgesinde incelenmektedir [71]. $1200 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ aralığı C-N bağ gerilmesi ve C=O bağ bükülmesinden kaynaklanan frekansları içeren amit III bölgesidir [101].

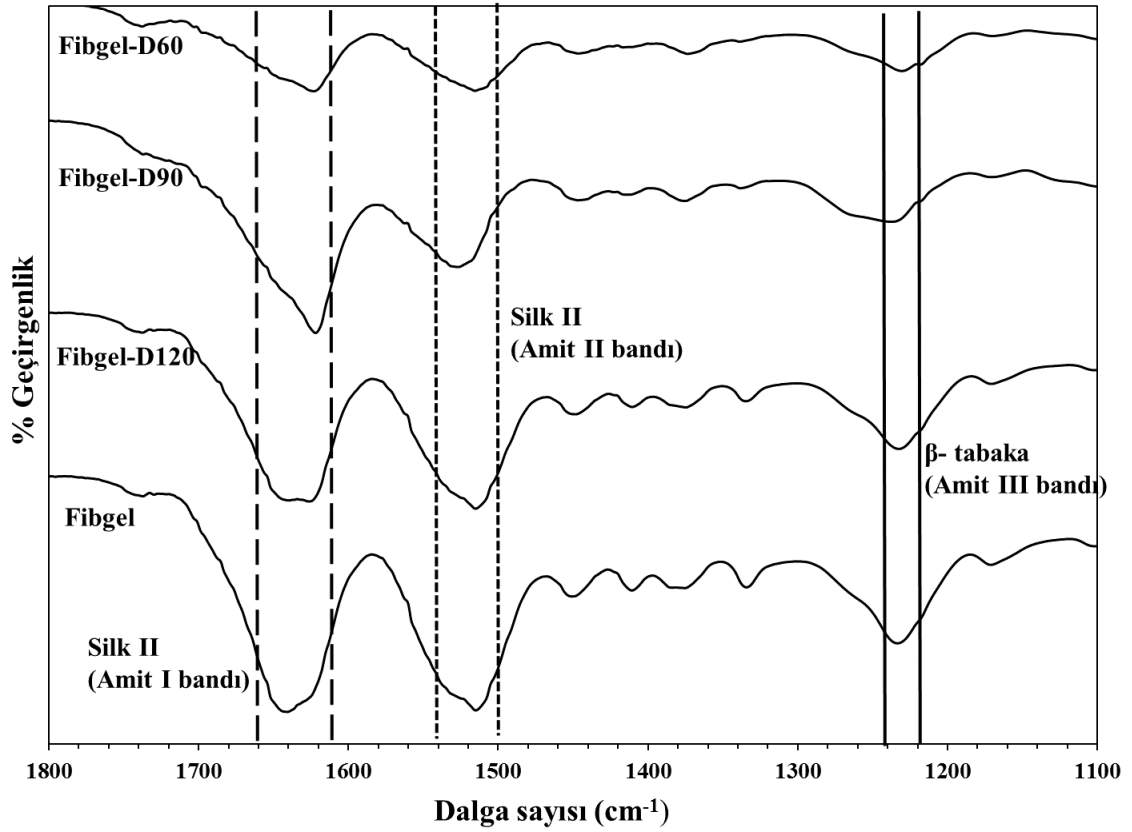
Yüksek molekül ağırlığına sahip fibroin (260 kDa) mikrojellerin FTIR spektrumu incelendiğinde amit I bölgesinde 1647 cm^{-1} deki kuvvetli bant yapının amorf yapı olan silk I konformasyonunda olduğunu göstermektedir (Şekil 4.8). Amit II bölgesinde yer alan 1535 cm^{-1} ve 1516 cm^{-1} olmak üzere iki ucu bulunan absorpsiyon bandı yapıda sırasıyla silk I ve silk II konformasyonlarının bir arada bulunduğunu göstermektedir.



Şekil 4.8. Yüksek molekül ağırlıklı fibroin mikrojellerin (HM-Fibgel) FTIR spektrumu.

Fibroin proteinleri farklı kimyasal ve enzimatik yöntemlerle işleme tabi tutulduğunda öncelikle amorf bölgelerden bozunmaya uğradığı ve konformasyonel değişimlere uğradığı bilinmektedir. Farklı hidroliz sürelerine sahip fibroin çözeltilerinden elde edilen mikrojellerin konformasyonel geçişlerinin aydınlatılması amacıyla FTIR spektrumları incelenmiştir (Şekil 4.9). Fibgel-D60 örneğine ait infrared spektrumunda amit I bölgesinde görülen 1621 cm^{-1} 'deki bant ve amit II bölgesinde yer alan 1516 cm^{-1} 'de görülen bantlar yapının silk II konformasyonunda olduğunu göstermektedir. $1220\text{--}1240\text{ cm}^{-1}$ aralığı amit III bandı olarak bilinir ve bu bölgede yer alan 1230 cm^{-1} yakınlarında elde edilen bantlar β -tabakaya ait karakteristik absorpsiyon bantlarını oluşturmaktadır. Amit III bölgesinde 1230 cm^{-1} civarında absorpsiyon bantlarının görülmesi yapının β -tabaka yapısına ulaşmış olduğunu göstermektedir. Örneklere ait spektrumlar incelendiğinde sırasıyla Fibgel-D60, Fibgel-D90, Fibgel-D120 ve Fibgel örneklerine ait olmak üzere amit III bölgesinde görülen 1229 cm^{-1} , 1233 cm^{-1} , 1231 cm^{-1} , 1234 cm^{-1} bantları direkt olarak β -tabakayı ifade eden absorpsiyon bantlarıdır ve dört numunenin de beta tabaka konformasyonuna sahip olduğunu göstermektedir. Bu bantların şiddetinin örneğe göre farklılıklar gösterdiği, özellikle Fibgel-D60 ve Fibgel-D90' da beta tabaka konformasyonunu gösteren bantların Fibgel-D120 ve Fibgel örneklerinde görülen β -tabaka bantlarına göre daha yayvan olduğu görülmüştür. Bu durum serisin uzaklaştırma süresinin arttırılmasıyla elde edilen fibroinden üretilen

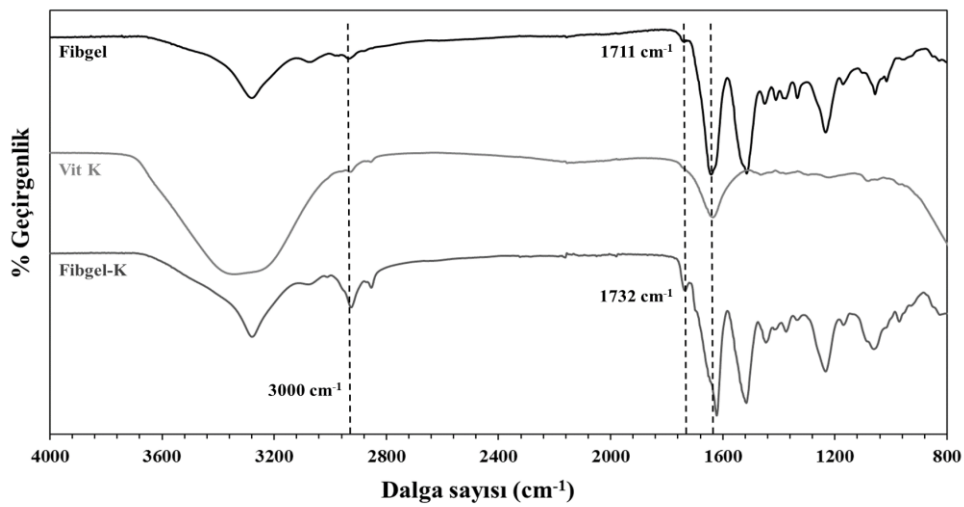
mikrojellerin ultrasonikasyonun etkisiyle β -kristalin konformasyona geçişinin arttığını göstermektedir. Fibgel-D90 örneğine ait spektrumda amit I bölgesinde yer alan 1622 cm^{-1} ve amit II bölgesinde yer alan 1520 cm^{-1} deki bantlar yapının silk II konformasyonunda olduğunu ifade etmektedir. Fibgel-D120 örneğinde amit I bölgesinde bulunan 1631 cm^{-1} ve amit II bölgesinde bulunan 1516 cm^{-1} deki bantlar yapının silk II konformasyonunda olduğunu belirtmektedir. Son olarak Fibgel-180 örneğine ait infrared spektrumunda amit I bölgesindeki 1637 cm^{-1} ile amit II bölgesindeki 1513 cm^{-1} bantları yapının beta tabaka konformasyonunda olduğunu ifade etmektedir. Mikrojellerin üretilmesi sırasında ultrasonikasyon işleminin uygulanması ipek fibroinin konformasyonel geçişini tetiklemiş, fibroin zincirleri ultrasonikasyon dalgalarının etkisiyle ikincil konformasyona geçiş yapmıştır.



Şekil 4.9. Düşük molekül ağırlığına sahip fibroin örneklerin FTIR spektrumu.

4.4.2 K Vitamininin Mikrojel Yapısına Etkisi

Fibgel içerisine K vitaminin eklenmesiyle elde edilen Fibgel-K yapısına ait infrared spektrumu, Fibgel ve K vitamininden alınan infrared spektrumları ile karşılaştırılarak incelenmiştir (Şekil 4.10). K vitaminine ait infared spektrumundaki 3000 cm^{-1} civarındaki absorpsiyon bandı K vitaminin yapısında bulunan aromatik halkaya ait C-H bağı gerilme titreşimlerine aittir. K vitaminin ipek fibroin içerisine eklenmesi sonucu oluşan yeni yapıya ait infrared spektrumunda bu bandın şiddetinin arttığı görülmektedir. Fibgel örneğine ait 1711 cm^{-1} de yer alan hafif şiddetteki absorpsiyon bandı C=O bağı gerilmesini ifade eden absorpsiyon bandıdır ve fibroin mikrojeller içerisine K vitamini eklenmesiyle birlikte bu bandın 1732 cm^{-1} ye kaydığı ve şiddetinde az da olsa artış meydana geldiği görülmüştür. Bunun sebebi K vitamininin yapıya eklenmesi sonucu elde edilen yapıdaki C=O gruplarının sayısındaki artıştır. Fibgel örneğinde amit I bölgesinde 1637 cm^{-1} de yer alan ve fibroinin ikincil konformasyonunu ifade eden bu bandın, yapıya K vitaminin eklenmesiyle birlikte 1621 cm^{-1} e kaydığı belirlenmiştir. Amit I bölgesinde gerçekleşen bu kaymanın ipek fibroinin ikincil konformasyonu üzerine bir etkisi olmamıştır. Fibgel ve Fibgel-K örneklerinin her ikisinde de bulunan ve amit II bölgesinde yer alan 1516 cm^{-1} deki bant, yapının ikincil konformasyonunu koruduğunu, kararlı yapısının devam ettiğini göstermektedir. β -tabaka oluşumunun karakteristik absorpsiyon bandı olan 1231 cm^{-1} de yer alan bandın Fibgel ve Fibgel-K örneklerine ait iki spektrumda da yer aldığı ve bu bantlara ait herhangi bir değişim olmadığı görülmüştür.



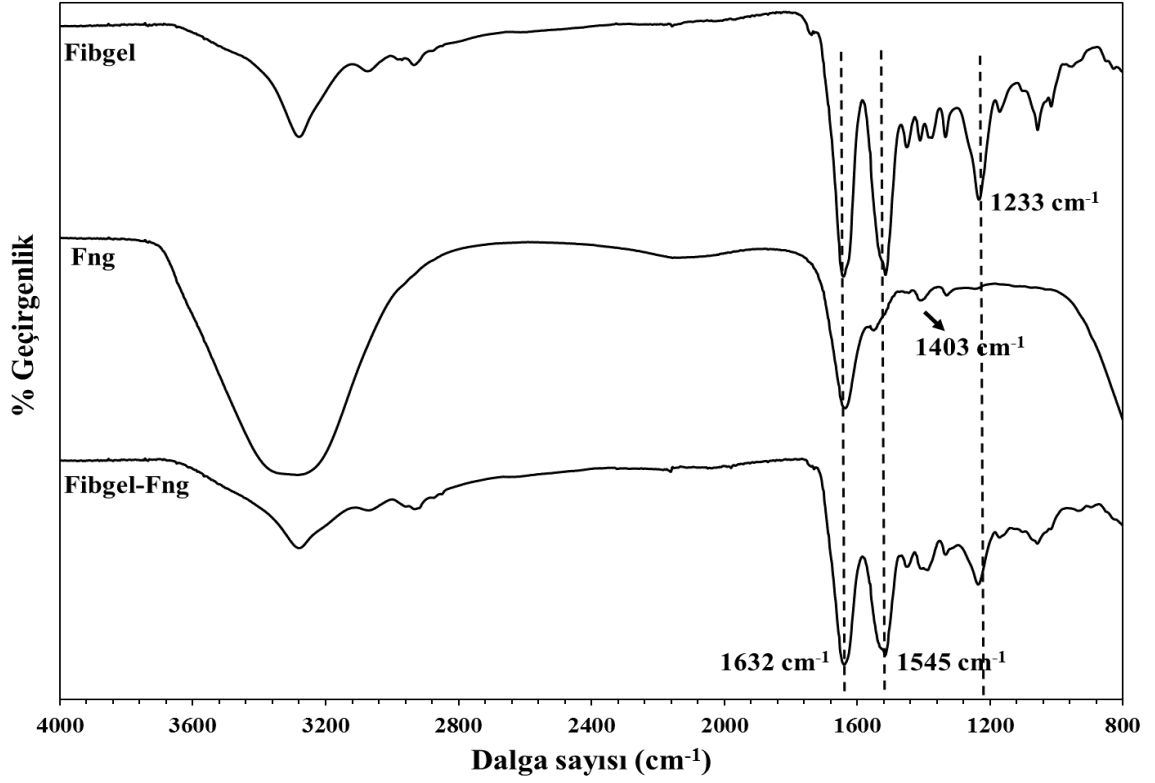
Şekil 4.10. K vitamini içeren mikrojellerin FTIR spektrumu.

4.4.3. Fibrinojenin Kimyasal Yapıya Etkisi

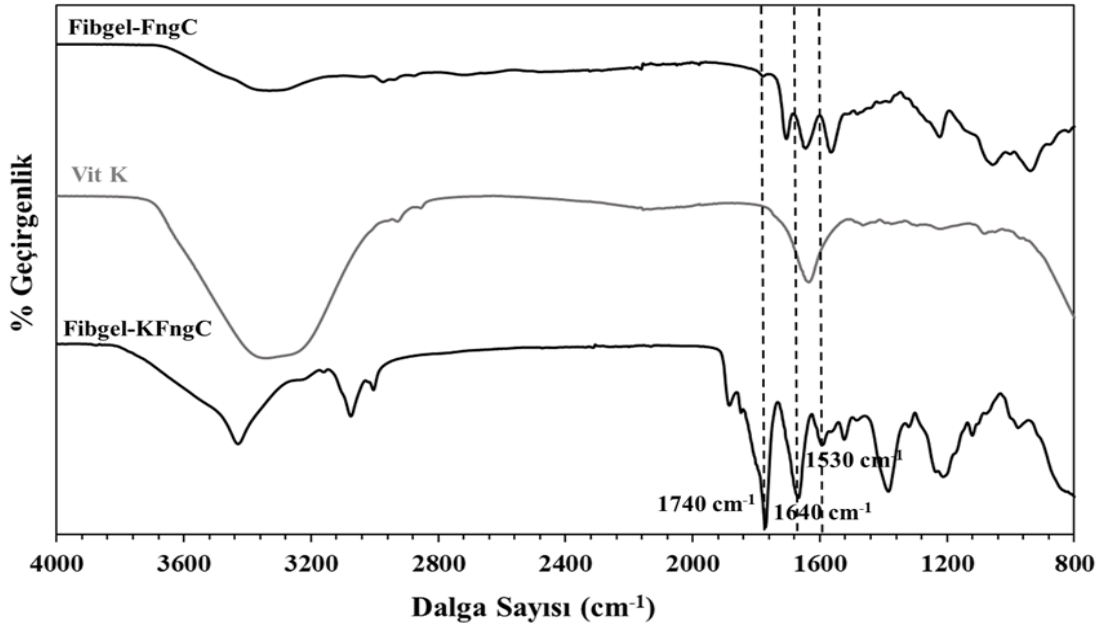
Fibgel içerisine fibrinojen eklenmesiyle elde edilen Fibgel-Fng örneğine ait IR spektrumu Şekil 4.11’de verilmiş olup, Fibgel ve fibrinojene ait IR spektrumları ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Fibrinojene ait spektrum incelendiğinde $3700-3000\text{ cm}^{-1}$ aralığında geniş ve yayvan bandın yer aldığı görülmüştür. Bu bant polipeptit yapısındaki fibrinojenin sahip olduğu $-\text{OH}$ gruplarının gerilme titreşimlerine aittir. Amit I bölgesi içerisinde yer alan 1632 cm^{-1} ’deki bant fibrinojen yapısındaki $\text{C}=\text{O}$ bağ gerilmesine, amit II bölgesinde 1545 cm^{-1} ’de yer alan hafif şiddetteki bant yapıdaki N-H bağ bükülmesi ve C-H gerilme titreşimlerine aittir. 1403 cm^{-1} civarında yer alan bant ise fibrinojen yapısındaki simetrik COO^- gerilmesini ifade etmektedir [39]. Fibrinojenin Fibgel içerisine eklenmesiyle elde edilen Fibgel-Fng örneğine ait spektrum incelendiğinde amit I ve amit II bölgelerinde yer alan 1635 ve 1514 cm^{-1} ’de bulunan ve yapının ikincil konformasyonda olduğunu gösteren bantların şiddetinin yapıya fibrinojen eklenmesinden sonra azaldığı görülmüştür. Bunun dışında yapının kristalinitesi ile ilgili olan ve yapının β -tabaka konformasyonunda olduğunu ifade eden amit III bölgesindeki 1233 cm^{-1} ’de yer alan bandın şiddetinin yapıya fibrinojen eklenmesiyle azaldığı görülmüştür. Bu azalma fibroin çözeltisinin seyrelmesinden kaynaklanmış olup, yapının halen ikincil konformasyonda olduğu ve kararlı yapısını koruduğu görülmüştür.

Fibrinojenin yüzeye konjuge edildiği Fibgel-FngC ve Fibgel-K-FngC örneklerine ait IR spektrumu Şekil 4.12’te birbirleriyle karşılaştırılarak verilmiştir. Örneklere ait spektrum incelendiğinde her iki örnekte de ipek proteinine ait karakteristik bantların varlığı görülmüştür. Fibgel-FngC örneğinde amit I bölgesinde 1622 cm^{-1} civarında ve amit II bölgesinde 1520 cm^{-1} civarında yer alan bantların Fibgel-K-FngC örneğine ait IR spektrumunda 1640 ve 1530 cm^{-1} ’ye kaydığı belirlenmiştir. Fibgel-K-FngC örneğinde 1640 cm^{-1} ’deki bandın şiddetindeki artış yapıya K vitamininin eklenmesinden kaynaklanmıştır. Fibroine ait olan bu karakteristik bantlar yapının ikincil konformasyonunu koruduğunu göstermiştir. Konjugasyonda EDC/NHS çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılmış, fibroinin primer amin grupları ile fibrinojene ait karboksil grupları arasında kovalent bağlanma gerçekleştirilmiştir. Fibgel-FngC örneğine ait spektrumda 1709 cm^{-1} ’de oluşan yeni absorpsiyon bandı fibroinin üzerine fibrinojenin kovalent immobilizasyonunun gerçekleştiğini göstermiştir [70]. Konjugasyonun varlığını gösteren bu bant Fibgel-K-FngC örneğinde 1740 cm^{-1} civarında olup ve bandın şiddetinin arttığı gözlenmiştir. Her iki örnekte de 1234 cm^{-1} ’de görülen absorpsiyon bandı fibroinin kristalin yapısı ile ilgili olan β -tabaka

konformasyonuna ait karakteristik absorpsiyon bandı olup, her iki örneğin de kararlı bir yapıya sahip olduklarını göstermiştir.



Şekil 4.11. Fibrinojen içeren mikrojellerin FTIR spektrumu.

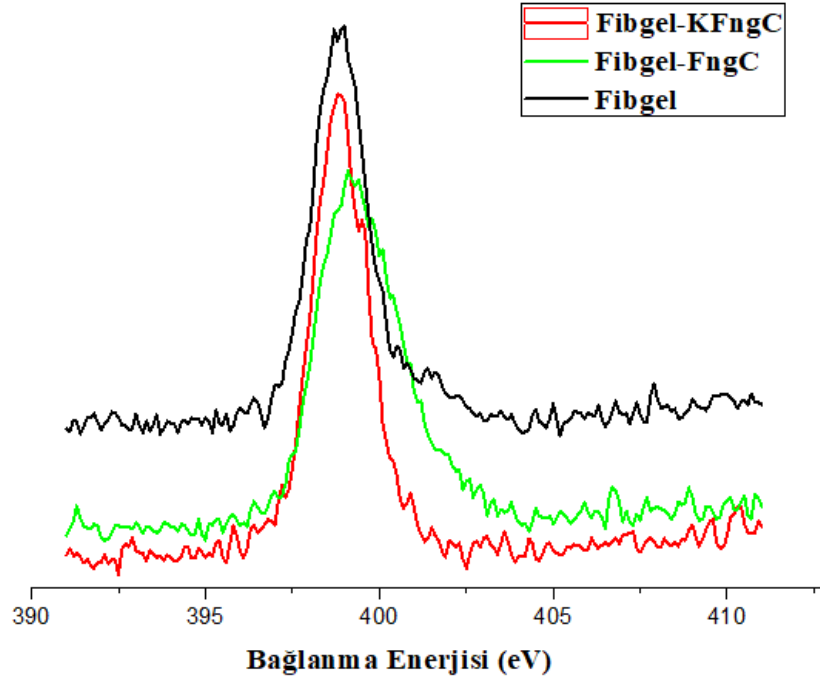


Şekil 4.12. Fibrinojen konjuge mikrojellerin FTIR spektrumu.

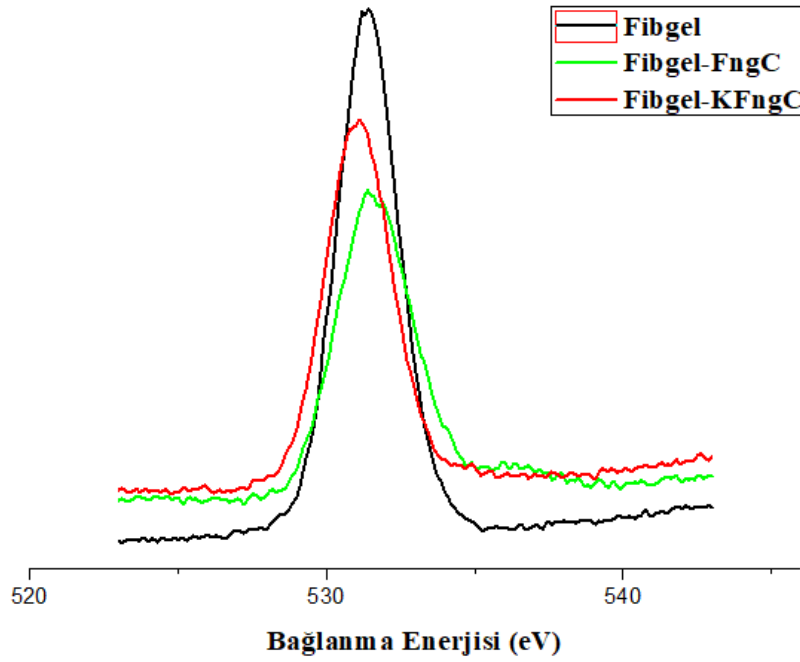
4.4.5. Konjuge Mikrojellerin X-Işınlari Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) Analizi

X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) numune yüzeyine x-ışınlarını bombardımanının yapılmasıyla örnek yüzeyinin, bileşimini ve kimyasal bağlanma durumunu oluşturan elementlerin analiz edildiği bir tekniktir. Fibgel, Fibgel-FngC ve Fibgel-KFngC örnek yüzeylerinin atomik bileşen oranları XPS analizi ile belirlenmiştir. Örnek yüzeylerine yapılan fibrinojen immobilizasyonunun belirlenebilmesi amacıyla Fibgel, FibgelFngC ve Fibgel-KFngC mikrojellerinin farklı atomlara bağlı temel seviye spektrumları oluşturulmuştur. Azot-1s temel seviye spektrumu (bağlanma enerjisi 390-412 eV), oksijen-1s temel seviye spektrumu (bağlanma enerjisi 520-545 eV) ve karbon 1-s temel seviye spektrumu (bağlanma enerjisi 275-300 eV) sırasıyla Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verilmiştir.

Fibrinojen immobilizasyonunun gerçekleştiği Fibgel-FngC ve Fibgel-KFngC örneklerinde fibrinojenli yüzeylerdeki oksijen ve azot içeriğinin artmasına bağlı olarak Azot 1s spektrumu ile Oksijen 1s spektrumlarının hafifçe yayvanlaştığı Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te izlenmiştir.

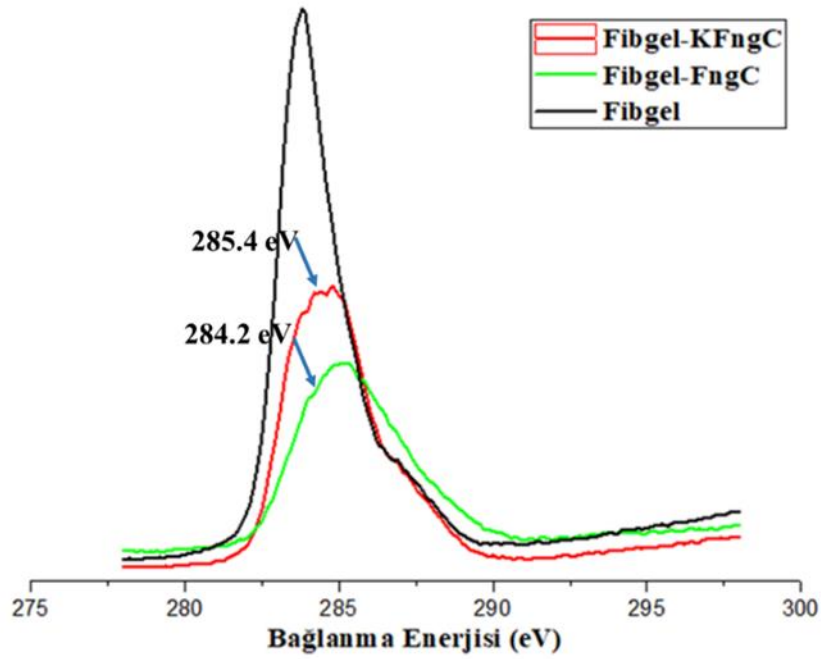


Şekil 4.13. Azot 1s temel seviye spektrumu



Şekil 4.14. Oksijen 1s temel seviye spektrumu

Örneklere ait Karbon-1s temel seviye spektrumu Şekil 4.15’te verilmiş olup spektrumda 283.8 eV değerindeki maksimum pik noktası hidrokarbon zincirindeki lineer C-C bağlanmasını göstermektedir. Lineer karbonların bağlanma enerjilerinin diğer karbon bağlanmalarına daha yüksek olduğu literatürden bilinmektedir [102]. Fibrinojen immobilizasyonundan sonra Fibgel-FngC örneğine ait spektrum 281.3-291.3 eV aralığında, Fibgel-KFngC örneğine ait spektrumun ise 281.3-290.0 eV aralığında yayvanlaştığı görülmüştür. Bu durum farklı karbon bağlanmalarından kaynaklanan sinyallerin üst üste gelerek birleşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir [103]. EDC/NHS konjugasyon sisteminin fibrinojenin COO- gruplarını aktifleştirdiği, karboksil grupları aktifleştirilmiş olan fibrinojenin fibroinin primer amin grupları ile çapraz bağlanması sonucu yeni bir yapı oluşmuştur. Bu bağlanma karbon-1s spektrumunda Fibgel-KFngC örneği için 285.4 eV değerinde, Fibgel-FngC örneği için 284.2 eV değerinde görülmüştür [70]. Fibgel-KFngC örneğinde 286.6 eV değerinde oluşan omuz fibrinojenin immobilize edildiği fibroinin yüzeyindeki C-O bağlanmasını göstermektedir. Spektrumda 289.0 eV değerindeki yayvanlaşma ise fibrinojenin karboksil gruplarına aittir [104]. Elde edilen bu sonuçlar fibrinojenin fibroin yüzeyleri ile konjuge olduğunu ispat etmektedir.

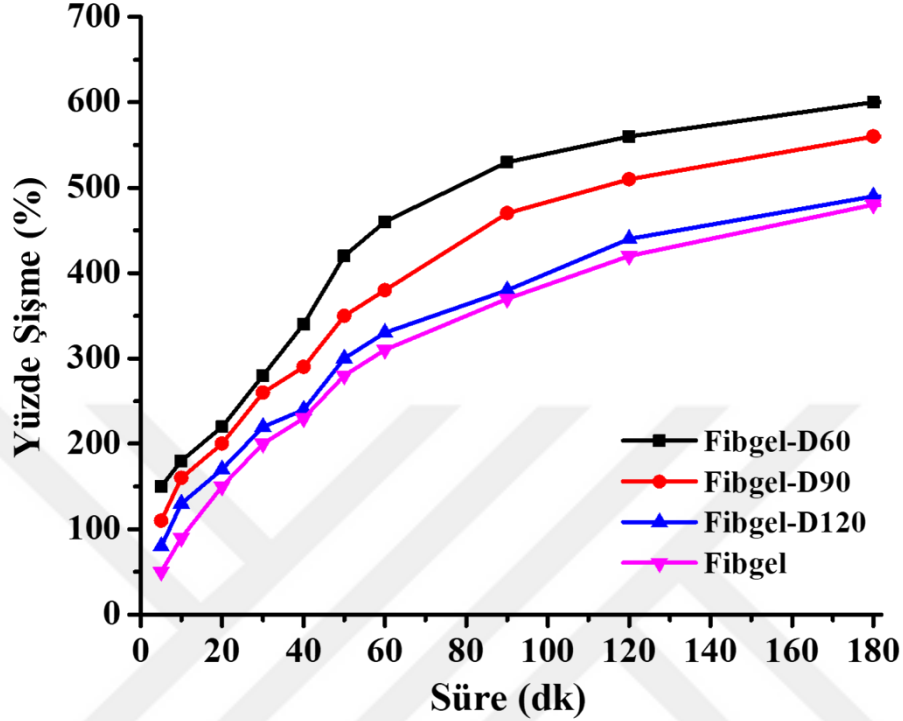


Şekil 4.15. Karbon 1s temel seviye spektrumu

4.6. Fibroin Mikrojellerin Şişme Özellikleri

Mikrokürelerin şişme davranışları 37°C’de PBS ortamında incelenmiştir. Mikrokürelerin ağırlıkça şişme oranları gravimetrik olarak hesaplanmış ve şişme yüzdelерinin artan süreye karşı değişimini ifade eden grafikler olarak verilmiştir. Molekül ağırlığı etkisinin mikrojellerin şişme davranışına olan etkisinin incelenmesi amacıyla Fibgel-D60, Fibgel-D90, Fibgel-D120 ve Fibgel örneklerinin şişme davranışı birbirleriyle karşılaştırmalı olarak Şekil 4.16’da verilmiştir. Grafikte serisin uzaklaştırma süresinin artmasıyla birlikte şişme oranının azaldığı belirlenmiştir. Grafiğe göre en yüksek şişme kapasitesine sahip örneğin Fibgel-D60 olduğu, en düşük şişme kapasitesine sahip örneğin ise Fibgel olduğu görülmüştür. Fibroin polimerinin şişme özelliği fibroinin amorf yapısı ile alakalıdır. Fibgel-D60 örneğinin diğer örneklere göre daha yüksek şişme yüzdesine sahip olmasının nedeni diğer örneklere göre daha fazla amorf bölgeye sahip olmasıdır. Serisin ekstraksiyon süresinin artmasıyla daha fazla amorf bölgenin bozunarak yapıdan ayrılması sonucu mikrojellerin şişme yetenekleri azalmaktadır. Benzer şekilde hidroliz süresinin artmasıyla birlikte amorf bölgelerin bozunarak yapıda ikincil konformasyona geçişin arttığı FTIR sonuçlarıyla desteklenmektedir. Şişme grafiğinde ilk 10 dakika içerisinde Fibgel-D60

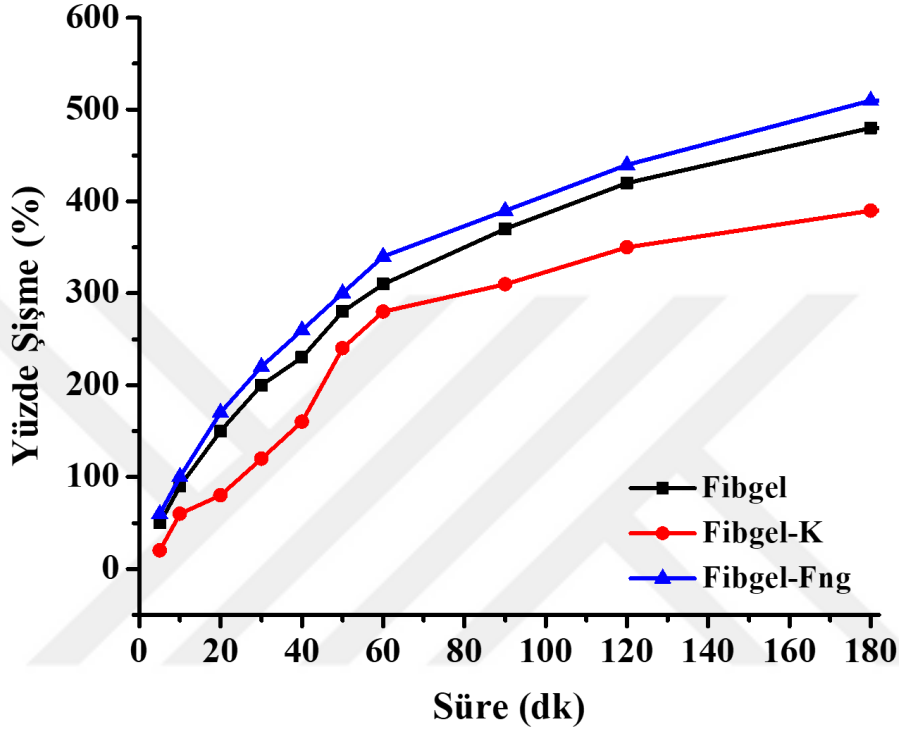
örneğin şişme yüzdesi % 180'e ulaşırken, β -tabaka konformasyona geçişin en fazla olduğu Fibgel örneğinin şişme yüzdesinin % 90' a ulaştığı görülmüştür.



Şekil 4.16. Fibroin mikrojellerin şişme davranışları.

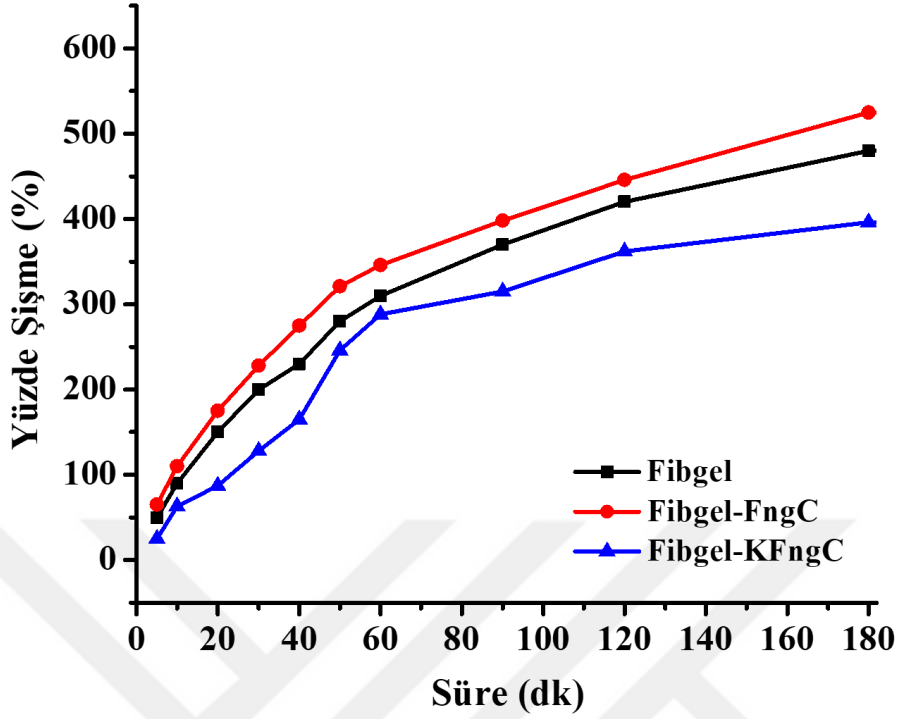
Fibgel örnekleri içerisine K vitamini ve fibrinojenin eklenmesiyle elde edilen Fibgel-K ve Fibgel-Fng örneklerine ait şişme grafiği Şekil 4.17' de verilmiş olup, örneklerin şişme davranışı incelendiğinde Fibgel-Fng örneğinin Fibgel ve Fibgel-K örneğine göre daha yüksek şişme kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Bunun nedeni yapıya hidrofilik bir protein olan fibrinojenin eklenmesidir. Benzer şekilde Wenk ve ark. fibroin bazlı biyomalzemelerin kitosan, hyaluronik asit ve fibrinojen gibi diğer doğal malzemelerle harmanlanmasının fibroinin şişme kapasitesini arttırdığını belirtilmiştir [105]. Fibgel-K örneğinin Fibgel örneğine göre daha az şişme kapasitesine sahip olmasının sebebi yapıya K vitaminin eklenmesidir. Yapıya K vitaminin eklenmesi ile elde edilen Fibgel-K örneğinin ilk dakikalardan başlayarak devam eden şişme yüzdesindeki artışın diğer örneklerle göre daha az olduğu görülmüştür. İlk yarım saat içerisinde Fibgel-Fng örneğinin şişme yüzdesi %220'ye ulaşmıştır. Bu durumun K vitamininin hidrofobik yapısından dolayı şişme kapasitesini azaltmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürde E vitamini ve K vitamini içeren ve farklı tekniklerle üretilen taşıyıcı yapılara bakıldığında bu yapıların da

şişme kapasitelerinin çok yüksek olmadığı, bu nedenle taşıyıcı malzeme ve kullanılan tekniklerin değiştirilerek daha iyi şişme kapasitesine sahip yapıların elde edilmesi üzerine çalışmaların devam ettiği belirtilmiştir [106].



Şekil 4.17. Hemostatik mikrojellerin şişme davranışları.

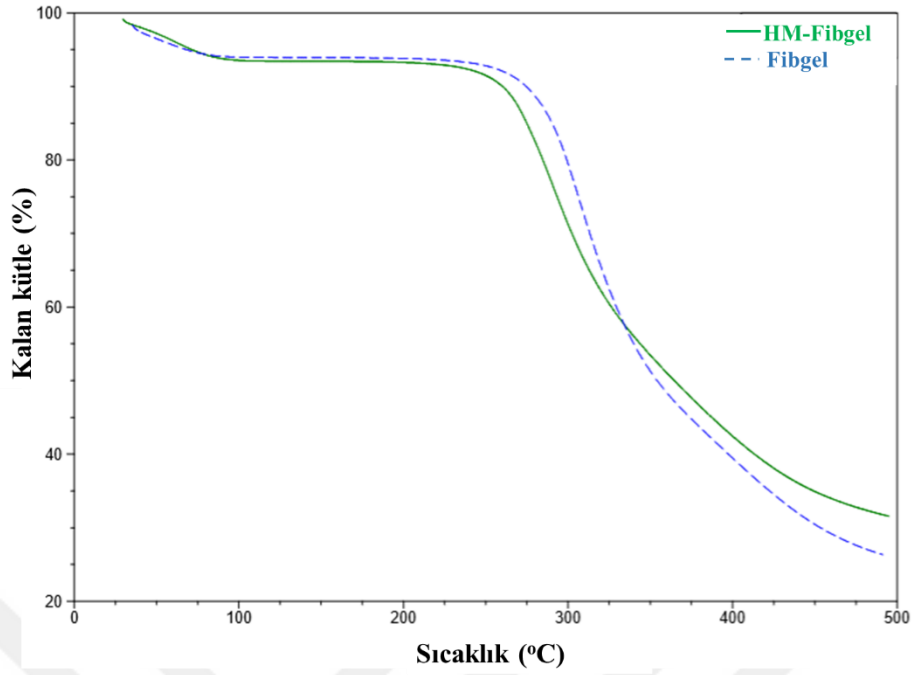
Fibrinojenin yapıya konjuge edilmesiyle K vitamini içeren mikrojellerin şişme özelliğinin bir miktar iyileştirilmiş olduğu görülmüştür (Şekil 4.18). Fibgel-K mikroveli ilk yarım saat içerisinde %100 oranında şişme davranışı gösterirken, Fibgel-KFngC örneği ilk yarım saatte %128 şişme oranı göstermiştir. Fibgel-FngC örneğinin şişme yüzdesi ise yarım saat içerisinde %230 oranına ulaşmıştır.



Şekil 4.18. Fibrinojen konjuge mikrojellerin şişme davranışları

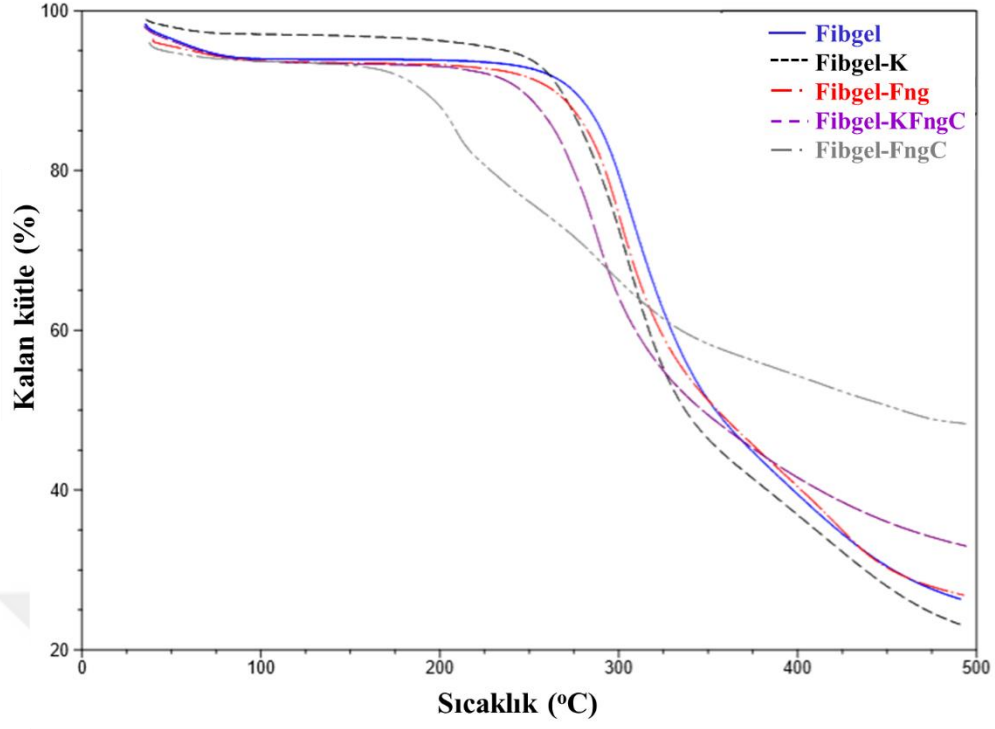
4.7 Mikrojellerin Termal Özellikleri

Mikrojellerin TGA termogramları Şekil 4.19-4.22’de verilmiş olup, termal davranışlar 2 ana bölgede incelenmiştir. İlk bölgede 100 °C civarında gerçekleşen kütle kaybı mikrojellerdeki suyun uzaklaşmasından kaynaklanmış olup bu bölge TGA termogramlarında I. bölge olarak isimlendirilmiştir. TGA termogramlarında II. bölge ise kütle kaybının daha fazla olduğu 250-350 °C aralığıdır. İkinci bölgedeki fazla kütle kaybının sebebi fibroin proteinindeki peptit bağlarının kırılması sonucu yapının termal bozunmaya uğramasıdır [107]. Yüksek molekül ağırlıklı (260 kDa, HM-Fibgel) ve düşük molekül ağırlıklı (9.3 kDa, Fibgel) örneklerine ait TGA termogramlarında 100°C’de örneklerin nemliliğinden kaynaklanan az miktarda kütle kaybı gerçekleşmiştir (Şekil 4.19). Sıcaklığın 250°C’ye ulaşmasıyla peptit bağları kırılmaya başlamış ve 250- 400 °C aralığında daha fazla peptit bağının parçalanmasına bağlı olarak hızlı bir bozunmanın gerçekleştiği görülmüştür. TGA sonuçlarına göre HM-Fibgel örneğinin Fibgel örneğine göre termal kararlılığının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni HM-Fibgel örneğinin molekül ağırlığının daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır [93].

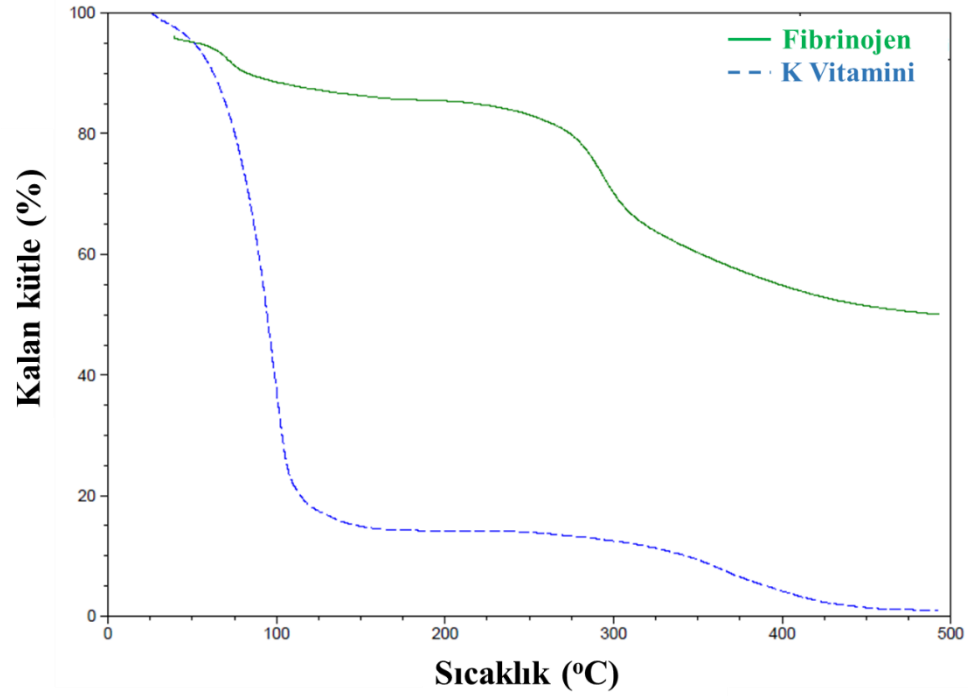


Şekil 4.19. HM-Fibgel ve Fibgel örneklerine ait TGA termogramları.

Fibgel mikrojelleri içerisine K vitamini ve fibrinojen yüklenmesi ile edilen Fibgel-K ve Fibgel-Fng örnekleri incelendiğinde tüm örneklerde 100°C’de suyun uzaklaşmasından kaynaklanan az miktarda kütle kaybı görülmektedir (Şekil 4.20). Fibgel örneği ile Fibgel-Fng örneğinin termal bozunma eğrilerinin birbirine benzerlik gösterdiği görülürken, K vitamini içeren Fibgel-K örneğinin Fibgel ve Fibgel-Fng örneklerine göre daha hızlı termal bozunma davranışı gösterdiği görülmüştür. Fibgel-K örneğinin termal degradasyonu 250 °C-375 °C arasında maksimum hıza ulaşırken, diğer iki örneğin termal degradasyonu 275 °C’de başlayıp daha yavaş bir kütle kaybı ile gerçekleşmiştir. Sıcaklık 500 °C’ye ulaştığında Fibgel ve Fibgel-Fng örneğinin yaklaşık %73’ünün bozunduğu, Fibgel-K örneğinin ise yaklaşık %85’inin bozunduğu görülmüştür. Bunun sebebi ise genel olarak vitaminlerin termal stabillerinin düşük olması ve artan sıcaklıkla birlikte vitamin yapısının hızlı bozunmaya başlamasıdır. Şekil 4.21’de yer alan K vitaminine ait TGA termogramı incelendiğinde, termal bozunmanın hızlı gerçekleştiği izlenmiştir. Sonuç olarak K vitamini eklenmesi yüksek sıcaklıklarda mikrojellerin termal kararlılıklarını düşürmekle birlikte vücut sıcaklığında etkili olmamasından dolayı, kullanımı etkilemeyecektir.



Şekil 4.20. K vitamini ve Fibrinojen içeren mikrojellerin TGA termogramları.

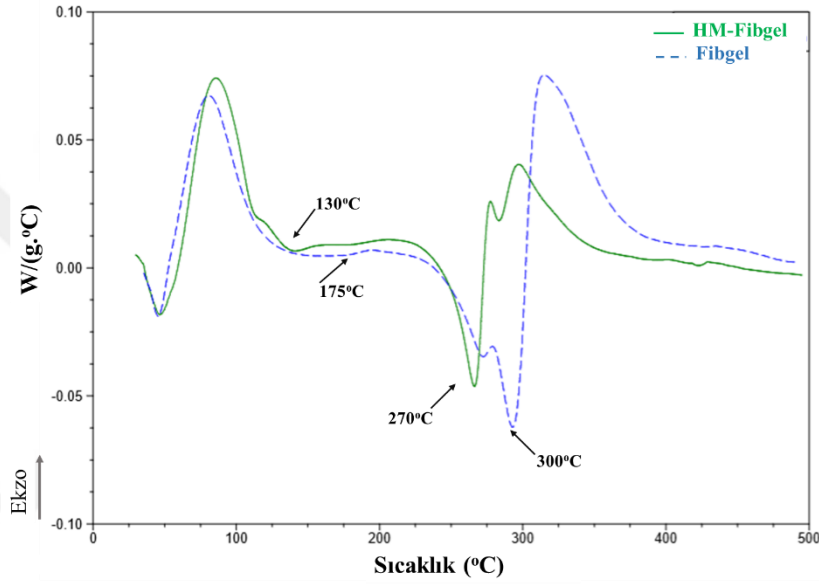


Şekil 4.21. Fibrinojen ve K vitamininin TGA termogramları.

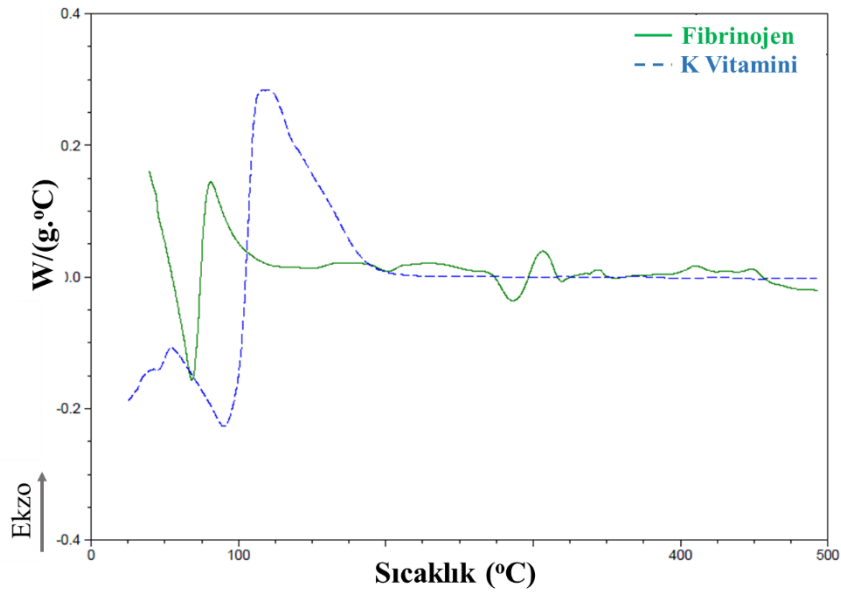
Fibroin mikrojeller üzerine fibrinojenin konjuge edilmesiyle hazırlanan Fibgel-KFngC ve Fibgel-FngC örneklerine ait TGA termogramları incelendiğinde 100°C civarında örneklerdeki suyun uzaklaşmasından kaynaklanan az miktarda kütle kaybı görülmüştür. Peptit bağlarının yavaş yavaş parçalanmaya başladığı ikinci bölgeye gelindiğinde ise her iki konjugasyon örneğinde diğer örneklerle göre daha yavaş bir degradasyon profili gözlenmiştir. Yavaş degradasyon profili görülmesinin sebebi konjugasyon ile COO⁻ grupları aktifleştirilmiş olan fibrinojen ile fibroinin NH₃⁺ amin grupları arasındaki bağlanmaların artması ve buna bağlı olarak bozunmanın daha yavaş gerçekleşmesidir [108] Konjuge örneklerin termal bozunma profilleri kendi aralarında karşılaştırıldığında Fibgel-KFngC örneğinin Fibgel-FngC örneğine göre termal stabilitesinin daha az olduğu görülmüştür. Sıcaklığın 400 °C'ye ulaştığı durumda Fibgel-KFngC örneğinin %55'inin bozunduğu, Fibgel-FngC örneğinin ise %45'inin bozunduğu görülmüştür. Bu durum benzer şekilde Fibgel-KFngC örneğinin yapısında K vitaminin bulunmasından kaynaklanmaktadır. Fibgel-FngC örneğine ait TGA termogramı incelendiğinde diğer örneklerle ait TGA termogramlarından farklı olarak 200°C'de kütle kaybı olduğu görülmüştür. Bu sıcaklık fibrinojenin termal degradasyon sıcaklığı olup, örnekte ilk olarak fibrinojenin bozunmaya başladığını göstermektedir [109]. Bu durumun sebebi fibrinojenin mikrojel yüzeyini kaplamış olmasıdır ve bu nedenle fibrinojenin bozunma sıcaklığı ayrı olarak görülmektedir. Şekil 4.21'de verilmiş olan fibrinojenin termal degradasyon profili bu durumu desteklemektedir. Buna ek olarak Fibgel-FngC örneğinin kütle kaybının diğer tüm örneklerden daha az olduğu görülmüştür. Sıcaklığın 500°C'ye ulaştığı durumda örneğin %50'sinin bozunmadan kaldığı belirlenmiştir. Bu durum fibroin ile fibrinojen arasındaki konjugasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşmesiyle alakalı olup fibroin ile fibrinojen arasında meydana gelen kovalent çapraz bağlanmadan dolayı yapının daha kararlı bir hale ulaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu iki yapı arasında meydana gelen konjugasyon FTIR sonuçlarıyla da desteklenmiş olup, Fibgel-FngC örneğinin daha yüksek termal stabilite gösterdiği görülmüştür.

Fibgel ve HM-Fibgel örneklerine ait DSC termogramları birbirleriyle karşılaştırılmalı olarak Şekil 4.22'de verilmiştir. Termogramlarda 60°C civarında gözlenen ilk endotermik pik örneklerin su kaybını göstermiştir. Termogramlarda hafif şiddette görülen ikinci endotermik pik, fibroinin camsı geçiş sıcaklığını (T_g), şiddetli endotermik pik örneklerin degradasyon sıcaklığını ifade eden piktir [110]. Silik I konformasyonuna sahip HM-Fibgel örneği için camsı geçiş sıcaklığı 130°C'de, erimenin maksimum olduğu sıcaklık ise 270°C'de

gözlenmiştir. İkincil konformasyona sahip olan Fibgel örneğinin Tg değeri 175 °C’de, erimenin maksimum olduğu sıcaklık ise 300 °C’de gözlenmiştir. Fibgel örneğinin Tg değerinin daha yüksek olması ve HM-Fibgel örneğine göre daha yüksek termal bozunma sıcaklığına sahip olmasının sebebi kararlı silk II konformasyonuna sahip olmasıdır [56]. Bunun dışında Fibgel örneğine ait termogramda 275 °C’de görülen endotermik pik örneğin erime sıcaklığını (Tm) göstermiştir [65]. Fibgel örneğinde erime sıcaklığının gözlenmesi örneğin kristalin β -tabaka yapısında olduğunu göstermiş olup, bu durum FTIR sonuçlarıyla da uyumluluk göstermektedir.

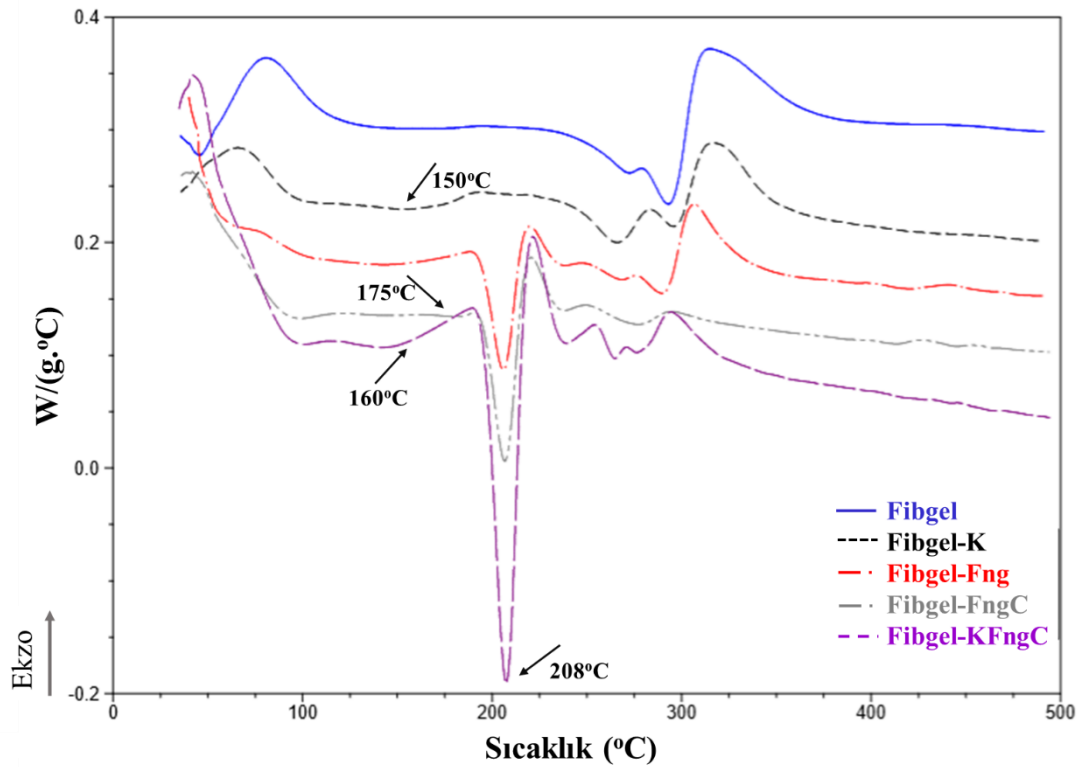


Şekil 4.22. HM-Fibgel ve Fibgel örneklerine ait DSC termogramları.



Şekil 4.23. Fibrinojen ve K vitamininin DSC termogramları.

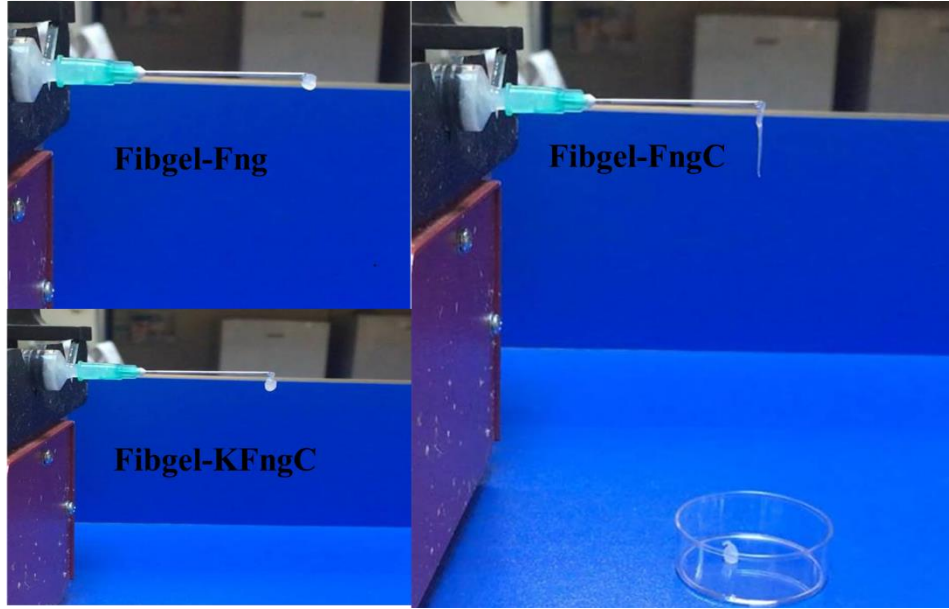
Yapıdaki fibrinojen ve K vitaminin mikrojellerin termal özellikleri üzerine olan etkisinin aydınlatılabilmesi amacıyla Fibrinojen ve K vitamininin DSC termogramları Şekil 4.23'te verilmiştir. Fibgel-K, Fibgel-Fng, Fibgel-FngC ve Fibgel-KFngC örneklerine ait DSC termogramları birbirleriyle karşılaştırmalı olarak Şekil 4.24'te verilmiştir. Fibgel-K örneğine ait termogramda Tg değerinin 150°C'de gözüktüğü belirlenmiştir. Fibgel-K örneğinin Tg değerinin Fibgel örneğine göre daha düşük gelmesinin nedeni ise yapıdaki K vitamininin hidrofobik doğası ve daha küçük bir molekül olması nedeniyle polimer zincirleri arasında plastikleştirici etkisinden kaynaklandığı ve buna bağlı olarak polimer zincirlerinde segmental bir hareketlilik yarattığı düşünülmektedir [84]. Yapısındaki K vitamininin etkisi sebebiyle erime 260 °C'de başlamıştır [111, 112]. Fibrinojen içeren mikrojellere ait termogramlar incelendiğinde termogramların birbirine benzerlik gösterdiği ve 208 °C'de şiddetli endotermik pik gözüktüğü belirlenmiştir. Bu pik, yapıdaki fibrinojenin termal bozunmasını ifade etmektedir [39, 113]. Fibgel-KFngC örneğine ait Tg değeri 160 °C'de gözlenirken, daha kararlı bir yapıya sahip olan Fibgel-FngC örneğine ait Tg değeri 175 °C'de gözlenmiştir. Sonuç olarak mikrojellerin termal davranışları incelendiğinde yapıya bağlı olarak farklılıklar gösterse de 37°C termal olarak kararlı oldukları gözlenmiştir.



Şekil 4.24. K vitamini ve fibrinojen içeren mikrojellerin DSC termogramları.

4.8. Mikrojellerin Enjekte Edilebilir Özellikleri

Bu çalışmada enjekte edilebilir hemostatik jellerin geliştirilmesi amaçlanmış olup, edilen mikrojellerin boyutları yaklaşık olarak 3 μm civarında olup, enjekte edilebilir boyutlardadır. Enjekte edilebilir formülasyon için kuru örnekler, farklı oranlarda % 5 (w/v)'lik CaCl_2 içeren PBS içinde dağıtılarak, uygun derişim 100 mg/mL PBS seçilmiştir. Bu derişimde hazırlanan mikrojellerin enjekte edilebilirliği akış hızı 200 $\mu\text{L}/\text{dk}$ olarak ayarlanmış şırınga pompası ile gözlenmiştir. Şırıngadan çıkan örneklerin direkt olarak petri kaplarına akmaları sağlanmış ve fiziksel formları izlenmiştir. Makroskopik olarak Fibgel ve Fibgel-K örneklerinin petri alanına yayıldığı, diğer jellere oranla daha düşük jelleşme kabiliyetlerinin olduğu gözlenmiştir. Fibrinojen içeren örneklerin ise enjektörün uzundan daha geç geçtiği ve petri yüzeyinde ise yayılmadan durduğu belirlenmiştir (Şekil 4.25).

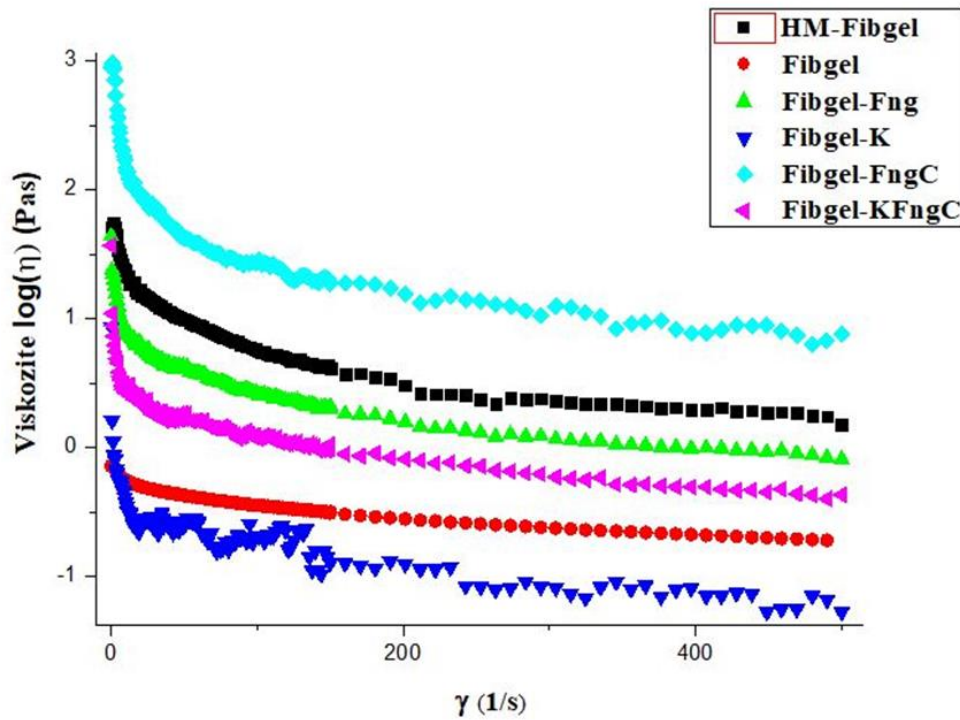


Şekil 4.25. Mikrojellerin jel davranışlarının makroskopik görüntüleri.

Mikrojellerin enjekte edilebilir özelliklerinin detaylı araştırılması için reolojik özellikleri incelenmiştir. Reolojik özellikler; koloidal süspansiyonlar, köpükler ve polimer sistemlerinin uygulanabilirliği açısından önemli bir yere sahiptir. Yumuşak malzemelerin dinamik reolojik özellikleri elastik katı bir malzeme ile viskoz bir sıvı arasında değişiklik gösteren viskoelastik davranışa benzerdir ve reolojik karakterizasyon ile bu viskoz-elastik özellikler ölçülebilmektedir [114].

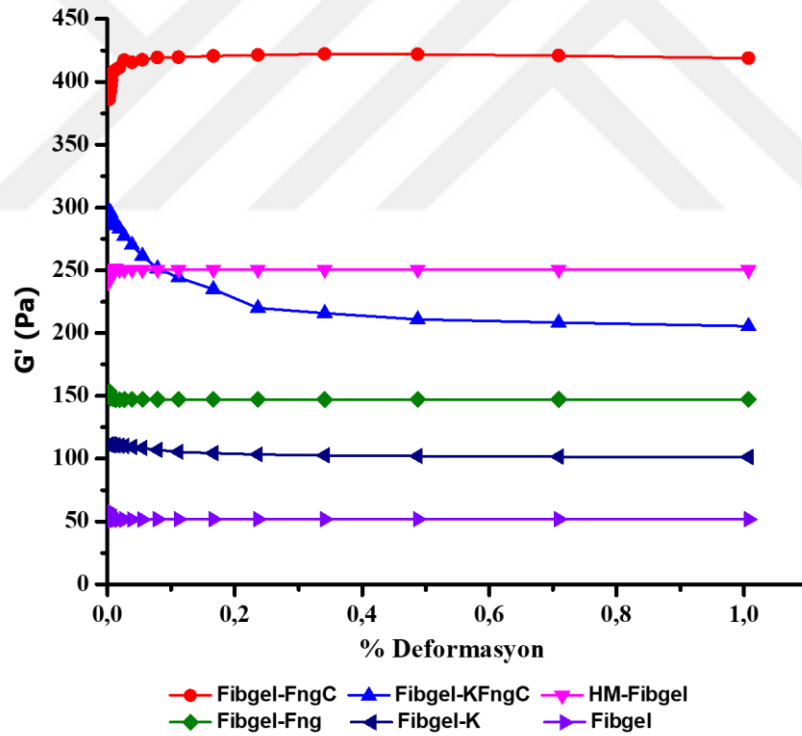
Reolojik özelliklerinin incelenmesi amacıyla 100 mg kurutulmuş fibroin mikrojellerin 1mL % 5 (w/v) CaCl_2 içeren PBS çözeltisi içerisinde dağıtılarak mikrojeller hazırlanmıştır. Jelleşme sonuçlarına göre Fibgel ve Fibgel-K örneklerinin akışkan özellik gösterdiği; tam olarak jel formuna ulaşmadığı belirlenmiştir. Reolojik karakterizasyonlarda temel olarak 3 nitelik bulunmaktadır. Bunlardan ilki örnek alanına uygulanan kuvvetin değeri olan gerilim, malzemenin deformasyonunu ifade eden gerinim ve gerilimin gerinime oranıdır. Gerilimin gerinime oranı katılar için elastik modülünü ifade ederken sıvılar için viskozite değerini ifade etmektedir [114]. Yapısında hem katı hem de sıvı özellik gösteren hidrojel ise gerinim karşısında viskoelastik davranış gösterirler. Bu davranışları sayesinde viskoz, elastik veya visko-elastik özellikleri incelenebilmektedir. Bu özellikler malzemenin sertlik-yumuşaklık özelliklerine göre değişiklik göstermektedir.

Öncelikle mikrojellerin viskozite ölçümleri yapılmıştır. Bu amaçla değişen kayma hızına bağlı olarak elde edilen viskozite değerlerinin örneklere göre değişimi incelenmiştir. Mikrojellerin viskozite değerleri Şekil 4.26'da verilmiştir. En yüksek viskoziteye sahip mikrojelleri Fibgel-FngC olarak belirlenirken, en düşük viskoziteye sahip örnek Fibgel-K olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.26. Mikrojellerin viskozite özellikleri.

G' ve G'' değerleri viskoelastik malzemelerin reolojik özelliklerini ifade eden önemli parametrelerdir. Depolama modülü olarak bilinen G' değeri malzemenin uygulanan deformasyona karşı geri kazanılabilir olan elastiklik özelliğini göstermektedir. Bu nedenle kayma elastik modülü olarak da tanımlanabilmektedir. Kayıp modülü olarak bilinen G'' değeri ise malzemenin geri kazanılamayan deformasyonu olan viskoz özelliğini ifade eder ve bu nedenle viskoz modülü olarak da isimlendirilmektedir [115]. Reolojik karakterizasyonda öncelikle tüm mikrojellerin viskoelastik bölgeleri belirlenmiştir. Bu amaçla mikrojellere gerinim taraması yapılarak mikrojellerin elastik modül değerinin (G'), artan deformasyon ile değişmediği bölge belirlenmiştir. Analizler $\gamma = \%0,0001 - \%0,01$ deformasyon aralığında gerçekleştirilmiş olup, mikrojellerin gerinim taraması eğrileri Şekil 4.27'de verilmiştir. Buna göre fibrinojen içeren örnekler için (Fibgel-FngC ve Fibgel-KFngC) deformasyon değeri $\%0,002$ olarak belirlenirken, diğer mikrojel örnekleri için deformasyon değeri $\%0,01$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.27. Mikrojellerin viskoelastik bölgeleri

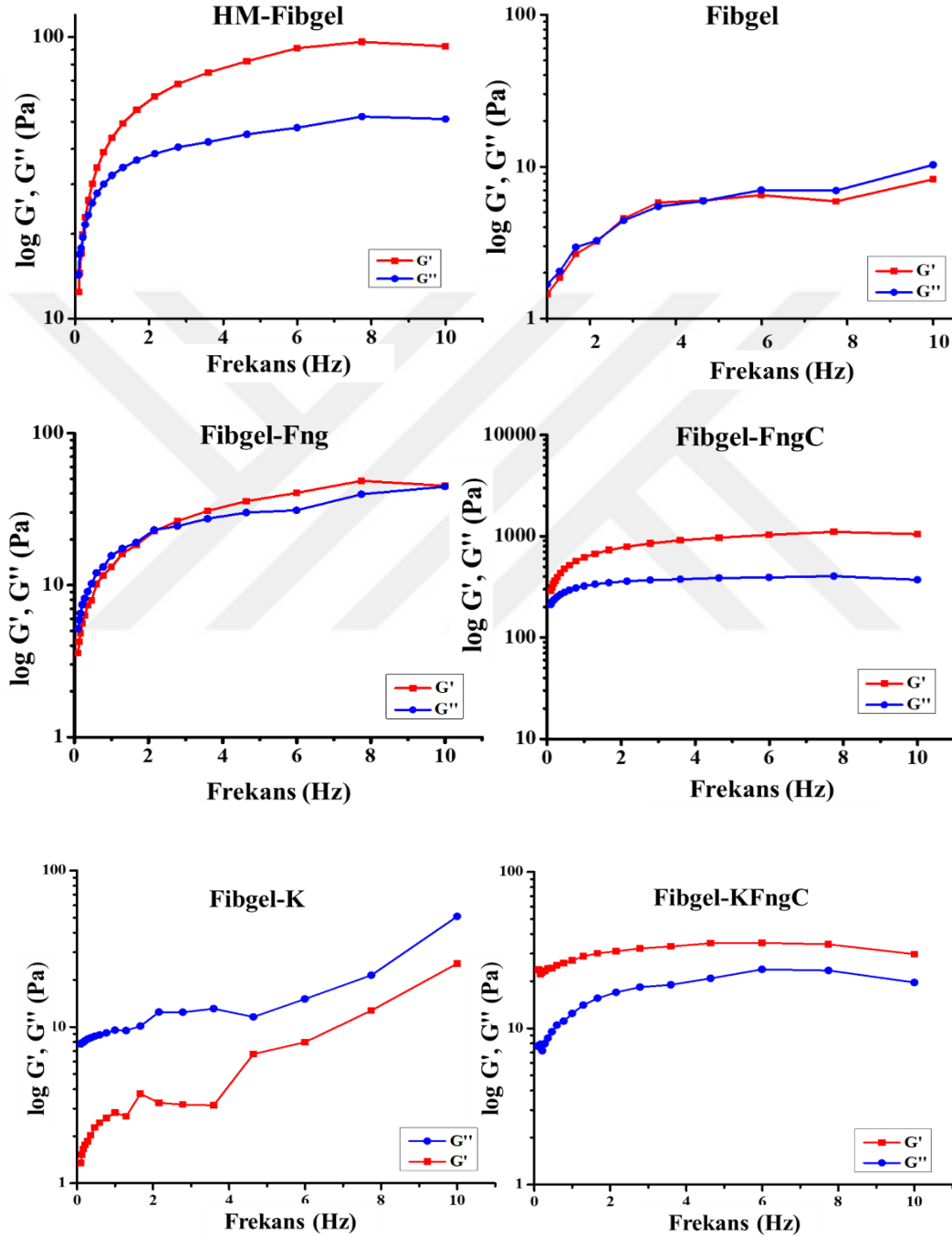
Doğrusal viskoelastik bölgelerin belirlenmesinden sonra mikrojellere frekans taraması uygulanmıştır. Frekans taraması yüksek frekans değerlerinden başlanarak düşük frekans değerlerine doğru olacak şekilde 10- 0,1 Hertz aralığında gerçekleştirilmiştir. Uygulanan frekans taraması sonucunda değişen frekansa göre değişen G' ve G'' değerleri her bir mikrojel örneği için Şekil 4.28'de verilmiştir.

Frekans taraması sonunda elde edilen G' ve G'' değerleri malzemenin elastik özelliğini ve viskoz özelliğini belirleyen önemli büyüklüklerdir. G' değerinin G'' değerinden büyük olması malzemenin elastik davranışının viskoz davranışına göre daha baskın olduğunu göstermekle birlikte malzemenin her aşamada jel davranışı gösterdiğini belirtmektedir [74]. G'' değerinin G' değerinden büyük olması ise malzemenin viskoz özelliğinin daha baskın olduğunu göstermektedir. Mikrojellerin visko-elastik davranışlarını ifade eden grafikler incelendiğinde HM-Fibgel örneğinin elastik davranışının baskın geldiği ve G' eğrisi ile G'' eğrisinin kesiştiği görülmektedir. G' eğrisi ile G'' eğrisinin kesiştiği frekans değeri viskoz ve elastik davranışların aynı anda gözlenebildiği sol-jel davranışını ifade etmektedir. Buna göre HM-Fibgel örneğinin % 0.464 frekans değerine ulaşmasıyla birlikte viskoz ve elastik davranışların aynı anda gözlemlendiği, malzemenin bu frekans değerinden itibaren viskoelastik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Fibgel mikrojeline ait grafik incelendiğinde ise viskoz davranışın elastik davranışa göre baskın geldiği, jelleşme davranışının olmadığı gözlenmiştir.

G' eğrisinin G'' eğrisinden daima yüksek olduğu diğer bir mikrojel örneği ise Fibgel-FngC örneğidir. Fibgel-FngC örneğine ait grafik incelendiğinde malzemenin elastik davranışının daha baskın olduğu ve % 0.1 frekans değerinden sonra viskoelastik davranış gösterdiği gözlenmiştir. Akma özelliğinin jelleşme özelliğinin önüne geçtiği çaprazlama noktasının görüldüğü örnek ise Fibgel-Fng örneğidir. Fibgel-Fng örneğine ait grafik incelendiğinde G' ve G'' eğrilerinin birbirine çok yakın olduğu, dolayısıyla malzemenin jel özelliği ile viskoz özelliğinin birbirine çok yakın olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle bu örneğin yüksek frekanslarda tamamen jel davranışına geçebileceği düşünülmektedir. Yin ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada kayma kuvvetinin artmasına bağlı olarak jelleşen fibroin yapısının tersinir sol-jel davranışı gösterdiği belirlenmiş olup, Fibgel-FngC ile Fibgel-Fng mikrojellerinin jelleşme davranışı ile uyum gösterdiği belirlenmiştir [116].

Fibgel-KFngC örneğinin reolojik davranışı incelendiğinde G' ve G'' eğrilerinin kesişmediği gözlenmiştir. Eğrilerin kesişmemesi sol-jel geçişinin gerçekleşemediğini göstermiştir. Bu örnekte elastik davranış viskoz davranıştan baskın gelmiş ve dolayısıyla jelleşme özelliğinin

varlığı kanıtlanmıştır. Fibgel-K örneğinde ise G'' değeri her frekans için G' değerinden daha yüksektir. Kayma geriliminin artması durumunda hem G' hem de G'' hızla artmış ancak jelleşme gerçekleşmemiştir.



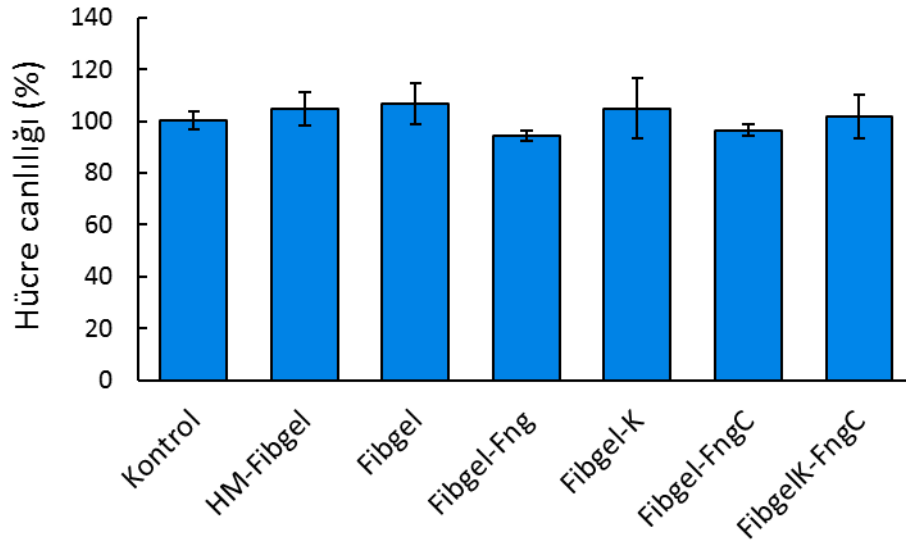
Şekil 4.28. Mikrojellerin viskoelastik davranışları.

Enjekte edilebilir jeller üzerine olan çalışmalar incelendiğinde, enjekte edilebilir yapının elde edilebilmesi açısından viskoz-elastik özelliklerin bir arada bulunmasının gerekliliği belirtilmiş olup; fibroinin konformasyonel geçişi sayesinde sol-jel özelliklerinin geliştiği vurgulanmıştır [60, 117].

Sonuç olarak fibrinojen yüklü örneklerin visko-elastik davranış gösterdikleri, kayma geriliminin artmasına bağlı olarak jelleşmenin artacağı öngörülmektedir. Ancak K vitamini içeren Fibgel-K örneğinin ve düşük molekül ağırlıklı Fibgel örneklerinin kayma geriliminin artması ile jelleşmenin artmayacağı gözlenmiştir. Fibgel-K örneğinde kayma hızının artmasına bağlı olarak gerçekleşen viskoz özellikteki artışın, jel özelliğindeki artıştan daha fazla gerçekleşmesinin sebebi yapısında bulunan K vitamininden ileri geldiği düşünülmektedir. Fibgel örneğinde ise jelleşme davranışının görülmemesinin nedeninin düşük molekül ağırlığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.10. Mikrojellerin Sitotoksitesi

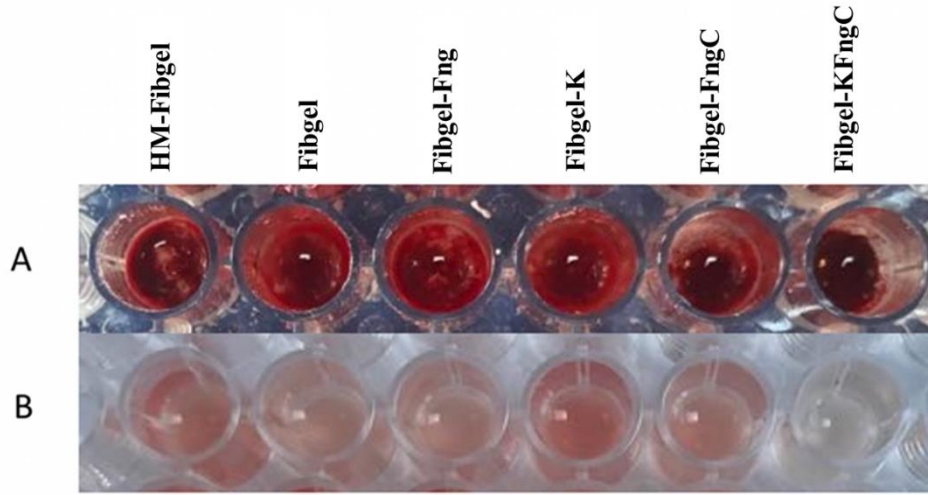
Geliştirilen mikrojellerin sitotoksik etkisi L929 fibroblast hücre hattı kullanılarak, MTT ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.29). Fibroblast hücrelerinin mikrojel yüzeylerine tutunduğu ve hazırlanan mikrojellerin hiçbirinin hücreler üzerinde toksik etkisinin olmadığı, hepsinin biyoyumlu olduğu belirlenmiştir. Bütün mikrojel örneklerde % hücre canlılığı yaklaşık olarak 100'dür. Bazı deney grupları için hücre canlılığında artış ya da azalış gözlenirse de istatistiki olarak gruplar arasında anlamlı bir değişim bulunmamaktadır ($p < 0.05$). İstatistiksel olmamakla birlikte birlikte mikrojellerin yapısındaki K vitamini ve fibrinojenin hücre canlılığını az da olsa arttırdığı görülmüştür. Önemli hayati fonksiyonları ve kan koagülasyonu üzerinde önemli role sahip olan K vitaminin yumuşak doku oluşumunda hücre canlılığını ve hücre proliferasyonunu arttırdığı bilinmektedir [118]. Fibrinojenin hücre proliferasyonu üzerine olan etkisine bakıldığı literatür çalışmaları incelendiğinde, kanama durumundaki aktif rolü ile bilinen fibrinojen proteinlerinin spesifik bağlanma noktalarından çeşitli büyüme faktörlerine bağlanarak yara iyileşme sürecinde hücre proliferasyonunu arttırdığı belirlenmiştir [119]. Ancak bu çalışmada hücre canlılığı 24 saat verileri olduğu için fibrinojen içeren mikrojellerde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Sonuç olarak fibroin mikrojeller doğal yapıda oldukları için hücre üzerine hiçbir toksik etkileri olmadıkları gibi fibroin ve fibrinojenin hücre tutunmasında ve uzun dönem hücre proliferasyonunda etkili olacakları, bu nedenle mikrojellerin yara iyileşmesi üzerine de olumlu etkilerinin olacağı düşünülmektedir.



Şekil 4.29. Hemostatik mikrojellerin L929 hücre canlılığına etkisi.

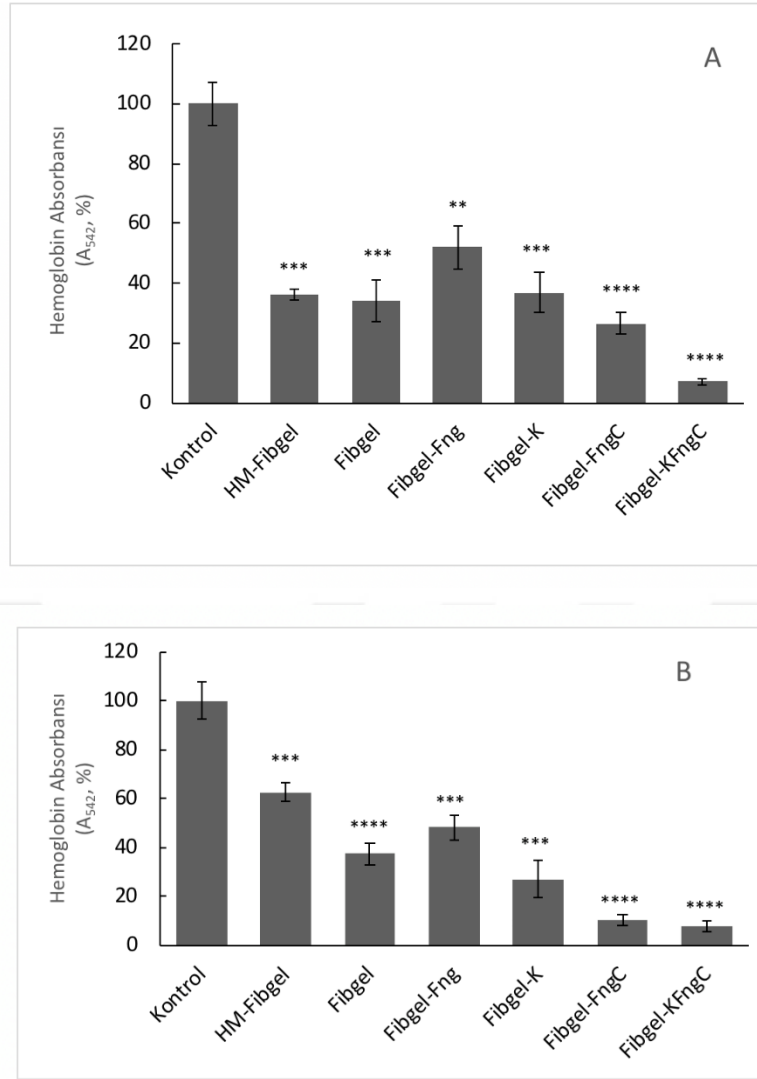
4.11. Fibroin Mikrojellerin Hemostatik Etkileri

Geliştirilen mikrojellerin hemostatik etkileri tam kan pıhtılaşma testi ile değerlendirilmiş ve makroskopik görüntüleri Şekil 4.30'da verilmiştir. *In vitro* tam kan pıhtılaşması testinde absorbans değerinin kontrole oranla düşük olması yıkama çözeltisinde (fosfat tamponu) süspanse olan eritrosit miktarının az; pıhtılaşma sürecine katılan eritrosit miktarının da dolaylı olarak çok olduğunu yansıtmaktadır. Kontrolle kıyaslandığında örneklerin tamamı (HM-Fibgel, Fibgel, Fibgel-Fng, Fibgel-K, Fibgel-FngC, Fibgel-K-FngC) için okunan hemoglobin absorbans değeri (%) istatistiksel olarak anlamlı şekilde kontrol değerinin altındadır (Şekil 4.31). Bu sonuç, örneklerin tamamının değişen oranlarda pıhtılaşmayı artırıcı yönde etkisi olduğunu göstermektedir. Hemostatik ajan içermeyen fibroin mikrojeller (HM-Fibgel ve Fibgel) kontrolle kıyaslandığında pıhtılaşma sürecini istatistiksel olarak anlamlı hızlandırdığı izlenmiştir. Bununla birlikte düşük molekül ağırlıklı fibroin mikrojellerin absorbans değerinin % 40 oranında, yüksek molekül ağırlıklı fibroin mikrojellerin absorbans değerinin % 60 oranında olduğu görülmektedir. Bu sonuç düşük molekül ağırlığına sahip fibroinin hemostatik özelliğinin diğerine göre daha fazla olduğunu göstermekle birlikte bu sonuç literatürle de paralellik göstermektedir [1]. Bunun nedeni ise fibroinin doğal protein yapısı gereği kan hücre ve bileşenlerinin tutunabileceği bir zemin sağlamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.30 *In vitro* tam kan pıhtılaşma testi. A) Mikrojellerin yüzeyinde pıhtı oluşumunu, B) yıkama çözeltisinde (fosfat tamponu) süspanse olan eritrositlerin görüntüleri.

Mikrojeller arasında 120 s gibi kısa bir inkübasyon sürecinde en etkin pıhtılaşmanın ise K vitamini içeren ve yüzeyi fibrinojen ile konjuge edilmiş olan Fibgel-KFngC örneklerinde olduğu gözlenmiştir. Bu örnek yüzeye konjuge halde yalnızca fibrinojen içeren Fibgel-FngC örneğinden daha etkin olduğundan yüzeye konjuge edilen hem K vitamininin hem de fibrinojenin pıhtılaşma sürecini hızlandırma açısından sinerjik etkisi nedeniyle olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte fibrinojenin fibroin yapısı içine yüklenmesi ile pıhtılaşma sürecinin hızlandırılması açısından etkinlik kaybına yol açmıştır. Fibgel-Fng ile Fibgel-FngC kıyaslandığında ise fibrinojenin yüzeye konjuge edilmesinin pıhtılaşmayı hızlandırmak açısından daha etkin olduğu söylenebilir. Bu durum inkübasyon süresinin kısa tutulmuş olması ile açıklanabilir. Yüzeyde konjuge halde bulunan fibrinojen hâlihazırda kan ile temas yüzeyinde yer aldığından etkisini kısa sürede gösterebilmektedir. Buna karşın güçlü fibroin yapısında bulunan fibrinojenin etkisi gösterebilmesi için fibroinin yapısındaki sıkı çapraz bağlardan sıyrılarak temas yüzeyindeki kanla etkileşime girmesi daha uzun zaman gerektirmektedir.



Şekil 4.31 *In vitro* tam kan pıhtılaşma testi. A) % Hemoglobin (Antikoagulan içermeyen kan), B) % Hemoglobin (Sitratlı kan ile yürütülen), (Kontrolle kıyasla **** P<0.0001, *** P<0.0005, **P<0.001).

Bu sonuçlar geliştirilen fibroin ve hemostatik mikrojellerin hepsinin kan pıhtılaşmasında önemli rol oynadıklarını göstermektedir. Ancak hemostatik performanslarının daha detaylı değerlendirmesi ve yara iyileşmesindeki etkilerinin değerlendirmesi için *in vivo* deneylere ihtiyaç vardır. Bu nedenle fibroin jellerin *in vivo* hemostatik etkinliği ve yara iyileşme üzerine etkileri, siklofosfamid ile indüklenen hemorajik sistitisli sıçan modelinde değerlendirmesi planlanmıştır.

SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında fibroin esaslı doğal protein yapısında, K vitamini ve fibrinojen içeren enjekte edilebilir hemostatik mikro jellerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. İpek kozalarından serisinin uzaklaştırılmasıyla elde edilen fibroin proteininden kimyasal ve enzimatik yöntemler kullanılarak molekül ağırlığı 9.3-43.5 kDa arasında değişen fibroin proteinleri elde edilmiştir. Molekül ağırlığı bu aralıkta değişen fibroinlerden faz ayrımı yöntemi ile mikrojeller sentezlenerek, en iyi monodispersiteye sahip olan mikrojel örneklerin içine K vitamini ve fibrinojen yüklenerek hemostatik mikrojeller hazırlanmıştır. Hemostatik ajan oranı K vitamini için %1 (v/v), fibrinojen için %3 (w/v) olarak optimize edilmiş ve bunun değerlerin üzerindeki hemostatik ajanların eklenmesinin mikroküre yapısının deforme ettiği belirlenmiştir. Aynı zamanda mikrojellerin kan yüzeyi ile direkt temas edeceği göz önüne alınarak, etkin bir hemostatik ajan olan fibrinojen, fibroin mikrojellerin yüzeyine konjuge edilerek temas anında ilk hemostatik etkinin sağlanması amaçlanmıştır.

Mikrojel örneklerinin kararlı Silk II (β -kristalin) konformasyonda oldukları belirlenmiştir. Termal analiz sonuçlarına göre Fibgel-FngC örneğinin en yüksek termal kararlılığa sahip mikrojel olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebinin fibrinojenin mikrojel yüzeyine konjuge olmasıyla yapıyı daha kararlı hale getirmesi olduğu düşünülmektedir. Mikrojellerin reolojik davranışları incelendiğinde hemostatik mikrojeller arasında en yüksek sol-gel davranışı sergileyen örneğin fibrinojen konjuge örnekler (Fibgel-FngC) olduğu gözlenmiştir ve bu visko-elastik davranış mikrojellerin enjekte edilebilir olduğunu kanıtlamıştır.

Kan koagülasyon test sonuçlarına göre tüm mikrojellerin değişen oranlarda 60 s'de hemostatik etki gösterdiği ancak K vitamini yüklü ve fibrinojen konjuge jellerin en yüksek hemostatik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Geliştirilen tüm mikrojellerin hiçbir toksik etki göstermediği ve protein yapısında olmalarından dolayı hücrelerin çok iyi tutunduğu ve hatta hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak hazırlanan mikrojellerin fibroin esaslı doğal protein yapısı nedeniyle de yara iyileşmesini hızlandıracağı düşünülmektedir. Ayrıca enjekte edilebilir formu nedeniyle yara bölgesinin şeklini kolay alması, mikrojel ağ yapısı nedeniyle cilt hareketlerinden kaynaklanan strese karşı koyabilmesi, biyoyapışkan, termal kararlılık ve iyi hasta kabulü gibi özellikleri nedeniyle mevcut hemostatik yara örtülerine göre daha avantajlı olması beklenmektedir. İleriki dönemlerde planlanan *in vivo* çalışmalar hemostatik mikrojellerin kanamayı durdurucu etkisini ve yara iyileşmesindeki rolünü daha iyi kanıtlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] C. Lei, H. Zhu, J. Li, X. Feng, and J. Chen, "Preparation and hemostatic property of low molecular weight silk fibroin," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 27, no. 5, pp. 403-418, **2016**.
- [2] V. J. Cornelius, N. Majcen, M. J. Snowden, J. C. Mitchell, and B. Vancina, "Preparation of SMART wound dressings based on colloidal microgels and textile fibres," *Smart Materials IV*, vol. 6413, p. 64130X, **2006**.
- [3] J. Hu, K. Hiwatashi, T. Kurokawa, S. M. Liang, Z. L. Wu, and J. P. Gong, "Microgel-reinforced hydrogel films with high mechanical strength and their visible mesoscale fracture structure," *Macromolecules*, vol. 44, no. 19, pp. 7775-7781, **2011**.
- [4] D. Davalos and K. Akassoglou, "Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease," *Seminars in Immunopathology*, , vol. 34, no. 1, pp. 43-62, **2012**.
- [5] M. Franchini and P. M. Mannucci, "Adjunct agents for bleeding," *Current Opinion in Hematology*, vol. 21, no. 6, pp. 503-508, **2014**.
- [6] A. Bratek-Skicki, P. Żeliszewska, and J. M. Ruso, "Fibrinogen: a journey into biotechnology," *Soft Matter*, vol. 12, no. 42, pp. 8639-8653, **2016**.
- [7] A. H. Teuschl, J. Zipperle, C. Huber- Gries, and D. L. Kaplan, "Silk fibroin based carrier system for delivery of fibrinogen and thrombin as coagulant supplements," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 105, no. 3, pp. 687-696, **2017**.
- [8] G. E. Gilbert, B. C. Furie, and B. Furie, "Binding of human factor VIII to phospholipid vesicles," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 2, pp. 815-822, **1990**.
- [9] A. J. Gale, "Continuing education course# 2: current understanding of hemostasis," *Toxicologic Pathology*, vol. 39, no. 1, pp. 273-280, **2011**.
- [10] F. di Lena, "Hemostatic polymers: the concept, state of the art and perspectives," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 2, no. 23, pp. 3567-3577, **2014**.
- [11] S. Pourshahrestani, E. Zeimaran, I. Djordjevic, N. A. Kadri, and M. R. Towler, "Inorganic hemostats: The state-of-the-art and recent advances," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 58, pp. 1255-1268, **2016**.
- [12] K. C. Dee, D. A. Puleo, and R. Bizios, *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*. John Wiley & Sons, **2003**.
- [13] D. Williams, "Tissue-biomaterial interactions," *Journal of Materials Science*, vol. 22, no. 10, pp. 3421-3445, **1987**.
- [14] A. De Mel, B. G. Cousins, and A. M. Seifalian, "Surface modification of biomaterials: a quest for blood compatibility," *International Journal of Biomaterials*, vol. 2012, **2012**.
- [15] H. T. Peng, "Thromboelastographic study of biomaterials," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 94, no. 2, pp. 469-485, **2010**.
- [16] A. Taubert, J. F. Mano, and J. C. Rodríguez-Cabello, *Biomaterials Surface Science*. John Wiley & Sons, **2013**.
- [17] H. Khoshmohabat, S. Paydar, H. M. Kazemi, and B. Dalfardi, "Overview of agents used for emergency hemostasis," *Trauma Monthly*, vol. 21, no. 1, **2016**.

- [18] P. Agrawal, S. Soni, G. Mittal, and A. Bhatnagar, "Role of polymeric biomaterials as wound healing agents," *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, vol. 13, no. 3, pp. 180-190, **2014**.
- [19] J. Barnard and R. Millner, "A review of topical hemostatic agents for use in cardiac surgery," *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 88, no. 4, pp. 1377-1383, **2009**.
- [20] S. Mohan, O. S. Oluwafemi, N. Kalarikkal, S. Thomas, and S. P. Songca, "Biopolymers—Application in Nanoscience and Nanotechnology," in *Recent Advances in Biopolymers: InTech*, **2016**.
- [21] J. Totre, D. Ickowicz, and A. J. Domb, "Properties and hemostatic application of gelatin," *Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development*, pp. 91-109, **2011**.
- [22] S. Coseri, "Cellulose: To depolymerize... or not to?," *Biotechnology Advances*, vol. 35, no. 2, pp. 251-266, **2017**.
- [23] F. Cheng *et al.*, "Antibacterial and hemostatic composite gauze of N, O-carboxymethyl chitosan/oxidized regenerated cellulose," *RSC Advances*, vol. 6, no. 97, pp. 94429-94436, **2016**.
- [24] G. Recinos, K. Inaba, J. Dubose, D. Demetriades, and P. Rhee, "Local and systemic hemostatics in trauma: a review," *Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi*, vol. 14, no. 3, p. 175, **2008**.
- [25] D. Kulig, A. Zimoch-Korzycka, A. Jarmoluk, and K. Marycz, "Study on alginate–chitosan complex formed with different polymers ratio," *Polymers*, vol. 8, no. 5, p. 167, **2016**.
- [26] X. Huang *et al.*, "Using absorbable chitosan hemostatic sponges as a promising surgical dressing," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 75, pp. 322-329, **2015**.
- [27] L. W. Chan, C. H. Kim, X. Wang, S. H. Pun, N. J. White, and T. H. Kim, "PolySTAT-modified chitosan gauzes for improved hemostasis in external hemorrhage," *Acta Biomaterialia*, vol. 31, pp. 178-185, **2016**.
- [28] B. L. Bennett, "Bleeding Control Using Hemostatic Dressings: Lessons Learned," *Wilderness & Environmental Medicine*, vol. 28, no. 2, pp. S39-S49, **2017**.
- [29] M. A. Aziz *et al.*, "In vitro biocompatibility and cellular interactions of a chitosan/dextran- based hydrogel for postsurgical adhesion prevention," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 103, no. 2, pp. 332-341, **2015**.
- [30] S. Salatin and M. Jelvehgari, "Natural Polysaccharide based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery," *Pharmaceutical Sciences*, vol. 23, pp. 84-94, **2017**.
- [31] C. Yan, T. Yang, S. Zhu, and H. Wu, "Synthesis and properties of poly (DEX-GMA/AAc) microgel particle as a hemostatic agent," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 5, no. 20, pp. 3697-3705, **2017**.
- [32] B. Balakrishnan, D. Soman, U. Payanam, A. Laurent, D. Labarre, and A. Jayakrishnan, "A novel injectable tissue adhesive based on oxidized dextran and chitosan," *Acta Biomaterialia*, vol. 53, pp. 343-354, **2017**.

- [33] A. M. Behrens, M. J. Sikorski, and P. Kofinas, "Hemostatic strategies for traumatic and surgical bleeding," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 102, no. 11, pp. 4182-4194, **2014**.
- [34] L. Liu *et al.*, "Something between the amazing functions and various morphologies of self-assembling peptides materials in the medical field," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 25, no. 13, pp. 1331-1345, **2014**.
- [35] S. Komatsu, Y. Nagai, K. Naruse, and Y. Kimata, "The neutral self-assembling peptide hydrogel SPG-178 as a topical hemostatic agent," *PloS One*, vol. 9, no. 7, p. e102778, **2014**.
- [36] W. Nie, X. Yuan, J. Zhao, Y. Zhou, and H. Bao, "Rapidly in situ forming chitosan/ ϵ -polylysine hydrogels for adhesive sealants and hemostatic materials," *Carbohydrate Polymers*, vol. 96, no. 1, pp. 342-348, **2013**.
- [37] J. H. Levy, I. Welsby, and L. T. Goodnough, "Fibrinogen as a therapeutic target for bleeding: a review of critical levels and replacement therapy," *Transfusion*, vol. 54, no. 5, pp. 1389-1405, **2014**.
- [38] H. Schöchl, C. J. Schlimp, and M. Maegle, "Tranexamic acid, fibrinogen concentrate, and prothrombin complex concentrate: data to support prehospital use?," *Shock*, vol. 41, pp. 44-46, **2014**.
- [39] A. K. Turkmen, S. Cavalu, and G. Goller, "Development of Chitosan-Hydroxyapatite-Fibrinogen 3D Scaffolds For Bone Tissue Regeneration," *Journal of The Australian Ceramic Society Volume*, vol. 52, no. 1, pp. 34-41, **2016**.
- [40] B. Blombäck and M. Blombäck, "The molecular structure of fibrinogen," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 202, no. 1, pp. 77-97, **1972**.
- [41] J. H. Levy, F. Szlam, K. A. Tanaka, and R. M. Sniecinski, "Fibrinogen and hemostasis: a primary hemostatic target for the management of acquired bleeding," *Anesthesia & Analgesia*, vol. 114, no. 2, pp. 261-274, **2012**.
- [42] M. D. Palm and J. S. Altman, "Topical hemostatic agents: a review," *Dermatologic Surgery*, vol. 34, no. 4, pp. 431-445, **2008**.
- [43] D. Das, P. Ghosh, S. Dhara, A. B. Panda, and S. Pal, "Dextrin and poly (acrylic acid)-based biodegradable, non-cytotoxic, chemically cross-linked hydrogel for sustained release of ornidazole and ciprofloxacin," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 7, no. 8, pp. 4791-4803, **2015**.
- [44] T. Ito, M. Eriguchi, and Y. Koyama, "Bioabsorbable bioadhesive hydrogel comprising poly (acrylic acid) and poly (vinylpyrrolidone) for adhesion barrier and hemostatic device," *MRS Communications*, vol. 5, no. 2, pp. 291-295, **2015**.
- [45] Y. Chen *et al.*, "Preparation of porous carboxymethyl chitosan grafted poly (acrylic acid) superabsorbent by solvent precipitation and its application as a hemostatic wound dressing," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 63, pp. 18-29, **2016**.
- [46] A. Aksoy, "Synthesis and Surface Modification Studies of Biomedical Polyurethanes to Improve Long-term Biocompatibility," *Orta Doğu Teknik Üniversitesi FBE*, **2008**.
- [47] F. I. Broekema, W. van Oeveren, J. Zuidema, S. H. Visscher, and R. R. Bos, "In vitro analysis of polyurethane foam as a topical hemostatic agent," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 22, no. 4, pp. 1081-1086, **2011**.

- [48] J. G. Lundin, C. L. McGann, G. C. Daniels, B. C. Streifel, and J. H. Wynne, "Hemostatic kaolin-polyurethane foam composites for multifunctional wound dressing applications," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 79, pp. 702-709, **2017**.
- [49] M. Khalid, T. A. Ahmed, O. A. Ahmed, K. M. Hosny, and F. I. Abd-Allah, "Self-Nanoemulsifying lyophilized tablets for flash oral transmucosal delivery of vitamin K: development and clinical evaluation," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 106, no. 9, pp. 2447-2456, **2017**.
- [50] B. M. Aljaeid and K. M. Hosny, "Fabrication and evaluation of Phytomenadione as a nanostructure lipid carrier for enhancement of bioavailability," *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 23, no. 4, pp. 382-386, **2018**.
- [51] B. Joseph and S. J. Raj, "Therapeutic applications and properties of silk proteins from *Bombyx mori*," *Frontiers in Life Science*, vol. 6, no. 3-4, pp. 55-60, **2012**.
- [52] C. Vepari and D. L. Kaplan, "Silk as a biomaterial," *Progress in Polymer Science*, vol. 32, no. 8-9, pp. 991-1007, **2007**.
- [53] Z. Zhao, Y. Li, and M.-B. Xie, "Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, no. 3, pp. 4880-4903, **2015**.
- [54] T.-T. Cao and Y.-Q. Zhang, "Processing and characterization of silk sericin from *Bombyx mori* and its application in biomaterials and biomedicines," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 61, pp. 940-952, **2016**.
- [55] Y.-Q. Zhang, "Applications of natural silk protein sericin in biomaterials," *Biotechnology Advances*, vol. 20, no. 2, pp. 91-100, **2002**.
- [56] S. K. Samal, M. Dash, F. Chiellini, D. L. Kaplan, and E. Chiellini, "Silk microgels formed by proteolytic enzyme activity," *Acta Biomaterialia*, vol. 9, no. 9, pp. 8192-8199, **2013**.
- [57] R. Fraser, *Conformation in Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides*. Elsevier, Melbourne, **2012**.
- [58] J. F. C. Mayen, A. Lupan, C. Cosar, A.-Z. Kun, and R. Silaghi-Dumitrescu, "On the roles of the alanine and serine in the β -sheet structure of fibroin," *Biophysical Chemistry*, vol. 197, pp. 10-17, **2015**.
- [59] R. I. Kunz, R. M. C. Brancalhão, L. d. F. C. Ribeiro, and M. R. M. Natali, "Silkworm sericin: Properties and biomedical applications," *BioMed Research International*, vol. 2016, **2016**.
- [60] S. Kapoor and S. C. Kundu, "Silk protein-based hydrogels: promising advanced materials for biomedical applications," *Acta Biomaterialia*, vol. 31, pp. 17-32, **2016**.
- [61] J. Melke, S. Midha, S. Ghosh, K. Ito, and S. Hofmann, "Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering," *Acta Biomaterialia*, vol. 31, pp. 1-16, **2016**.
- [62] J. H. Park, J. Jang, J.-S. Lee, and D.-W. Cho, "Current advances in three-dimensional tissue/organ printing," *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 13, no. 6, pp. 612-621, **2016**.
- [63] K. Jastrzebska, K. Kucharczyk, A. Florczak, E. Dondajewska, A. Mackiewicz, and H. Dams-Kozłowska, "Silk as an innovative biomaterial for cancer therapy," *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, vol. 20, no. 2, pp. 87-98, **2015**.

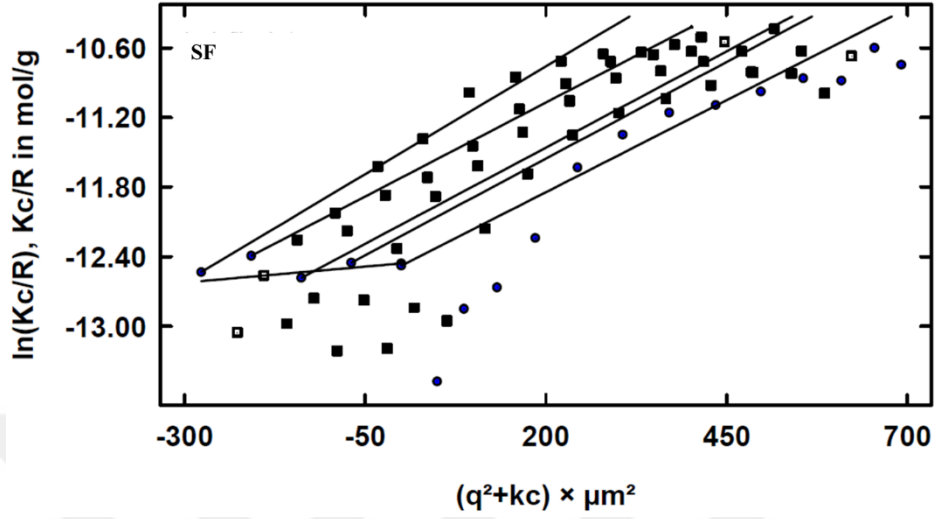
- [64] L.-D. Koh *et al.*, "Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials," *Progress in Polymer Science*, vol. 46, pp. 86-110, **2015**.
- [65] S. Calamak, E. A. Aksoy, C. Erdogan, M. Sagiroglu, and K. Ulubayram, "Silver nanoparticle containing silk fibroin bionanotextiles," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 17, no. 2, p. 87, **2015**.
- [66] Y. Maghdouri-White, G. L. Bowlin, C. A. Lemmon, and D. Dréau, "Bioengineered silk scaffolds in 3D tissue modeling with focus on mammary tissues," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 59, pp. 1168-1180, **2016**.
- [67] B. Zhu *et al.*, "Silk fibroin for flexible electronic devices," *Advanced Materials*, vol. 28, no. 22, pp. 4250-4265, **2016**.
- [68] M. S. Zafar and K. H. Al-Samadani, "Potential use of natural silk for bio-dental applications," *Journal of Taibah University Medical Sciences*, vol. 9, no. 3, pp. 171-177, **2014**.
- [69] F. M. Elahi, G. Guan, and L. Wang, "HEMOCOMPATIBILITY OF SURFACE MODIFIED SILK FIBROIN MATERIALS: A REVIEW," *Reviews on Advanced Materials Science*, vol. 38, no. 2, **2014**.
- [70] J. Wang, W. Hu, Q. Liu, and S. Zhang, "Dual-functional composite with anticoagulant and antibacterial properties based on heparinized silk fibroin and chitosan," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 85, no. 2, pp. 241-247, **2011**.
- [71] X. Hu *et al.*, "Biomaterials from ultrasonication-induced silk fibroin– hyaluronic acid hydrogels," *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 11, pp. 3178-3188, **2010**.
- [72] S. Ryu, H. Kim, Y. Park, C.-C. Lin, I. Um, and C. Ki, "Dual mode gelation behavior of silk fibroin microgel embedded poly (ethylene glycol) hydrogels," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 4, no. 26, pp. 4574-4584, **2016**.
- [73] Q. Lu *et al.*, "Silk fibroin electrogelation mechanisms," *Acta Biomaterialia*, vol. 7, no. 6, pp. 2394-2400, **2011**.
- [74] A. P. Tabatabai, D. L. Kaplan, and D. L. Blair, "Rheology of reconstituted silk fibroin protein gels: the epitome of extreme mechanics," *Soft Materials*, vol. 11, no. 4, pp. 756-761, **2015**.
- [75] H. Kawaguchi, "Thermoresponsive microhydrogels: preparation, properties and applications," *Polymer International*, vol. 63, no. 6, pp. 925-932, **2014**.
- [76] Z. Karahaliloğlu, M. Demirbilek, İ. Ulusoy, B. Gümüşkaya, and E. Baki Denkbaş, "Hemostatic activities of nano/microporous bilayer dressings in a femoral artery bleeding rat model," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 133, no. 28, **2016**.
- [77] A. C. Lima, C. Alvarez- Lorenzo, and J. F. Mano, "Design advances in particulate systems for biomedical applications," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 5, no. 14, pp. 1687-1723, **2016**.
- [78] H. Yue and G. Ma, "Polymeric micro/nanoparticles: Particle design and potential vaccine delivery applications," *Vaccine*, vol. 33, no. 44, pp. 5927-5936, **2015**.
- [79] A. Gholami, H. Tavanai, and A. Moradi, "Production of fibroin nanopowder through electrospraying," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 13, no. 5, pp. 2089-2098, **2011**.

- [80] J. Qu, Y. Liu, Y. Yu, J. Li, J. Luo, and M. Li, "Silk fibroin nanoparticles prepared by electrospray as controlled release carriers of cisplatin," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 44, pp. 166-174, **2014**.
- [81] Y.-Q. Zhang, W.-D. Shen, R.-L. Xiang, L.-J. Zhuge, W.-J. Gao, and W.-B. Wang, "Formation of silk fibroin nanoparticles in water-miscible organic solvent and their characterization," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 9, no. 5, pp. 885-900, **2007**.
- [82] Y. Srisuwan, P. Srihanam, and Y. Baimark, "Preparation of silk fibroin microspheres and its application to protein adsorption," *Journal of Macromolecular Science®, Part A: Pure and Applied Chemistry*, vol. 46, no. 5, pp. 521-525, **2009**.
- [83] S. K. Nitta and K. Numata, "Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 1, pp. 1629-1654, **2013**.
- [84] X. Wang, T. Yucel, Q. Lu, X. Hu, and D. L. Kaplan, "Silk nanospheres and microspheres from silk/pva blend films for drug delivery," *Biomaterials*, vol. 31, no. 6, pp. 1025-1035, **2010**.
- [85] S. Yu *et al.*, "Floxuridine-loaded silk fibroin nanospheres," *RSC Advances*, vol. 4, no. 35, pp. 18171-18177, **2014**.
- [86] Z. Zhao *et al.*, "Generation of silk fibroin nanoparticles via solution-enhanced dispersion by supercritical CO₂," *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 52, no. 10, pp. 3752-3761, **2013**.
- [87] D. N. Breslauer, S. J. Muller, and L. P. Lee, "Generation of monodisperse silk microspheres prepared with microfluidics," *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 3, pp. 643-647, **2010**.
- [88] V. Gupta, A. Aseh, C. N. Ríos, B. B. Aggarwal, and A. B. Mathur, "Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 4, p. 115, **2009**.
- [89] S. Çalamak, C. Erdoğan, M. Özalp, and K. Ulubayram, "Silk fibroin based antibacterial bionanotextiles as wound dressing materials," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 43, pp. 11-20, **2014**.
- [90] M. Saçak, "*Polimer Kimyasına Giriş*," Ankara Üniversitesi Yayınları, Yayın, no. 50, **1998**.
- [91] S.-Y. Ong, J. Wu, S. M. Moochhala, M.-H. Tan, and J. Lu, "Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties," *Biomaterials*, vol. 29, no. 32, pp. 4323-4332, **2008**.
- [92] P. Sudheesh Kumar *et al.*, "Flexible and microporous chitosan hydrogel/nano ZnO composite bandages for wound dressing: in vitro and in vivo evaluation," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 4, no. 5, pp. 2618-2629, **2012**.
- [93] L. S. Wray *et al.*, "Effect of processing on silk- based biomaterials: Reproducibility and biocompatibility," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 99, no. 1, pp. 89-101, **2011**.
- [94] H. Kim *et al.*, "Effect of silk fibroin molecular weight on physical property of silk hydrogel," *Polymer*, vol. 90, pp. 26-33, **2016**.

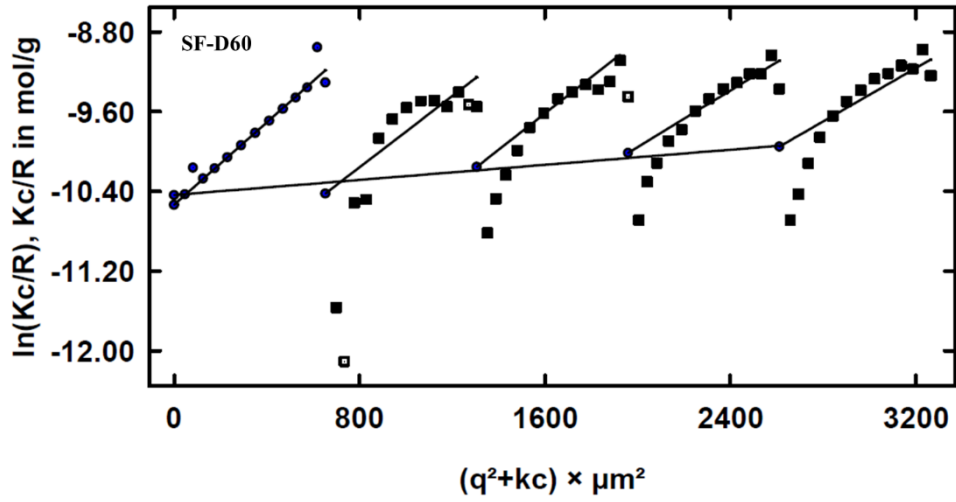
- [95] J. A. Kluge, B. T. Kahn, J. E. Brown, F. G. Omenetto, and D. L. Kaplan, "Optimizing molecular weight of lyophilized silk as a shelf-stable source material," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 2, no. 4, pp. 595-605, **2016**.
- [96] E. M. Pritchard, X. Hu, V. Finley, C. K. Kuo, and D. L. Kaplan, "Effect of silk protein processing on drug delivery from silk films," *Macromolecular Bioscience*, vol. 13, no. 3, pp. 311-320, **2013**.
- [97] F. Mottaghitalab, M. Farokhi, M. A. Shokrgozar, F. Atyabi, and H. Hosseinkhani, "Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system," *Journal of Controlled Release*, vol. 206, pp. 161-176, **2015**.
- [98] J. Brown, C.-L. Lu, J. Coburn, and D. L. Kaplan, "Impact of silk biomaterial structure on proteolysis," *Acta Biomaterialia*, vol. 11, pp. 212-221, **2015**.
- [99] M. Li, M. Ogiso, and N. Minoura, "Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets," *Biomaterials*, vol. 24, no. 2, pp. 357-365, **2003**.
- [100] H. Han *et al.*, "Silk Biomaterials with Vascularization Capacity," *Advanced Functional Materials*, vol. 26, no. 3, pp. 421-432, **2016**.
- [101] C. M. Srivastava, R. Purwar, R. Kannaujia, and D. Sharma, "Flexible silk fibroin films for wound dressing," *Fibers and Polymers*, vol. 16, no. 5, pp. 1020-1030, **2015**.
- [102] E. A. Aksoy, U. A. Sezer, F. Kara, and N. Hasirci, "Heparin/chitosan/alginate complex scaffolds as wound dressings: Characterization and antibacterial study against staphylococcus epidermidis," *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, vol. 5, no. 2, pp. 104-113, **2015**.
- [103] Y. Xu *et al.*, "Structure and properties of silk fibroin grafted carboxylic cotton fabric via amide covalent modification," *Carbohydrate Polymers*, vol. 161, pp. 99-108, **2017**.
- [104] S. Wang, Y. Zhang, H. Wang, and Z. Dong, "Preparation, characterization and biocompatibility of electrospinning heparin-modified silk fibroin nanofibers," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 48, no. 2, pp. 345-353, **2011**.
- [105] E. Wenk, H. P. Merkle, and L. Meinel, "Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications," *Journal of Controlled Release*, vol. 150, no. 2, pp. 128-141, **2011**.
- [106] C.-H. Liu, C.-T. Wu, and J.-Y. Fang, "Characterization and formulation optimization of solid lipid nanoparticles in vitamin K1 delivery," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 36, no. 7, pp. 751-761, **2010**.
- [107] A. Motta, L. Fambri, and C. Migliaresi, "Regenerated silk fibroin films: thermal and dynamic mechanical analysis," *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 203, no. 10- 11, pp. 1658-1665, **2002**.
- [108] T. Rajangam, H.-j. Paik, and S. S. A. An, "Development of fibrinogen microspheres as a biodegradable carrier for tissue engineering," *BioChip Journal*, vol. 5, no. 2, p. 175, **2011**.
- [109] N. S. Rejinold, M. Muthunarayanan, N. Deepa, K. Chennazhi, S. Nair, and R. Jayakumar, "Development of novel fibrinogen nanoparticles by two-step co-acervation method," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 47, no. 1, pp. 37-43, **2010**.

- [110] P. Cebe, B. P. Partlow, D. L. Kaplan, A. Wurm, E. Zhuravlev, and C. Schick, "Silk I and Silk II studied by fast scanning calorimetry," *Acta Biomaterialia*, vol. 55, pp. 323-332, **2017**.
- [111] V. Vikram, M. Ramesh, and S. Prapulla, "Thermal degradation kinetics of nutrients in orange juice heated by electromagnetic and conventional methods," *Journal of Food Engineering*, vol. 69, no. 1, pp. 31-40, **2005**.
- [112] M. N. Riaz, M. Asif, and R. Ali, "Stability of vitamins during extrusion," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 49, no. 4, pp. 361-368, **2009**.
- [113] Y. Chen, H. Mao, X. Zhang, Y. Gong, and N. Zhao, "Thermal conformational changes of bovine fibrinogen by differential scanning calorimetry and circular dichroism," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 26, no. 2-3, pp. 129-134, **1999**.
- [114] D. WEITZ, H. WYSS, and R. LARSEN, "Oscillatory rheology: Measuring the viscoelastic behaviour of soft materials," *GIT Laboratory Journal Europe*, vol. 11, no. 3-4, pp. 68-70, **2007**.
- [115] D. T. Chen, Q. Wen, P. A. Janmey, J. C. Crocker, and A. G. Yodh, "Rheology of soft materials," *Annual Reviews*, 311-321, **2010**.
- [116] Z. Yin, F. Wu, T. Xing, V. K. Yadavalli, S. C. Kundu, and S. Lu, "A silk fibroin hydrogel with reversible sol–gel transition," *RSC Advances*, vol. 7, no. 39, pp. 24085-24096, **2017**.
- [117] J. Hu *et al.*, "Injectable silk fibroin/polyurethane composite hydrogel for nucleus pulposus replacement," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 23, no. 3, pp. 711-722, **2012**.
- [118] S. B. Rønning, M. E. Pedersen, R. S. Berg, B. Kirkhus, and R. Rødbotten, "Vitamin K2 improves proliferation and migration of bovine skeletal muscle cells in vitro," *PloS One*, vol. 13, no. 4, p. e0195432, **2018**.
- [119] M. M. Martino, P. S. Briquez, A. Ranga, M. P. Lutolf, and J. A. Hubbell, "Heparin-binding domain of fibrin (ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, no. 12, pp. 4563-4568, **2013**.

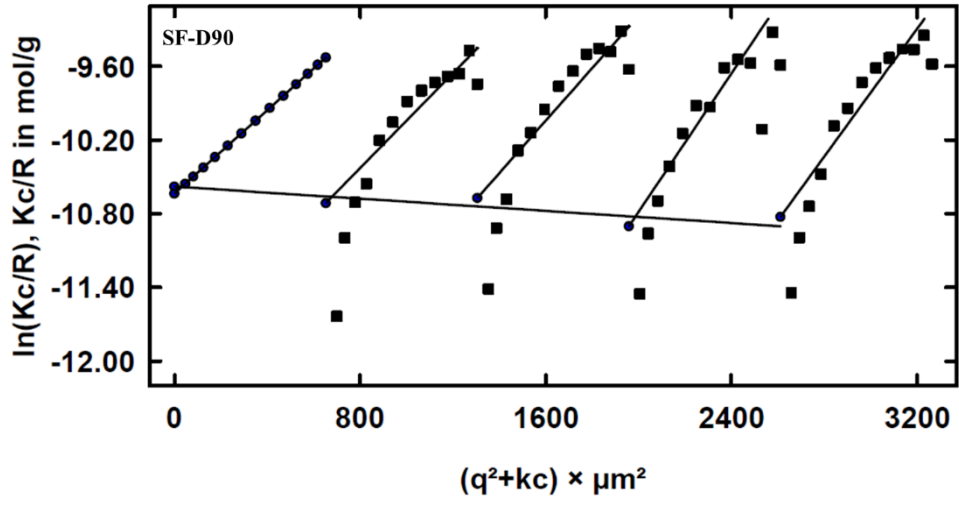
EKLER



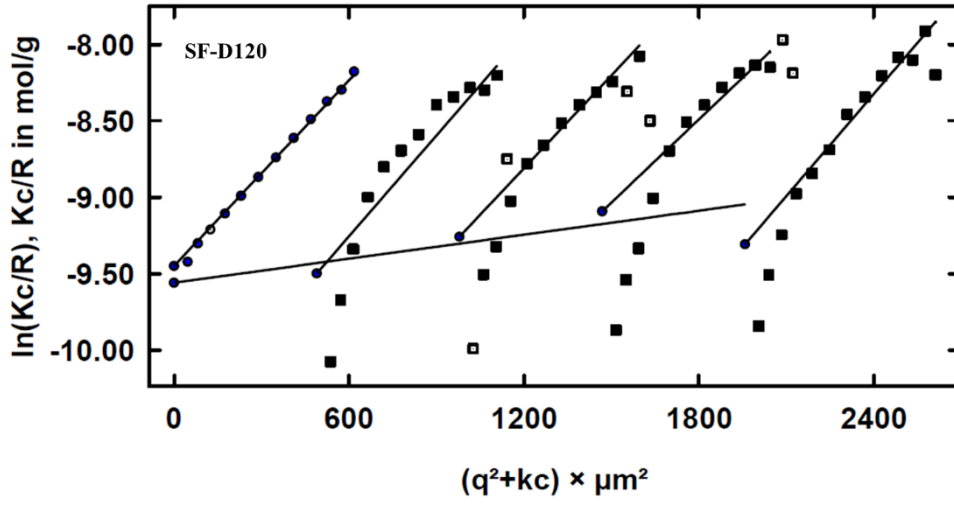
Şekil 4.32. Molekül ağırlığının azaltılması için herhangi bir işlem uygulanmamış fibroine ait Guiner eğrisi



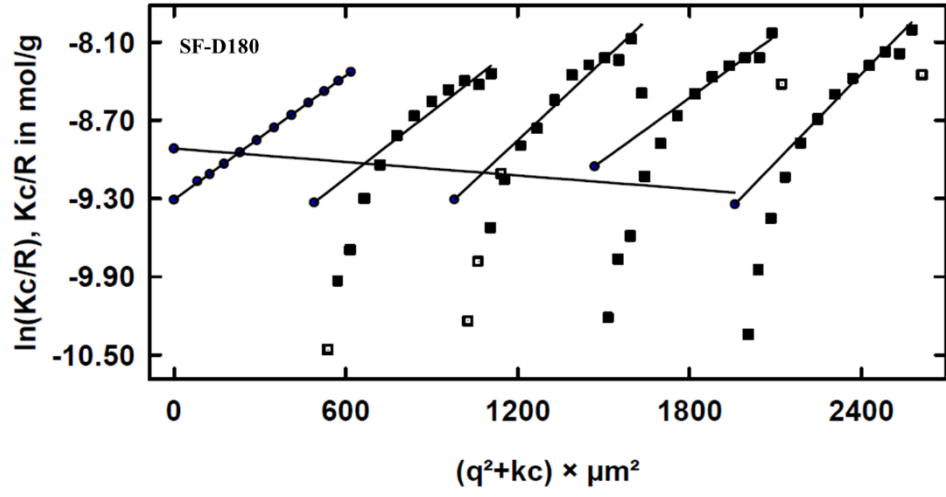
Şekil 4.33. 60 dakika hidroliz edilerek molekül ağırlığı azaltılmış olan fibroine ait Guiner eğrisi



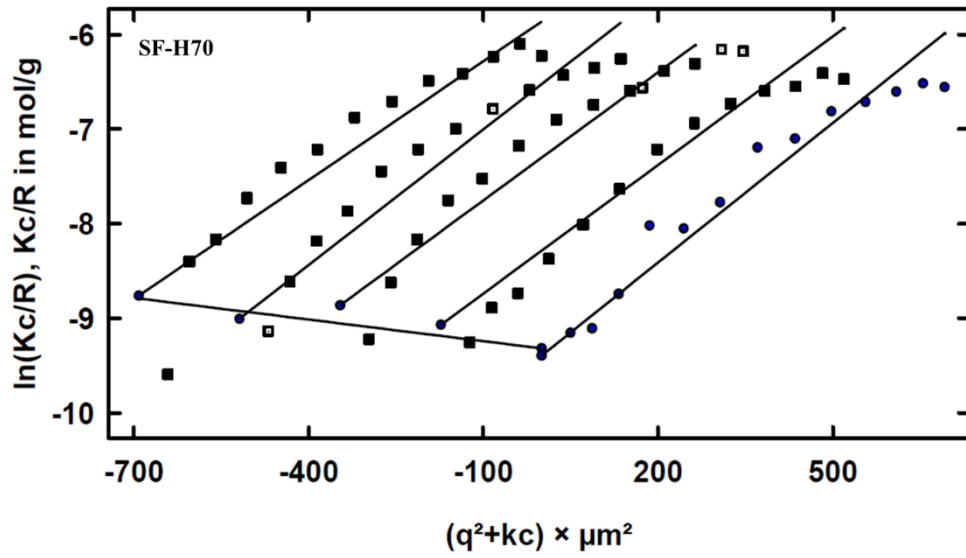
Şekil 4.34. 90 dakika hidroliz edilerek molekül ağırlığı azaltılmış olan fibroine ait Guiner eğrisi



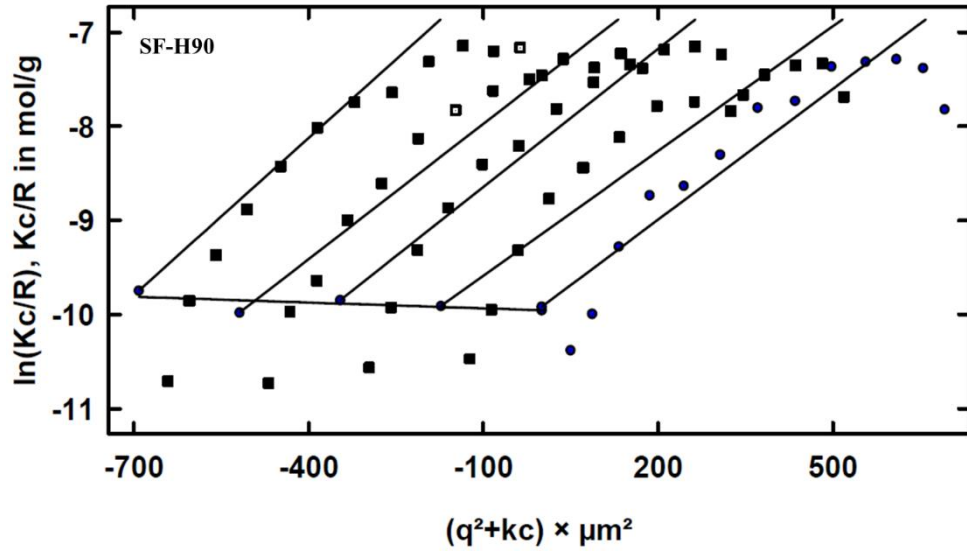
Şekil 4.35. 120 dakika hidroliz edilerek elde edilen fibroine ait Guiner eğrisi



Şekil 4.36. 180dakika hidroliz edilerek elde edilen ipek fibroine ait Guiner eğrisi



Şekil 4.37. 70 °C’ de hidtoliz edilerek hazırlanan ipek fibroine ait Guiner eğrisi



Şekil 4.38. 90 °C’ de hidroliz edilerek hazırlanan fibroine ait Guiner Eğrisi

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı Gülseher Manap
Doğum Yeri Adana
Medeni Hali Bekar
E-posta gulseher.manap10@hacettepe.edu.tr
Adresi Hacettepe Üniversitesi Polimer Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı
Beytepe/ Ankara

Eğitim

Lise Özel Çukurova Bilfen Koleji Anadolu Lisesi (2006-2010)
Lisans Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi / Kimya Bölümü (2010-2015)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce- İleri düzeyde
Almanca- Orta düzeyde

İş Deneyimi

2013 Staj / Eksoy Kimya, Adana (30 iş günü)
2018 - Vilsan Veteriner İlaçları, Merck & Co, Ankara

Deneyim Alanları

Biyomalzemeler, Biyopolimerler, Polimer karakterizasyonu

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi: Fibroin Mikrojel Bazlı Biyoaktif Hemostatik Yara Örtülerinin Geliştirilmesi (H.Ü. BAB-2017-devam ediyor)

Tezden Üretilmiş Yayınlar: -

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/ veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar: -



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

.....Polimer Bilimi ve Teknolojisi.... ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: .../.../.....

Tez Başlığı / ~~Konusu~~:Enjekte Edilebilir Hemostatik Fibroin Mikrojellerin Geliştirilmesi.....

Yukarıda başlığı/~~konusu~~ gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam ...92... sayfalık kısmına ilişkin, ...05.../...06.../2018.. tarihinde ~~şahsım~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %3. 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~dâhil~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

27.06.2018
Gülseher
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Gülseher MANAP

Öğrenci No: N14323054

Anabilim Dalı: Polimer Bilimi ve Teknolojisi

Programı: Polimer Bilimi ve Teknolojisi- Tezli Yüksek Lisans

Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Kerem Ulubayram
(Unvan, Ad Soyad, İmza)