

YARA ÖRTÜSÜ OLARAK İPEK BAZLI ANTİBAKTERİYEL BİYONANOTEKSTİLLERİN ÜRETİMİ

PRODUCTION OF SILK BASED ANTIBACTERIAL BIONANOTEXTILE AS WOUND DRESSING

SEMİH ÇALAMAK

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2012

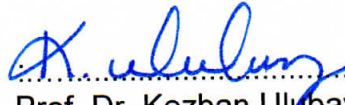
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

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

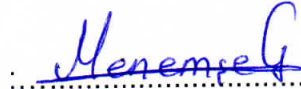
Başkan


.....
Prof. Dr. S. Ali Tuncel

Üye (Danışman)


.....
Prof. Dr. Kezban Ulubayram

Üye


.....
Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu

Üye


.....
Doç. Dr. Meral Özalp

Üye


.....
Doç. Dr. Eylem Güven

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma Sevin Düz
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YARA ÖRTÜSÜ OLARAK İPEK BAZLI ANTİBAKTERİYEL BİYONANOTEKSTİLLERİN ÜRETİMİ

Semih ÇALAMAK

ÖZ

Bombyx mori kozalarından elde edilen ipek fibroin, iyi derecede biyouyumluluk, geçirgenlik, biyobozunum, minumum inflamatuvar reaksiyon, morfolojik elastikiyet ve mekanik özellikleri içine alan üstün özellikleri ile biyomedikal uygulamalarda kullanılan önemli bir polimerdir.

Bu tez çalışmasında yara örtüsü olarak ipek fibroin bazlı antibakteriyel biyonanotekstillerin üretimi amaçlanmıştır. Biyonanotekstillere antibakteriyel aktivite kazandırmak amacıyla ipek fibroine Ag nanopartiküller (%0.5 ve %1 w/v) veya polietilenimin (PEI, 10, 20 ve % 30 (w/v)) katılmış ve nanofiberler elektroegirme yöntemi ile üretilmiştir. Bunlara ek olarak sülfatlanmış fibroin nanofiberler de üretilmiştir. Düzgün ve homojen morfolojide fibroin bazlı nanofiberler elde edebilmek için akış hızı, uygulanan voltaj ve polimer derişimi gibi temel sistem parametreleri optimize edilmiştir. Sulu ortamda kararlı nanofiberler elde etmek için glutaraldehit buharı ve metanol muamelesi olmak üzere iki farklı yöntem uygulanmıştır. Çapları 33 ile 332 nm arasında değişen düzgün ve homojen morfoloji gösteren ipek bazlı nanofiberler, taramalı elektron mikroskopu (SEM) Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi, Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC), Termogravimetrik analiz (TGA) ile karakterize edilmiştir. Sitotoksite değerlendirilmesi MTT testi ile yapılmıştır. İndirekt sitotoksite sonuçları, bütün fibroin ve PEI/Fibroin nanofiber ekstraktlarının L929 hücre hattına toksik olmadığını göstermiştir. Ancak Ag nanopartikül içeren nanofiberler (Ag/Fibroin-G) güçlü sitotoksite göstermiştir. Ayrıca antibakteriyel aktiviteleri gram (+) *Staphylococcus aureus* ve gram (-) *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı değerlendirilmiş, PEI/Fibroin biyonanotekstillerin, Ag nanopartikül içeren biyonanotekstiller kadar antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar PEI/Fibroin biyonanotekstillerin, yara iyileşmesi uygulamaları için umut vaadeden bir malzeme adayı olabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: biyonanotekstiller, antibakteriyel nanofiberler, ipek fibroin, PEI, sülfatlanmış ipek fibroin

Danışman: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı ve Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

PRODUCTION OF SILK BASED ANTIBACTERIAL BIONANOTEXTILE

AS WOUND DRESSING

Semih ÇALAMAK

ABSTRACT

Silk fibroin from the cocoon of *Bombyx mori*, is one of the candidate materials which offer unique properties including good biocompatibility, permeability, biodegradability, morphologic flexibility and mechanical properties to be used as a biomaterial.

In this thesis, it was aimed to fabricate silk fibroin based antibacterial bionanotextiles serving as wound dressings. To achieve antibacterial activity, Ag nanoparticles (0.5 % and 1 % w/v) or polyethylenimine (PEI, 10, 20 and 30 % (w/v)) were added silk fibroin and composite nanofibers were successfully fabricated by electrospinning. In addition, sulfated fibroin nanofibers were also produced. In order to obtain fibroin based nanofibers with a smooth and uniform morphology, we systematically optimized the key processing parameters such as flow rate, applied voltage, and polymer concentration. Two different methods including methanol and glutaraldehyde vapor treatment were employed to obtain water stable nanofibers. The prepared fibroin based nanofibers in the range between 33 to 332 nm with a smooth and uniform morphology were characterized using scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, Differential scanning calorimetry (DSC), Thermogravimetric Analysis (TGA). Cytotoxicity evaluation was performed with L929 fibroblasts by MTT assay. The indirect cytotoxicity results demonstrate that all Fibroin and PEI/Fibroin extracts have no cytotoxicity to cancer cell line L929. However, Ag nanoparticles containing nanofibers (Ag/Fibroin-G) showed strong cytotoxicity against L929. Further, antibacterial activities against gram (+) *Staphylococcus aureus* and gram (-) *Pseudomonas aeruginosa* were evaluated and results suggested PEI/Fibroin bionanotextiles showed strong antibacterial activity as much as Ag nanoparticles containing bionanotextile. These results suggested that PEI/Fibroin composite bionanotextile could be a promising candidate for wound healing applications.

Key words: bionanotextiles, antibacterial nanofibers, electrospinning, silk fibroin, PEI, sulfated silk fibroin

Advisor: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM, Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Basic Pharmaceutical Sciences and Department of Nanotechnology and Nanomedicine

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince önümde yeni ufuklar açan, araştırmalarımın her aşamasında bilgi ve önerilerini esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar sosyal ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM'a,

Tez çalışmam boyunca bilimsel ve deneysel desteklerini esirgemeyen sayın hocam Dr. Yeliz TUNÇ SARISÖZEN'e,

Antimikrobiyal test çalışmalarındaki yardımları için sayın hocam Doç. Dr. Meral ÖZALP'e ve Ceren ÖZKUL'a,

Desteği ve gülüyüzü için saygıdeğer hocam Doç. Dr. Nezire SAYGILI'ya,

Yüzey analizlerindeki yardımları için Başak Beyhan GÜDÜLLÜOĞLU'na,

Laboratuvar çalışmalarında yardımını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Cem BAYRAM ve Merve GÜLTEKİNOĞLU'na,

Tez çalışmam boyunca bana hep destek olan Elif SARIGÖL'e,

Hayatımın her anında yanımda olan, gerek akademik, gerekse sosyal hayatta bilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili ağabeyim Melih ÇALAMAK'a,

Varlıklarından ve sevgilerinden her zaman güç aldığım, ne olursa olsun her an yanımda olan, duyduğum minneti ifade edebilecek kelime bulamadığım Anne ve Babam'a,

Teşekkür ederim.

Annem Selma & Babam Yaşar'a

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Biyomalzeme Olarak İpek	3
2.1.1. İpek fibroin filmler	9
2.1.2. İpek fibroin hidrojel	10
2.1.3. İpek fibroin süngerler.....	11
2.1.4. İpek fibroin nanofiberler.....	12
2.1.5. İpek fibroin bazlı biyomalzemelerin bozunması	13
2.1.6. Yüzey modifikasyonları	14
2.2. Yara İyileşmesi.....	15
2.2.1. Yara iyileşme basamakları	16
2.2.2. Yara örtüleri	18
2.2.2.1. Pasif yara örtüleri	19
2.2.2.2. İnteraktif yara örtüleri	19
2.2.2.3. Biyoaktif yara örtüleri.....	20
2.2.2.4. Antimikrobiyal yara örtüleri	21
2.2.2.5. Yara iyileşmesinde kullanılan bazı polimerler.....	23
2.3. Elektroeğirme Yöntemi.....	26
2.3.1. Elektroeğirme yönteminin tarihçesi.....	26
2.3.2. Elektroeğirme sisteminin özellikleri.....	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal	30
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Elektroeğirme sisteminin kurulması	31
3.2.2. Nanofiberlerin üretimi	32
3.2.2.1. İpek fibroin sulu çözeltisinin hazırlanması	32
3.2.2.2. İpek fibroin süngerlerin hazırlanması	33
3.2.2.3. İpek fibroin süngerlerin sülfatlanması	33
3.2.2.4. Fibroin nanofiberlerin üretimi.....	34
3.2.2.5. Ag/Fibroin kompozit nanofiberlerin üretimi	34
3.2.2.6. PEI/Fibroin kompozit nanofiberlerin üretimi.....	35
3.2.2.7. Sülfatlanmış fibroin nanofiberlerin üretimi	36
3.2.3. Nanofiberlerin sulu ortamda kararlı hale geçirilmesi.....	36
3.2.3.1. Nanofiberlere glutaraldehit buharı muamelesi	36
3.2.3.2. Nanofiberlere metanol muamelesi.....	36
3.2.4. Nanofiberlerin karakterizasyonu	37
3.2.4.1. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi	37
3.2.4.2. Fourier transform infrared (FT-IR) analizi.....	37
3.2.4.3. Termal analizler	37

3.2.4.3.1.	Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi	37
3.2.4.3.2.	Termogravimetrik analiz (TGA).....	37
3.2.5.	Yüzey özellikleri	37
3.2.6.	Sitotoksosite testleri	37
3.2.7.	Antibakteriyel aktivite testi	39
3.2.7.1.	Bakteri hazırlanması	39
3.2.7.2.	Antibakteriyel aktivite	39
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	40
4.1.	Nanofiberlerin Üretimi	40
4.1.1.	Fibroin nanofiberler	40
4.1.2.	Ag/Fibroin nanofiberler	42
4.1.3.	PEI/Fibroin kompozit nanofiberler	44
4.1.4.	Sülfatlanmış fibroin nanofiberler	46
4.2.	Nanofiberlerin Sulu Ortamda Kararlı Hale Geçirilmesi	47
4.2.1.	Nanofiberlerin glutaraldehit ile çapraz bağlanması	48
4.2.2.	Metanol muamelesi	56
4.3.	Biyonanotekstillere Yapısal Özellikleri	58
4.4.	Biyonanotekstillere Termal Davranışları	63
4.4.1.	Termogravimetrik analiz (TGA)	63
4.4.2.	Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) sonuçları	67
4.5.	Biyonanotekstillere Yüzey Özellikleri	71
4.6.	Biyonanotekstillere Sitotoksosite Test Sonuçları	73
4.7.	Biyonanotekstillere Mikrobiyolojik Aktiviteleri	74
4.8.	Biyonanotekstillere Sitotoksosite ve Antibakteriyel Etkilerinin Karşılaştırılması	79
5.	SONUÇLAR	80
	KAYNAKLAR.....	83
	ÖZGEÇMİŞ	90

SİMGELER VE KISALTMALAR

AATCC	American Association of Textile Chemist and Colorist
AgNO ₃	Gümüş nitrat
ATCC	American Type Culture Collection
Ala	Alanin aminoasiti
BMP	Kemik Morfojenik Proteini
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CVD	Kimyasal Buhar Çöktürme
DMEM	Dulbecco'nun minimum esansiyel besiyeri
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
ECM	Ekstraselüler matriks
EGF	Endotel Büyüme Faktörü
EtOH	Etil alkol
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
HA	Hidroksiapatit
HCl	Hidroklorik asit
GA	Glutaraldehit
Gly	Glisin aminoasiti
kDa	kiloDalton
Kv	kiloVolt
MHB	Mueller Hinton Besiyeri
mL	mililitre
MMPs	Metalloproteinazlar
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromit

NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	nanometre
PAF	Trombosit Aktivasyon Faktörü
PDGF	Trombosit Tabanlı Büyüme Faktörü
PEG	poli(etilen glikol)
PEI	poli(etilen imin)
PEO	poli(etilen oksit)
PGA	poli(glikolik asit)
PLA	poli(laktik asit)
PLGA	poli(laktik-ko-glikolik asit)
PVA	poli(vinil alkol)
RGD	Arjinin-Glisin-Aspartik asit peptit dizisi
RES	Retiküloendotelyal Sistem
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
Ser	Serin aminoasiti
TEM	Geçirmeli Elektron Mikroskopu
TGA	Termogravimetrik Analiz
TSA	Triptik Soy Agar
UV	Ultraviyole ışık
µm	mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 İpek böceği kozası ve larvası (Bursa Koza Birlik)	4
Şekil 2.2 A) Doğal ipek fiberler, B) Serisin proteini uzaklaştırılmış fiberler, C) Doğal ipek fiberlerin şematik gösterimi	5
Şekil 2.3 İpek fibroinin çoğunlukla tekrar eden amino asit dizisi.....	5
Şekil 2.4 Fibroinin silk II (β -kristalin) yapısı.....	7
Şekil 2.5 İpek fibroin bazlı biyomalzemelerin üretim şeması	8
Şekil 2.6 Derinin yapısı.....	16
Şekil 2.7 Yara iyileşme basamakları a) Hemostazis ve inflamasyon (kılcal damarların artması, nötrofil ve fibroblast hücrelerinin yara bölgesine nüfuz etmesi), b) Epitel hücrelerinin yara bölgesine invazyonu, c) Epitel hücrelerinin yarayı tamamen kaplaması, d) Yaranın erken evresinde ortaya çıkan kılcal damarların ve fibroblast hücrelerinin yara bölgesinden uzaklaşması	18
Şekil 2.8 Yara örtüsü malzemeleri; a) gauze, b) tül, c) poliüretan membran, d) poliüretan köpük, e) hidrojel, f) hidrokolloid, g) aljinat, h) kollajen, i) hidrofiber. 21	
Şekil 2.9 Polietileniminin yapısı (a) Düz zincir PEI, (b) Dallanmış PEI	25
Şekil 2.10 Taylor konisi oluşumu.....	27
Şekil 2.11 Elektroeğirme sistemi	29
Şekil 3.1 Elektroeğirme sistemi; A) Düz plaka toplayıcı, B) Döner silindir toplayıcı	32
Şekil 3.2 İpek fibroin sulu çözeltisi	33
Şekil 3.3 İpek fibroin süngerler.....	33
Şekil 3.4 Kültür edilen L929 fibroblast hücrelerinin ışık mikroskobu (Leica, Germany) görüntüsü	38
Şekil 4.1 Fibroin nanofiberler; A) % 8 (w/v) Fibroin (Skala bar 1 μ m), B) %8 (w/v) Fibroin (Skala bar 10 μ m), C) %13 (w/v) Fibroin (Skala bar 1 μ m), D) %13 (w/v) Fibroin (Skala bar 5 μ m).....	41
Şekil 4.2 Fibroin nanofiberlerin EDAX sonuçları	41
Şekil 4.3 Ag/Fibroin nanofiberler; A) ve B) % 0.5 (w/v) Ag/Fibroin, C) ve D) %1 (w/v) Ag/Fibroin, (A) ve (C) skala bar 1 μ m, (B) ve (D) skala bar 5 μ m.....	42
Şekil 4.4 Ag/Fibroin nanofiber yüzeyindeki Ag nanopartiküller (% 1 w/v);.....	43
Şekil 4.5 Ag/Fibroin nanofiberlerin EDAX sonuçları	44

Şekil 4.6 PEI/Fibroin nanofiberler; A ve B) PEI(10)/Fibroin, C ve D) PEI(20)/Fibroin, E ve F) PEI (30)/Fibroin. (A, C ve E'de skala bar 1µm, B, D ve F'de skala bar 5 µm).....	45
Şekil 4.7 Sülfatlanmış Fibroin nanofiberlerin EDAX sonuçları	46
Şekil 4.8 Sülfatlanmış Fibroin nanofiberler (A: skala bar 1µm, B:skala bar 5 µm)	47
Şekil 4.9 Glutaraldehit ile proteinin çapraz bağlanma reaksiyonu (Ulubayram, Aksu ve ark. 2002).....	49
Şekil 4.10 Çapraz bağlı Fibroin nanofiberler (skala bar 1µm). Glutaraldehit buharı işlem süresi; A) 1 saat, B) 3 saat, C) 6 saat, D) 12 saat.....	50
Şekil 4.11 Çapraz bağlı Fibroin nanofiberler (skala bar 5µm). Glutaraldehit buharı işlem süresi; A) 0,5 saat, B) 1 saat, C) 3 saat, D) 6 saat, E) 12 saat, F) 24 saat..	51
Şekil 4.12 Çapraz bağlıAg/Fibroin nanofiberler (skala bar 5µm). Glutaraldehit buharı işlem süresi; A) 0,5 saat, B) 1 saat, C) 3 saat, D) 6 saat, E) 12 saat F) 24 saat.....	52
Şekil 4.13 Çapraz bağlı Ag/Fibroin nanofiberler (skala bar 1µm). Glutaraldehit buharı işlem süresi; A) 1 saat, B) 3 saat, C) 6 saat, D) 12 saat	53
Şekil 4.14 Çapraz bağlı PEI(20) / Fibroin nanofiberler (skala bar 5µm). Glutaraldehit buharı işlem süresi; A) 0,5 saat, B) 1 saat, C) 3 saat, D) 6 saat, E) 12 saat, F) 24 Saat.....	54
Şekil 4.15 Çapraz bağlı PEI(20) / Fibroin nanofiberler (yüksek büyütme, skala bar 1µm). Glutaraldehit buharı işlem süresi; A) 1 saat, B) 3 saat, C) 6 saat, D) 12 saat	55
Şekil 4.16 Glutaraldehit buharı işlem süresinin nanofiber çapına etkisi; A) Fibroin nanofiberler, B) Ag/Fibroin nanofiberler, C) PEI(20) / Fibroin nanofiberler	56
Şekil 4.17 Silik II morfolojiye sahip nanofiberler (skala bar 1µm); A ve B) Fibroin nanofiberler, C ve D) Sülfatlanmış Fibroin nanofiberler.....	57
Şekil 4.18 Biyonanotekstillerin makroskopik görüntüsü A) Fibroin-M, B) Ag/Fibroin-G, C) PEI(10)/Fibroin-G, D) PEI(20)/Fibroin-G, E) PEI (30)/Fibroin-G, F) S/Fibroin-M	58
Şekil 4.19 Fibroin nanofiberlerin FTIR Spektrumları;	59
Şekil 4.20 Ag/Fibroin nanofiberlerin FTIR Spektrumları; a) Ag/Fibroin, b) Ag/Fibroin-G, c) Ag/Fibroin-M	60
Şekil 4.21 PEI/Fibroin nanofiberlerin FTIR Spektrumları;	61
Şekil 4.22 Çapraz bağlı PEI/Fibroin nanofiberlerin FTIR Spektrumları;	62

Şekil 4.23 S/Fibroin nanofiberlerin FTIR Spektrumları;	63
Şekil 4.24 Fibroin, Fibroin-M ve Fibroin-G'nin TGA termogramları	64
Şekil 4.25 Ag/Fibroin, Ag/Fibroin-M ve Ag/Fibroin-G'nin TGA termogramları	65
Şekil 4.26 PEI(10)/Fibroin,PEI(20)/Fibroin ve PEI(30)/Fibroin'in TGA termogramları	66
Şekil 4.27 PEI(10)/Fibroin-G, PEI(20)/Fibroin-G ve PEI(30)/Fibroin-G'nin TGA termogramları	66
Şekil 4.28 S/Fibroin-M ve Fibroin-M'nin TGA termogramları	67
Şekil 4.29 Fibroin nanofiberlerin DSC termogramları; a) Fibroin, b) Fibroin-M, c) Fibroin-G.....	68
Şekil 4.30 Ag/Fibroin nanofiberlerin DSC termogramları; a) Ag/Fibroin, b) Ag/Fibroin-M c) Ag/Fibroin-G	69
Şekil 4.31 PEI/Fibroin nanofiberlerin DSC termogramları; a) PEI(10)/Fibroin, b) PEI(20)/Fibroin, c) PEI(30)/Fibroin, d) PEI(10)/Fibroin-G, e) PEI(20)/Fibroin-G, f) PEI(30)/Fibroin-G	70
Şekil 4.32 S/Fibroin-M nanofiberlerin DSC termogramı.....	71
Şekil 4.33 Biyonanotekstillerin yüzeylerindeki su damlasının görüntüleri; A) Fibroin-M, B) Ag/Fibroin-G, C) PEI(10)/Fibroin-G, D) PEI(20)/Fibroin-G, E) PEI(30)/Fibroin-G, F) S/Fibroin-M	72
Şekil 4.34 Nanobiyotekstillerin hücre canlılığına etkisi	74
Şekil 4.35 <i>Staphylococcus aureus</i> için 5 saat sonunda bakteri sayısı (cfu/mL)	75
Şekil 4.36 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> için 5 saat sonunda bakteri sayısı (cfu/mL)	76
Şekil 4.37 Biyonanotekstillerin <i>Staphylococcus aureus</i> için antibakteriyel aktivite test görüntüleri; A) Fibroin-M, B) Ag/Fibroin-G, C) PEI(10)/Fibroin-G, D) PEI(20)/Fibroin-G, E) PEI(30)/Fibroin-G, F) S/Fibroin-M	77
Şekil 4.38 Biyonanotekstillerin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> için antibakteriyel aktivite test görüntüleri; A) Fibroin-M, B) Ag/Fibroin-G, C) PEI(10)/Fibroin-G, D) PEI(20)/Fibroin-G, E) PEI(30)/Fibroin-G, F) S/Fibroin-M	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Antimikrobiyal yara örtüleri.....	23
Çizelge 3.1 İpek fibroin nanofiber üretimine ait elektroeğirme parametreleri	34
Çizelge 3.2 Ag/Fibroin nanofiber üretimine ait elektroeğirme parametreleri	35
Çizelge 3.3 PEI/Fibroin nanofiber üretimine ait elektroeğirme parametreleri	35
Çizelge 4.1 Hazırlanan nanofiberlerin ortalama çapları.....	47
Çizelge 4.2 Biyonanotekstillerin temas açısı değerleri	72

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Biyomedikal tekstiller, ameliyat iplikleri, bandajlar, yapay bağ dokusu, yapay damar, yapay eklem, yara örtüleri gibi daha birçok medikal cihazın üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda nanoüretim teknolojilerindeki gelişmelerle birlikte biyomedikal tekstillerin üretimi nanoboyuta indirgenerek çok fonksiyonlu malzemeler üretilmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı antibakteriyel etkiye sahip, ipek fibroin bazlı biyonanotekstillerin yara örtüsü modeli olarak geliştirilmesidir. Bu amaca yönelik olarak çeşitli yaklaşımlarla ipek fibroin proteinine antibakteriyel özellikler kazandırarak yara bölgesine yapışmayan ipek fibroin bazlı biyonanotekstiller elektroegirme yöntemi ile geliştirilecektir. Bu çalışmada ipek fibroin proteini biyomalzeme olarak seçilmiştir. İpek fibroin proteini, farklı morfolojilerde, doku iskelesi, ilaç salım sistemi, yara örtü malzemesi olarak biomedikal alanda kullanılmasının yanı sıra tekstil uygulamalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. İpek fibroin ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, ipek fibroin filmlerin ıslak haldeyken tıpkı insan derisi gibi yüksek oksijen geçirgenliğine sahip olması (Lu, Wang ve ark. 2009), fibroin filmlerin yaranın iyileşme periyodu süresince yarayı dış etkilere ve mikroorganizmalardan koruduğu ve poröz ipek filmlerin vaskülarizasyonu sağladığı bildirilmiştir (Guan, Bai ve ark. 2009). Bu özellikleri dolayısı ile ipek, doku mühendisliğinde ve yara iyileşmesi uygulamalarına oldukça uygun biyomalzemedir. Ancak ipeğin mekanik özellikleri ve biyoyumumluluğunun yanı sıra ipek fibroin proteininin antibakteriyel etkisi bulunmamaktadır.

Diğer taraftan nanoteknolojideki gelişmelerle birlikte hidrokolloid, aljinat, hidrojel ve fiber formlarında üretilen yeni nesil yara örtü malzemelerine antimikrobiyal özellikler kazandırmak için genellikle nano boyutta metalik nanopartiküller kullanılmaktadır. Bu nanopartiküllerin başında da antimikrobiyal aktivitesi birçok çalışmayla kanıtlanmış gümüş (Ag) nanopartiküller gelmektedir (Maneerung, Tokura ve ark. 2008; Rai, Yadav ve ark. 2009). Gümüş nanopartiküller, yara bölgesini enfeksiyonlara karşı korumasına karşın yara bölgesindeki hücreler üzerine sitotoksik ve genotoksik etkilere sahiptir (Park, Neigh ve ark. 2011). Gümüşün eşsiz antimikrobiyal özelliklerinin yanında canlılar üzerine olumsuz etkileri nedeniyle son yıllarda antimikrobiyal peptitler ve polimerler üzerine

araştırmalar öne çıkmaktadır (Kenawy, Worley ve ark. 2007). Antibakteriyel polimerler incelendiğinde polietilenimin (PEI), başta gen terapisi uygulamalarında gen taşıyıcı polimerik sistemler (Jeon, Yang ve ark. 2008; Shen, Deng ve ark. 2009; Fortune, Novobrantseva ve ark. 2011) olmak üzere, dental kompozitlerde (Beyth, Yudovin-Farber ve ark. 2006), protein taşıma sistemlerinde (Zhang, Kucharski ve ark. 2010), filtrasyon teknolojisinde (Fang, Xiao ve ark. 2011) ve doku iskelelerinde (Khanam, Mikoryak ve ark. 2007) yaygın şekilde kullanılan polikasyonik bir polimerdir. Bu polimerin etkili antibakteriyel özelliği Klivanov ve arkadaşları tarafından pek çok çalışma ile rapor edilmiştir (Tiller, Liao ve ark. 2001; Lin, Qiu ve ark. 2002; Milovi , Wang ve ark. 2005; Wong, Li ve ark. 2010). PEI güçlü antibakteriyel etkisi sayesinde biyonanotekstillerin geliştirilmesinde son derece uygun bir polimer olarak görölmektedir. Bu özellikleri dolayısı ile PEI bu tez kapsamında ilk defa fibroin yapıları eklenerek antibakteriyel biyonanotekstillerin hazırlanması hedeflenmiştir. Aynı zamanda antimikrobiyal etkisi bilinen gümüş nanopartiküller içeren Ag/Fibroin kompozit nanofiberleri hazırlanarak antibakteriyel etkileri ve sitotoksiteleri PEI katkı nanofiberler (PEI/Fibroin) ile karşılaştırılarak performanslarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Diğer taraftan heparin benzeri yapısı sayesinde yüksek derecede antikoagulan özellik gösteren sülfatlanmış fibroin nanofiberlerin elde edilmesi ve antibakteriyel özelliklerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Bu hedefler doğrultusunda üretilen biyonanotekstillerin, sulu ortamda kararlı hale geçirilmeleri incelenecek, morfolojik ve termal analizlerle yapıları aydınlatılacaktır. Daha sonra üç farklı yaklaşımla elde edilen ve antibakteriyel özellikte oldukları iddia edilen biyonanotekstillerin, yara bölgesinde en çok görölen hücre tipi olan fibroblastlar üzerinde sitotoksiteleri incelenecektir. Son olarak biyonanotekstillerin yara bölgesinden en çok izole edilen gram (+) *Staphylococcus aureus* ve gram (-) *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel özellikleri incelenecektir.

Tezin sonunda enfekte yaraların tedavisinde kullanılmak üzere, gümüş nanopartiküller kadar antibakteriyel etkiye sahip, ortamda kalıcı antibakteriyel aktivite sağlayacak, yara bölgesinde toksik etki oluşturmayacak ve yara iyileşmesini teşvik edecek biyonanotekstiller geliştirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyomalzeme Olarak İpek

İpek fibroin, sahip olduğu mekanik özellikleri ve göz kamaştıran parlaklığı ile yüzyıllardır tekstil malzemesi olarak kullanılmaktadır. İpek fibroin proteini, farklı morfolojilerde, doku iskelesi, ilaç salım sistemi, yara örtü malzemesi olarak biyomedikal alanda kullanılmasının yanı sıra filtrasyon uygulamalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Kollejen ve ipek gibi fibröz proteinler birbirini tekrarlayan amino asit dizilerinden oluşur ve ikincil yapılarında yüksek oranda homojenlik gösterirler. Bu tip proteinler, bu özellikleri sayesinde diğer biyomalzemelere oranla yüksek derecede mekanik dayanım gösterirler.

İpek proteini, *Bombyx mori* tırtılları tarafından metamorfoz sırasında avcılardan korunmak için üretilen fibröz bir proteindir (Şekil 2.1) (Vepari ve Kaplan 2007). Yapısal olarak incelendiğinde ise ipek proteini iki alt proteinden oluşmaktadır. Bunlardan ilki serisin olarak bilinen yapışkan benzeri glikoprotein yapısındaki proteindir. Bu protein fibroin filamentlerini çiftler halinde sararak kozayı mikroorganizmalardan, UV ışınlardan ve kohezyondan korur (Şekil 2.2. A,C). Aynı zamanda ipeğin ağırlıkça % 25-30' unu oluşturur. Serisin proteini, selüloz ve poli (vinil alkol) (PVA) gibi fazla sayıda hidroksil grupları içerir, bu da serisin proteinini yüksek oranda hidrofilik yapar. Serisin proteini, oksidasyona dayanıklı, antibakteriyel, UV ışığına geçirimsiz, nemi kolaylıkla absorp eden ve salan özelliklere sahiptir. Ayrıca serisin çapraz bağlanma gösterir, diğer makromoleküllerle özellikle de yapay polimerlerle kompozit oluşturabilmektedir. İpek proteininin işlenmesi sırasında serisin proteinin çoğu uzaklaştırılır.

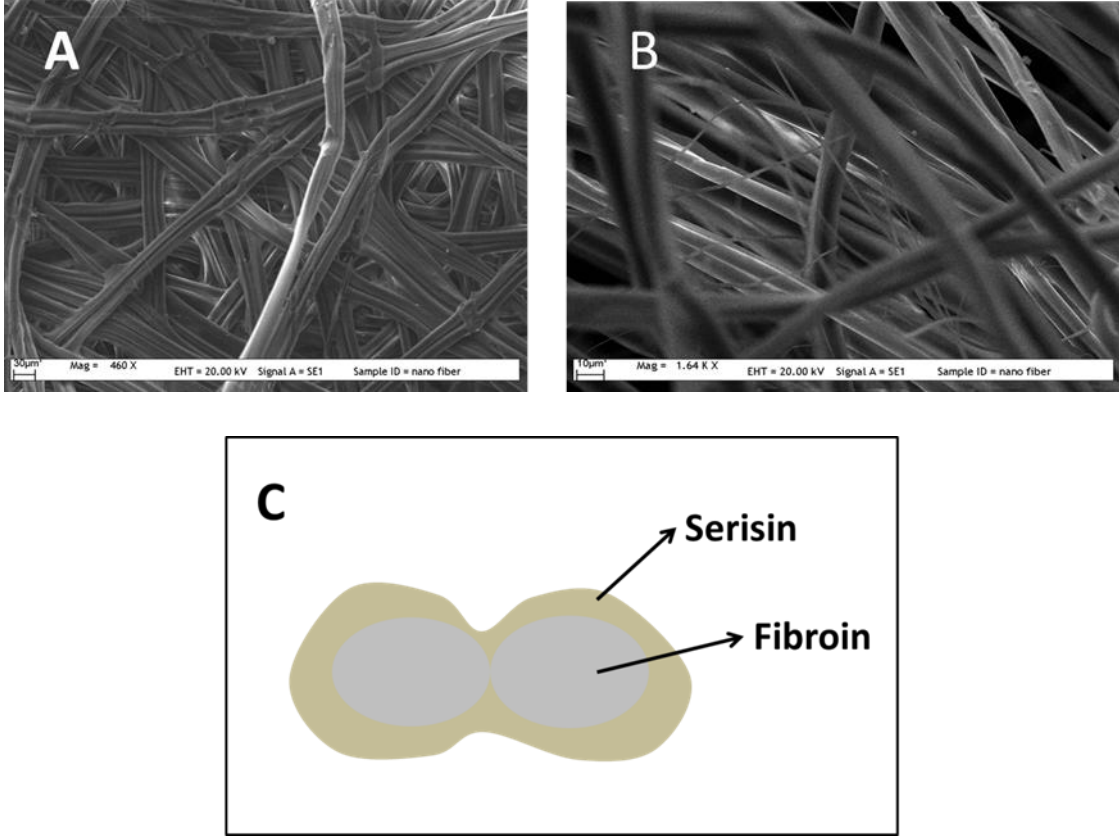
Serisinin molekül ağırlığı 10-300 kDa arasında değişmektedir. Serisin proteini 18 aminoasitten oluşur bunların çoğu kuvvetli polar gruplar olan hidroksil, karboksil ve amino grupları içerir. Yüzde olarak incelenecek olursa %33.4 serin %16.7 aspartik asitten oluşur. Serisin suda çözülebilir bir proteindir. Ayrıca polar bir çözücülerde örneğin asit ve alkali özeltelerde ve proteazlarda çözülebilir. Düşük molekül ağırlıklı serisin peptitler (20 kDa'dan daha küçük) veya serisin hidrolizatları deri bakımı, saç bakım ürünleri içeren kozmetiklerde, sağlık ürünlerinde kullanılır.



Şekil 2.1 İpek böceği kozası ve larvası (Bursa Koza Birlik)

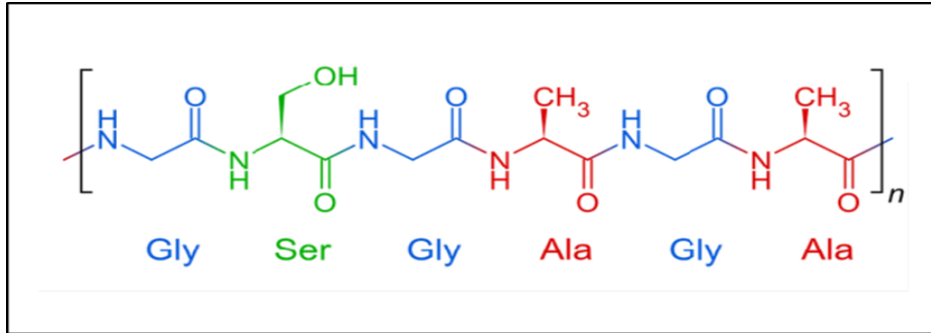
Yüksek moleköl ağırlıklı serisin peptitler (20 kDa'dan büyük) çoğunlukla biyomalzemelerde, fonksiyonel biyomembranlarda, hidrojellerde veya fonksiyonel fiberler ve bunların fabrikasyonlarında kullanılır (Yamada, Nakao ve ark. 2001; Zhang 2002). İpek proteininin büyük bir kısmını oluşturan diğer protein ise fibroindir. Bu protein oldukça iyi mekanik dayanım gösterir ve serisine kıyasla oldukça hidrofobiktir. Serisin proteini yapıdan ayrıldıktan sonra ortaya çıkan fibroin fiberlerin kalınlığı yaklaşık 10 μm kalınlığındadır (Hardy ve Scheibel 2010) (Şekil 2.2 B).

Fibroin nanofibrilleri üç bileşenli protein kompleksinden oluşur. Birincisi, ağır zincir (Heavy-chain) fibroin (350 kDa) olarak bilinen büyük protein, İkincisi hafif zincir (Light-chain) fibroin olarak bilinen hafif proteindir. Hafif zincir ve ağır zincir birbirlerine disülfid bağları ile bağlıdır. P25 olarak bilinen üçüncü küçük glikoprotein ise komplekse kovalent olmayan etkileşimlerle bağlıdır (Hardy ve Scheibel 2010).



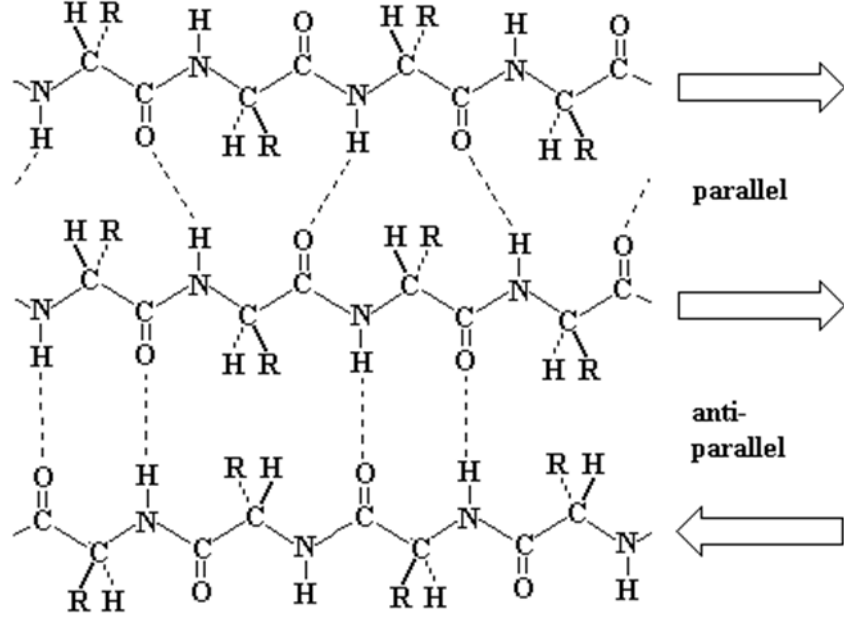
Şekil 2.2 A) Doğal ipek fiberler, B) Serisin proteinini uzaklaştırılmış fiberler, C) Doğal ipek fiberlerin şematik gösterimi

İpek fibroinin amino asit kompozisyonunun büyük bir kısmını %43 ile glisin oluşturur. Daha sonra glisini %30'la alanin ve %12 ile serin amino asiti izler. Fibroin zinciri hidrofobiktir ve $(\text{Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser})_n$ blokları içerir. Bu form anizotropik β - tabakalarınca zengin nanokristaller olarak bilinir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 İpek fibroinin çoğunlukla tekrar eden amino asit dizisi

İpek fibroin proteininin çeşitli konformasyon yapıları vardır. Düzensiz sarmal (Silk I) yapı fibroinin hidrat yapısıdır. Sulu ortamdaki fibroini kararlı kılmak için β -tabakalı (silk II) yapıya geçiş oldukça önemlidir. Parçalanma süresinin ayarlanması ancak silk I' den silk II' ye geçişin iyi ayarlanmasıyla sağlanabilir. Doğada ipek proteini silk I yapısındayken eğirme sırasında ipek böceği larvası tarafından silk II yapısına dönüştürülerek kararlı hale getirilir. Yeniden oluşturulmuş ipek bazlı biyomalzemelerde β tabaka (silk II) kristalin yapısına geçiş farklı yöntem ve prosesler uygulanarak ayarlanabilmektedir (Lawrence 2010). İpek fibroin silk I yapısından kararlı hal olan silk II yapısına geçerken amino asit dizileri arasında hidrojen bağı oluşumu teşvik edilir ve amino asitlerin karbonil ve amin grupları arasında paralel veya antiparalel hidrojen bağları oluşur. Fibroinin kararlı hali olan silk II yapısı Şekil 2.4' te verilmiştir. Fibroinin yapısal değişimini düzensiz sarmal halden, β -tabaka haline geçirmek için çeşitli yöntemler vardır. Bunlar; ısı ile muamele, mekanik germe, polar organik çözücüler ile muamele etme ve su buharına maruz bırakmaktır. Tüm bu yöntemlere alternatif olarak düzensiz sarmal haldeki fibroin molekülleri doğal veya sentetik polimerlerle çapraz bağlanarak kararlı hale getirilmektedir. Yapılan bir çalışmada hidrofobik yapıya sahip olan fibroin, plastikleştirici özelliğe sahip gliserol ile karıştırılarak suda çözünmeyen, kararlı ve elastikiyete sahip ipek fibroin biyomalzemeler elde edilmiştir (Lu, Wang ve ark. 2009).

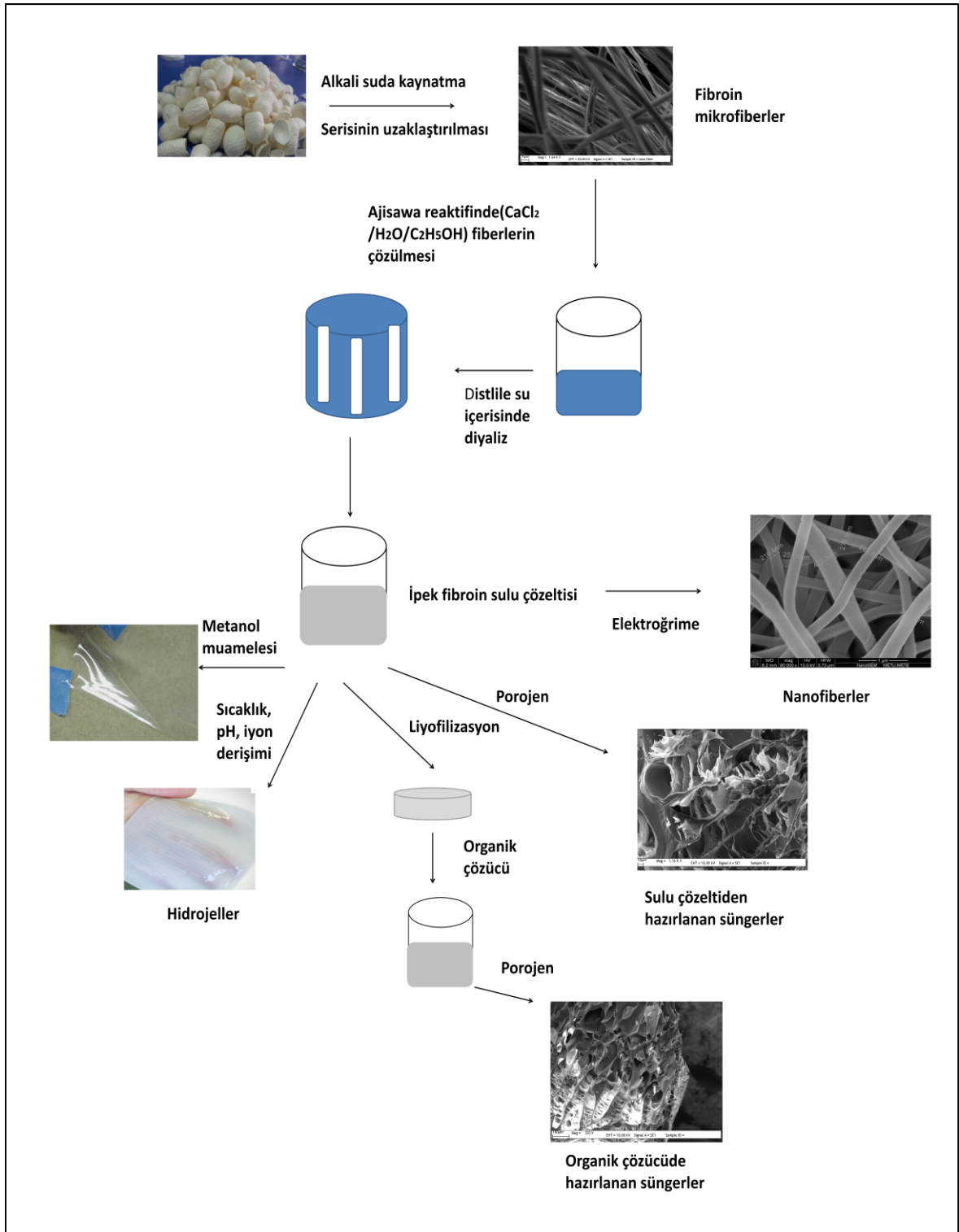


Şekil 2.4 Fibroinin silk II (β -kristalin) yapısı

(<http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/phy456/456lec01.htm>)

İpek fibroin proteini in-vivo da yavaş absorplanır. Biyomalzemelerde absorpsiyon zamanı implantasyon bölgesine, hastanın fizyolojik koşullarına ve malzemenin morfolojisi gibi etmenlere bağlıdır. İpeğin proses aşamalarındaki konformasyon ve morfolojik değişimler ile ipek proteinin degradasyon süresi in-vivo ve in-vitroda ayarlanabilir (Altman, Diaz ve ark. 2003).

İpek yüzyıllardır tekstil alanında kullanılmasının yanı sıra, doğal kaynaklı olması, eşsiz mekanik özellik göstermesi, kolay yüzey modifikasyonu gibi özellikleri sayesinde son dönemdeki doku mühendisliği uygulamalarında oldukça fazla ilgi gören bir biyomalzeme haline gelmiştir. İpek fibroin biyouyumlu ve biyobozunur yapısı sayesinde vücut içerisine implante edilebilir. Ayrıca in-vitro ve in-vivo uygulamalarda fiber, film, partikül, hidrojel ve sünger gibi çeşitli form ve şekillerde üretimi yapılabilmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 İpek fibroin bazlı biyomalzemelerin üretim şeması

2.1.1. İpek fibroin filmler

İpek fibroin filmler, ipek firoin sulu çözeltisi veya organik çözücü sistemleri ile çeşitli polimerlerin karıştırılmasıyla elde edilirler (Minoura, Tsukada ve ark. 1990). Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, ipek filmlerin en önemli dezavantajı yüksek kırılgenlığa sahip olmalarıdır. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak için ipek filmler farklı polimerlerle karıştırılarak özellikleri istenilen biçimde değıştirilebilmektedir. Kundu ve ark. (Kundu, Mohapatra ve ark. 2011) yapmış oldukları çalışmada sodyum karboksiselüloz ile karıştırılan ipek fibroin filmin elastik ve termal özelliklerinin arttığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, ipek fibroin filmlere gerek hücrelerin uyumunu kolaylaştıracak gerekse farklı özellikler kazandıracak yüzey modifikasyonları yapmak da mümkün olabilmektedir. Örneğin, Zwitteriyonik fosfobetain ile modifiye edilen ipek fibroin yüzeylerin kan uyumluluğu gösterdiği ve zwitteriyonik fosfobetain film yüzeyinde pıhtılaşmayı engelleyici etki yaptığı bildirilmiştir (Jiang, Chen ve ark. 2010). Diğer bir çalışmada ipek fibroin film yüzeyi poli(etilen glikol) (PEG) gibi biyouyumlu ve hidrofilik bir polimerle modifiye edilmesi sonucunda ipek fibroin filmlere hidrofilik karakter kazandırılmıştır. Ayrıca hidrofilik zincirler retiküloendotelyal sistem (RES) tarafından tanınmayı geciktirici bir etki yaptığı bilinmektedir (Vepari, Matheson ve ark. 2010). Yüzey modifikasyonlarının yanı sıra, ipek fibroin filmlere çeşitli bitki ekstraktları yüklenerek ya da adsorbe ettirilerek filmlere antimikrobiyal özellik kazandırılması da mümkün olabilmektedir (Basal, Altıok ve ark. 2010). İpek, bilinen en güçlü biyomalzeme olmasına rağmen hala mekanik dayanıklılık istenilen ölçüde değildir. Mekanik dayanımı artırmak amacıyla silika, titanyum, çinko, apetit, karbon nanotüp veya metal nanopartiküller gibi güçlendirici ajanlar kullanılmaktadır. Böylece nano boyutta kalınlığa sahip daha dayanıklı, elastik ve yüksek duyarlılığa sahip filmler elde etmek mümkündür (Kharlampieva, Kozlovskaya ve ark. 2010). Altın nanopartiküller yüklenmiş fibroin filmler, altın partiküllerinin belirli bir dalga boyunda gönderilen ışığı absorplayarak ısı enerjisine çevirmeleri sayesinde termal terapilerde uygulama potansiyeline sahiptirler. Altın nanopartiküller bulundukları alanlarda lokal olarak yüksek sıcaklık değışimlerine neden olurlar. Bu yüksek sıcaklık değışimleri de tümörlü veya hastalıklı dokunun hasar görmesini ve yok olmasını sağlar (Tao, Siebert ve ark. 2010).

İpek filmlerin bir başka önemli medikal uygulama alanı da kornea doku mühendisliği olmuştur. İpek filmlerin optik dalga boylarının tamamını geçirdiği bilinmektedir. Bu özelliği sayesinde arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) peptitleri ile fonksiyonlandırılmış ipek fibroin filmler gerek hücre tutunmasını kolaylaştıracak yapısı gerekse ışık geçirgenliği ve sahip olduğu mekanik özelliklerinden dolayı kornea doku mühendisliği uygulamaları için umut olmuştur (Luo, Zhang ve ark. 2011). Yine bu alanda yapılan başka bir çalışmada ipek fibroin filmlere ksilitol ve mannitol alkoller eklenerek filmler hem suda çözünmez hale getirilmiş hem de mekanik özellikleri arttırılmıştır. Ksilitol oranı %10 ve %20 olan ipek fibroin filmlerde ışık geçirgenliği insan korneasına yakın hale getirilmiştir. Aynı zamanda alkol ile karıştırılmış ipek fibroin filmle insan korneasıyla tutarlı mekanik özellik gösterdiği gözlemlenmiştir (Luo, Zhang ve ark. 2011). İpek fibroin filmlerin polietilenoksit (PEO) ile karıştırılarak yüzey özelliklerinin değiştiği görülmüştür. Filmlerin metanol ile β -tabaka kristalinitesi sağlandıktan sonra, 37°C'de 24 saat su ile muameleden sonra filmlerin yapısından uzaklaştırılan PEO polimeri malzemenin mikro yapısında değişikliğe neden olmuş ve yüzey pürüzlülüğünü arttırmıştır. Yüzey pürüzlülüğünün artmasıyla yüzeylere hücre tutunmasının büyük ölçüde arttırmıştır (Jin, Park ve ark. 2004).

Literatürdeki diğer çalışmalar incelendiğinde, ipek fibroin filmlerin biyomalzeme olarak kullanımları oldukça yaygındır ve bütün bu çalışmalar için in-vivo ortamda parçalanmanın kontrolü önemli bir parametredir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde ipek fibroin proteinini parçalanmasını kontrol edebilmek için kullanılan en yaygın yöntem ipek fibroin filmlerin organik çözücüler ile muamele edilmesidir. Ancak, bu yöntemde, kristallenme oranının kontrolü oldukça zordur ve ayrıca malzemede kalabilecek organik çözücü kalıntısı vücutta toksik etki yaratma riskine sahiptir.

2.1.2. İpek fibroin hidrojeller

Hidrojeller, sulu çözeltilerde çözünmeyen ve şişme işlemi boyunca fiziksel olarak stabil kalabilen, üç boyutlu polimer ağlarıdır. Hidrojeller hücrelerin ve sitokinlerin dağıtılması açısından oldukça önemli avantajlara sahiptirler. İpek fibroin hidrojeller, ipek fibroin sulu çözeltisinin β -kristalin tabakaya geçirilmesiyle elde edilirler (Kim, Park ve ark. 2004). İpek fibroin çözeltisinin pH'sı jelleşme oranını etkileyen önemli bir etkidir. Jelleşme oranını etkileyen diğer bir faktör ise ipek fibroin sulu

çözeltilisinin derişimi ve Ca^{+2} iyon derişimidir. Fibroin sulu çözeltilisinin derişimi, sıcaklığı ve Ca^{+2} iyon derişiminin artması ve pH'ın düşürölmesi ile çözeltilinin jelleşme süresi kısaltmaktadır. Aynı zamanda ipek fibroin çözeltilisinin derişimi, sıcaklığı, pH'sı ve iyon derişimi değıştirilerek hidrojinin por çapları ayarlanabilmektedir. Kontrol edilebilir degradasyon kinetikleri ve por çapları sayesinde fibroin hidrojinler doku mühendisliğı araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Kim, Park ve ark. 2004).

2.1.3. İpek fibroin süngerler

Poroz sünger yapıdaki doku iskeleleri, doku mühendisliğı çalışmalarında gerek hücre tutunması, çoğalması ve göçü, gerekse de hücrelere besin ve oksijen transfer etmesinde oldukça büyük avantajlar sağlamaktadır. İpek fibroin süngerler hem ipek fibroin sulu çözeltilisinden hem de çeşitli organik çözücüler kullanılarak üretilebilmektedir. Genellikle süngerimsi yapılar üretmek için farklı porojenlerin kullanılmasının yanı sıra, gaz köpükleme ve liyofilizasyon gibi fabrikasyon yöntemleri de kullanılabilmektedir. Organik çözücü bazlı hazırlanan süngerlerde tuz (sodyum klorür), şeker veya çeşitli porojenler kullanılır. Daha sonra ortamda bulunan tuz ve porojenler yapıdan farklı bir çözücü kullanılarak çıkartılır. Bu yöntemde süngerlerin porozitesi kullanılan porojenin veya tuzun partikül boyutuna bağılı olarak değışmektedir.

Taramalı elektron mikroskopu (SEM) analiz sonuçları değeriendirildiğinde su bazlı hazırlanan süngerler çözücü bazlı hazırlanan süngerlere oranla daha fazla yüzey pürüzlölüğüne sahiptir. Yüzey pürüzlölölüğünün sağladığı avantajla birlikte su bazlı hazırlanan fibroin süngerlere hücrelerin tutunması çözücü bazlı hazırlanan süngerlere oranla daha fazla olduğı da kanıtlanmıştır. Tüm bu avantajların yanında su bazlı fibroin süngerler organik bazlı hazırlanan süngerlere oranla daha yüksek porozite ve mekanik mukavemet göstermektedir. Süngerlerin enzimatik degradasyonları karşılaştırıldığında yine su bazlı hazırlanan fibroin süngerlerin daha kısa sürede degrade oldukları gözlenmiştir (Kim, Park ve ark. 2005).

Üç boyutlu fibroin süngerler sayısız doku ve hücrede çalışılmıştır. RGD ile birleştirilmiş fibroin süngerler in-vitro da insan mezenşimal kök hücreleriyle kültüre edildiklerinde osteojenik medyada hücre farklılaşması, hidroksiapatit birikimi ve kemik dokunu oluşumu gözlenmiştir (Meinel, Karageorgiou ve ark. 2004). Diğeri bir

çalışmada ise ratlarda yapılan deneylerde femur yaralanmalarında iyileşmeyi hızlandırıcı etki gösterdiği bildirilmiştir (Meinel, Fajardo ve ark. 2005).

2.1.4. İpek fibroin nanofiberler

Çapı bir mikron ve altındaki fiberler olarak tanımlanabilir. Günümüzde farklı fabrikasyon teknikleri kullanılarak sentetik veya doğal polimerlerden üretimi gerçekleştirilebilmektedir (Ramakrishna 2005). Nanofiberler sahip oldukları yüksek yüzey/hacim oranı ve mekanik dayanım gibi özellikleri sayesinde başta biyomedikal alan olmak üzere pek çok alanda kullanılmaktadır.

Yüksek yüzey/hacim oranı ve nano ölçekteki gözenekli yapısı sayesinde nanofiberlerden oluşturulmuş membranların filtrasyon için kullanılması birçok yenilik ve avantaj sağlamaktadır. Bu yüzeyler hava, su ve çeşitli sıvılar içerisinde 1 mikrondan daha küçük parçacıkların filtrelenmesine olanak sağlamaktadır. Özellikle elektroğirme yöntemiyle üretilmiş nanofiberlerden oluşan membranlar filtrasyon teknolojilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Park ve Park 2005; Gopal, Kaur ve ark. 2006)

İlaç salım sistemlerinde nanofiberler, yüksek yükleme kapasiteleri ve poroz yapıları sayesinde etken maddenin kontrollü salımını gerçekleştirmektedir. Kontrollü salım mekanizması nanofiberlerin poroz yapısının ayarlanmasıyla gerçekleştirilmektedir (Zeng, Xu ve ark. 2003).

Damar doku mühendisliği çalışmalarında, elektroğirme tekniği ile elde edilen ipek fibroin nanofiberlerden oluşturulmuş doku iskeleleri kullanılmış ve damarda bulunan damar endotel ve düz kas hücrelerinin ipek fibroin nanofiberlere iyi oranlarda yapıştığı ve çoğaldığı gözlenmiştir. Damar doku mühendisliğinde karşılaşılan en büyük sorunlardan biri olan dokunun gelişimi sırasında endotel hücrelerinin damar lümenine zayıf bağlanması ve küçük çaplı damarlarda trombus oluşumudur. Liu ve ark. yapmış olduğu çalışmada sülfatlanmış nanaofiber iskeleler antikoagulan özellikleri sayesinde küçük çaplı damarlarda hem trombus oluşumunu engellediği hemde endotel hücrelerinin damar lümenine daha iyi tutunma sağladıkları gözlenmiştir (Zhang, Baughman ve ark. 2008; Liu. H. 2011).

Kıkırdak doku mühendisliği uygulamaları için yürütülen çalışmalarda ipek fibroin bazlı film, sünger ve fiber formatında malzemeler kullanılmış ve kondrosit

hücrelerinde tutunma ve çoğalma sağlanmıştır. Ayrıca ipek fibroin bazlı iskelelerin mezenşimal kök hücrelerinde kondrojenezisi sağladığı da görülmüştür (Wang, Kim ve ark. 2005; Wang, Blasioli ve ark. 2006).

Kemik doku mühendisliğinde ipek fibroin bazlı nanofiber iskeleler hazırlanarak kemik iliği stromal hücrelerinde in-vitro olarak kültüre edilmiş ve bu hücrelerin tutunma, yayılma ve çoğalmasını desteklediği gözlemlenmiştir (Jin, Chen ve ark. 2004). Yapılan bir çalışmada kemik morfojenik proteini (BMP-2) ve hidroksiapatit (HA) içeren ipek fibroin nanofiberler kullanılarak kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücreleri statik koşullarda kültüre edilmişlerdir. Kemik morfojenik proteini ve hidroksiapatit içeren kültürlerde kalsiyum birikiminin arttığı ve kemik formasyonunun olduğu görülmüştür (Li, Vepari ve ark. 2006).

Son dönemdeki tendon doku mühendisliği çalışmaları mikro ve nano boyuttaki hibrid iskelelere yönelmiştir. Sahoo ve ark. tarafından yapılan çalışmada fibroblast büyüme faktörü (bFGF) salan poli(laktik-co-glikolik asit) (PLGA) nanofiberlerin mekanik desteğini ve degradasyon süresini artırması amacıyla PLGA nanofiberlerin arasına ipek fibroin mikrofiberler örülerek hibrid iskeleler elde edilmiştir. Hibrid iskelelere ekilen mezenşimal progenitör kök hücrelerin bu iskelelere tutunmasının ve çoğalmasının yanı sıra tenojenik farklılaşmayı sağladığı da görülmüştür (Sahoo, Toh ve ark. 2010).

Deri doku mühendisliğinde kullanılacak olan biyomalzemeler, yara iyileşme süresince yarayı dış etkilere ve mikroorganizmalardan korurken yara bölgesine oksijen geçirgenliğini de sağlayabilmelidir. İpek fibroin nanofiberler yara bölgesinde iyi derecede bakteriyel koruma sağlarken insan derisine yakın oksijen geçirgenliğe sahiptir. Bu özellikleri sayesinde fibroin nanofiberler yara bölgesi için oldukça uygun biyomalzemelerdir (Wharram, Zhang ve ark. 2010).

2.1.5. İpek fibroin bazlı biyomalzemelerin bozunması

Biyomalzemelerin in-vivo ortamdaki degradasyonları son dönemdeki doku mühendisliği araştırmalarının çoğunluğunu oluşturmaktadır. Bir doku iskelesinin görevi, hücrelerin çoğalması ve gelişmesi sırasında kendisine hücreler tarafından uygulanan kuvveti kaldırmaktır. İyi bir doku iskelesi, hücrelerin çoğalması ve farklılaşması aşamasında hücrelerin uyguladığı kuvveti kaldırmasının yanı sıra

hücreler gelişimlerini devam ettirirken kültür ortamından eş zamanlı olarak yok olmalıdır. Eğer yeni doku oluşurken iskele hızlı bir şekilde parçalanırsa, kullanılan iskele yeni oluşan dokunun kuvvetini kaldıramayacak ve doku gelişimini durduracaktır. Bunun tam tersi doku iskelesinin parçalanması yavaş gerçekleşiyorsa dokunun taşınması gereken yükü iskele taşıyacağından dokunun gelişimi sekteye uğrayacaktır (Laurencin ve Nair 2008). İpek fibroin fiberlerin in-vivo ortamda iki aylık implantasyon süreleri boyunca mekanik özelliklerinin %50 den fazlasını korudukları için United States Pharmacopeia tarafından degrade olmayan biyomalzeme olarak ilan edilmiştir (Horan, Antle ve ark. 2005).

Poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA) ve poli(laktik-co-glikolik asit) (PLGA) gibi polimerlerin degradasyonu polimer yapısının hidrolizi sonucunda gerçekleşir. Bu tip polimerlerin degradasyonlarının kontrolü farklı oranlarda polimerlerin karıştırılması veya molekül ağırlıklarının değiştirilmesi ile sağlanmaktadır. Ancak bu polimerlerin in-vivo degradasyonlarının bazı dezavantajları vardır. Birincisi; bu tip polimerler metalloproteinazlar (MMPs) gibi enzimlerle sınırlı degradasyon gösterirler. İkincisi ise PLA gibi sentetik polimerlerin degradasyon ürünleri ortamın pH'sını düşürerek inflamasyona sebep olur. Bozunma ürünlerinin de toksik özellik göstermemesi kullanılacak malzemede aranan başlıca özelliklerden biridir.

Kollajen ve ipek gibi doğal polimerler ise proteazların aktiviteleriyle degrade olurlar. Kollajenin degradasyon oranı çapraz bağlayıcı oranın değiştirilmesiyle ayarlanabilir. İpek gibi doğal polimerlerin sentetik polimerlere avantajı degradasyon ürünlerinin amino asit ve peptitler olmasıdır. İpek fibroinin degradasyon oranı kristal yapısına ve implante edildiği bölgenin biyolojik özelliklerine bağlıdır. İpek fibroin vücuda implante edildiğinde doğal yollarla α -chymotrypsin, kollajenaz ve çeşitli tip proteazlarla parçalanır (Arai, Freddi ve ark. 2004; Fuchs, Motta ve ark. 2006). Parçalanma hızı, yığın malzemelerde sekonder yapı olan β -tabaka kristalin yapısına bağlıdır. Parçalanma süresinin ayarlanması ancak silk I' den silk II' ye geçişin iyi ayarlanmasıyla sağlanabilmektedir (Lawrence, Wharram ve ark. 2010).

2.1.6. Yüzey modifikasyonları

Yapılan birçok çalışma göstermiştir ki biyomalzemelere yapılan yüzey modifikasyonları hücrelerin tutunmalarını, çoğalmalarını ve farklılaşmalarını büyük

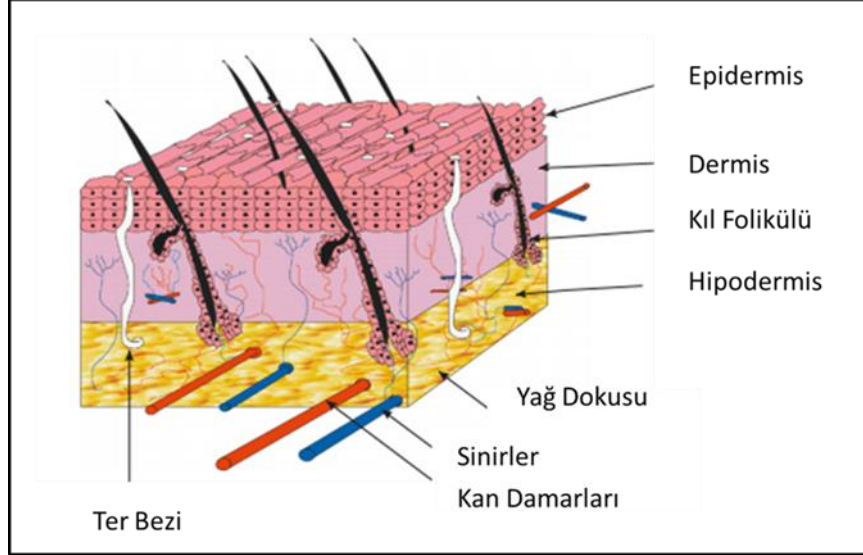
ölçüde etkilemektedir. Doku iskelesinin yüzey kimyası malzemenin tipine, yani doğal ya da sentetik polimer olmasına göre değişmektedir. Malzeme yüzeyinin kimyasal özellikleri; yapışma ve yayılma gibi hücrel aktiviteleri düzenleyen, biyolojik moleküllerin adsorbsiyonunu etkileyen önemli bir etkidir. Özellikle integrin tanıyıcı bölgeler olarak bilinen Arjinin-Glisin-Aspartik asit (RGD) serileri kullanılarak yapılan modifikasyonlar hücrelerin ilk aşamada tutunmalarını önemli derecede arttırmaktadır. Aynı zamanda biyomalzemelere, vücut içerisinde retiküloendotelyal sistem (RES) tarafından tanınmasını zorlaştırmak amacıyla PEG (polietilen glikol) ile kaplama yapılarak yüzeylerin hidrofiliği artırılmıştır. Bunun yanında yine hücre tutunmasını ve farklılaşmasını arttırmak için yüzeylere BMP-2, FGF, EGF gibi büyüme faktörlerinin immobilizasyonları da yapılmaktadır. İpek fibroin proteini, sahip olduğu aminoasit içeriğinden dolayı, başta fiziksel adsorpsiyon ve ligandların kimyasal immobilizasyonu olmak üzere pek çok yüzey modifikasyonuna olanak sağlar. Bu da ipek fibroin proteinini diğer biyomalzemelerden ayıran önemli bir özelliktir (Vepari ve Kaplan 2007). Bu nedenlerle ipek fibroin proteini biyomedikal uygulamalar için önemli bir materyaldir.

2.2. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, hücrel, fizyolojik ve biyokimyasal bir dizi olayın bütünleşmesi sonucu ortaya çıkan kompleks bir olaydır. Yaranın akut veya kronik olması, yara lezyonunun genişliği, enfeksiyon ve derinliğinin yanı sıra, hastanın yaşı, beslenme durumu, sistemik hastalıkları ve bireye özgü tedavi durumu gibi faktörler iyileşme prosesini karmaşık hale getirir. Yara iyileşmesi birbirini izleyen ve kısmen iç içe girmiş dönemlerden oluşan dinamik ve kompleks bir prosestir. Bazı durumlarda yara kendiliğinden iyileşebildiği gibi bazen de; mikroorganizmalar, venöz basınç yüksekliği, diyabet, atar damar darlığı, neoplazi, radyasyon, fiziksel ve kimyasal faktörler iyileşme de sorunlar oluşturur ve iyileşmeyi engeller. Yara iyileşmesi basamaklarına geçmeden önce derinin yapısının bilinmesi önemlidir.

Deri, morfolojik olarak incelendiğinde epidermis ve dermis olmak üzere iki ana katmandan oluşur. Epidermis, yüksek geçirgenliğe sahip, vücudu dışarıdan gelebilecek tehlikelere karşı koruyan ve su kaybını kontrol eden bir bariyer niteliğindedir. Dermis ise çoğunlukla bağ doku hücreleri ve ekstraselüler matriks (ECM) elemanlarından oluşur. Bu elemanların başında da deriye esneklik ve

mekanik kuvvet sağlayan kollajen ve elastin fiberler gelmektedir. Ayrıca deriyi besleyen kan damarları ve sinir ağları da dermis tabakasında bulunur. Şekil 2.6' da derinin yapısı ayrıntılı olarak görölmektedir (Zhong, Zhang ve ark. 2010).



Şekil 2.6 Derinin yapısı (Metcalf ve Ferguson 2007)

Fibroblastlar dermis tabaksında en çok görölen hücre tipidir. Bu hücreler özellikle yara iyileşmesinde önemli rol oynayan proteaz ve kollajenaz gibi enzimleri üretebilme kabiliyetine sahiptirler.

Deri, dış dünyadan gelebilecek tehditlere karşı bir bariyer niteliğinde olduğundan, bu işlev yanık ya da kronik ülserler aracılığıyla ortadan kalktığında, hastalar bakteriyel enfeksiyon riski altına girmektedirler. Geniş deri kaybı meydana gelen yaralarda, bakteriyel enfeksiyon ölümlerle sonuçlanabilmektedir (Metcalf ve Ferguson 2007).

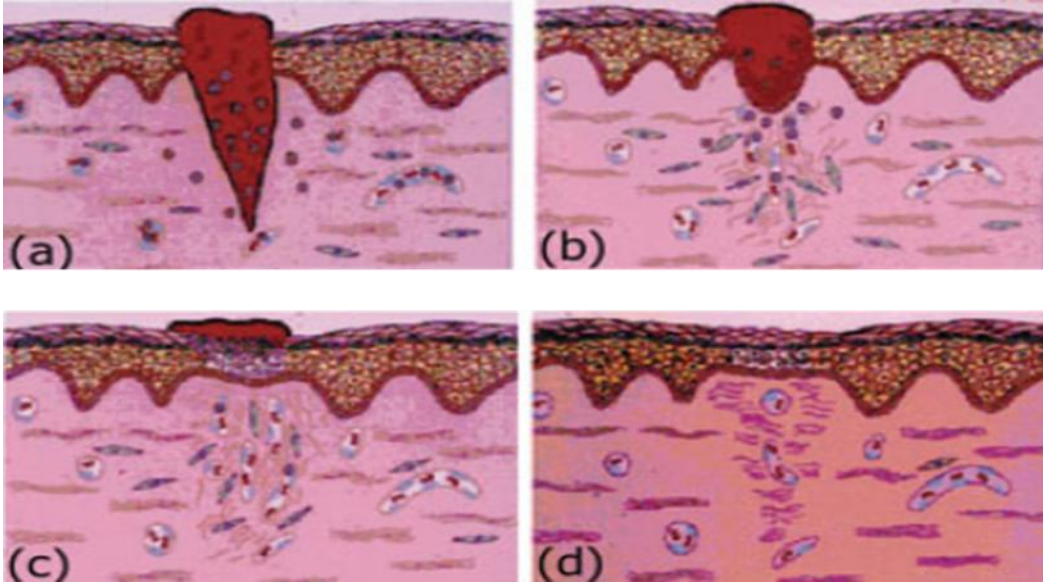
2.2.1. Yara iyileşme basamakları

Yara iyileşmesi, içerisinde çok fazla fizyokimyasal parametreler içeren oldukça karmaşık biyolojik bir süreçtir. Bunlar; hemostazis ve inflamasyon, göç ve çoğalma ve olgunlaşma basamaklarıdır. Bu süreç ana hatlarıyla Şekil 2.7'de özetlenmiştir.

Birinci basamak, yaklaşık olarak 72 saat sürmekte olup bu süre içerisinde kan pıhtılaşma sistemi aktive edilmekte ve trombositlerden çeşitli araçların trombosit tabanlı büyüme faktörü (PDGF), trombosit aktivasyon faktörü (PAF), tromboksan, serotonin, adrenalin ve tamamlayıcı faktörler salımı sağlanmaktadır. Yara oluşumundan sonraki ilk günden itibaren maksimum 14 gün süren göç ve proliferatif (çoğalma) basamakta, yüksek derecede vaskülerizasyon oluşur. Bu sırada, lökositlere ek olarak histositler, fibrositler, fibroblastlar, plazma hücreleri, mast hücreleri, anjioblastlar ve miyofibroblastlar lezyon alanına taşınır. Endotel hücrelerine tutunan aktive edilmiş lökositler ve mast hücrelerinden salınan bradikinin sonucunda vasküler girişkenlik artar ve yüksek moleküler ağırlıktaki maddeler (albumin, fibrinojen) hücre dışı boşluğa yayılır. Bunların sonucunda ödem oluşur. Dokuda meydana gelen sıvı birikimi, fibrositlerin fibroblastlara dönüşümünün sonucunda oluşur. Bu, hücre proliferasyonunu başlatır ve granülasyon dokusunun oluşumunu hızlandırır. Bu dinamik doku değişikliği epitelizeasyon için temeldir. Fibroblastlar, bütün iyileşme işlemi boyunca yer değiştirir ve yara alanındaki kan pıhtılarından elde edilen aminoasitleri substrat olarak kullanarak sayıca çoğalır.

Yara iyileşme periyodunun son safhası olan onarım basamağında, yeni bağ doku oluşumu çok önemlidir. Fibroblastlar kollojen fibrilleri sentezlemeye başlar başlamaz mitotik aktivite durur. Ayrıca kollojen fibriller olgunlaştıkça yara alanındaki hücre yoğunluğu ve vaskülerizasyon azalır. Bu sırada yara izi oluşmaya başlar. İyileşmenin bu safhasında hücre dışı matriksin büyük çoğunluğunu oluşturan fibronektin, hem kolojen yüklemesi hem de fibroblastların yerleşmesiyle belirlenir.

Günümüzde yaraların hızlı ve kozmetik iyileşmesini sağlamak için çok çeşitli yara örtüleri kullanılmaktadır. Yara iyileşme süreci ilaç tedavisiyle birlikte uygun yara örtülerinin kullanımına bağlıdır. Yara örtüleri, yara bölgesini enfeksiyona ve mikroorganizmalara karşı korumakta, aynı zamanda yara bölgesindeki kan ve yara sıvısını absorblayarak yara iyileşmesini hızlandırmaktadır. Yara örtüleri; yaranın özelliklerine göre film, köpük, hidrojel, fiber, hidrokoloid, alginatlar, antibakteriyel gibi birçok forma ve özellikte üretilmektedir. Ayrıca günümüzde deri yapısına eşdeğer biyolojik yara örtüleri de mevcuttur. Aşağıda bu alanda kullanılan yara örtülerinden bahsedilecektir.



Şekil 2.7 Yara iyileşme basamakları a) Hemostazis ve inflamasyon (kılcal damarların artması, nötrofil ve fibroblast hücrelerinin yara bölgesine nüfuz etmesi), b) Epitel hücrelerinin yara bölgesine invazyonu, c) Epitel hücrelerinin yarayı tamamen kaplaması, d) Yaranın erken evresinde ortaya çıkan kılcal damarların ve fibroblast hücrelerinin yara bölgesinden uzaklaşması (Zahedi, Rezaeian ve ark. 2010).

2.2.2. Yara örtüleri

Bazı durumlarda yara kendiliğinden iyileşebildiği gibi bazen de; mikroorganizmalar, venöz basınç yüksekliği, diyabet, atar damar darlığı, neoplazi, radyasyon, fiziksel ve kimyasal faktörler iyileşmeyi engeller. Böyle durumlarda yara yüzeyi uygun bir yara örtüsü ile kapatılarak bir taraftan yaranın nemli tutulması sağlanırken diğer taraftan dokunun dış etkenlerden korunması gerekir. Yapısına ve kompozisyonuna bağlı olarak yara örtüleri; yara bölgesinde oluşan eksüdanın kötü kokusunu ve enfeksiyon kapmasını önler, ağrıyı azaltır, yarayı nemli tutarak granülasyon dokusunun oluşumunu ve epitelizasyon işlemini hızlandırır. Günümüzde klinikçilerin yaygın olarak kabul ettiği yara bölgesinin nemli tutulmasının yara iyileşme süresini % 50 hızlandırdığı gerçeğidir. Geleneksel yara örtü materyalleri “pasif yara örtüleri” olarak adlandırılırlar. Bunlar pamuk, doğal ya da sentetik bandajlar ve gazlı bezlerdir. Bu malzemeler yaraya nemli bir ortam sağlamadıkları için özellikle kronik yara ve yanıklarda yerlerini modern örtü materyallerine bırakmışlardır. Modern yara örtüleri materyalin türüne (hidrokolloid, aljinat, hidrojel)

ve fiziksel formlarına (film, köpük) göre alt bölümlere özelleşmektedirler. Modern örtü materyallerinin en büyük özellikleri ise yarayı nemli tutarak iyileşmeyi hızlandırmasıdır. Genel olarak, başlıca kullanılan yara ve yanık örtü materyalleri aşağıda sınıflandırılmıştır.

2.2.2.1. Pasif yara örtüleri

Gauze: Gauze bandaj, tübüler bandaj ve sünger şeklinde çeşitli morfolojilerde üretilmektedir. Bu tip yara örtüsü, yaraya yapıştığından yüzeyden kaldırıldığında yeni oluşan dokulara zarar vermektedir. Bu yüzden kullanımı sadece küçük yaralarla sınırlıdır (Multisorb).

Tül: Kaygan gauze olarak da tanımlanmaktadır. Jel yapısı sayesinde kaygandır ve yara bölgesine yapışmaz. Derin olmayan küçük yaralar için uygundur. Küçük yaralarda oluşan eksüda emebilme kapasitesine sahiptir (Jelonet).

2.2.2.2. İnteraktif yara örtüleri

Yarı geçirgen filmler: Yarı geçirgen filmler yara bölgesine havayla taşınan bakterilerin geçmesini engellerken epitelizasyon için gerekli oksijen geçirimine de olanak sağlamaktadır. Yarı geçirgen transparan poliüretan membranlar derin olmayan ve düşük eksüdaya sahip yaralar için uygundur (Tegaderm).

Yarı geçirgen köpükler: Yarı geçirgen köpükler yüksek absorpsiyon kapasitesine sahip gözenekli yapılardır. Yumuşak, hücre tutunmasına açık, hidrofobik, 6-8 mm kalınlığındaki poliüretan köpükler, mekanik olarak yüksek dayanım ve esnekliğe sahiptirler. Yüksek eksüdanın olduğu yaralarda kullanılırlar. Düşük eksüdalı yaralarda kullanıldıklarına yara bölgesinde kuruluğa neden olurlar (Allevyn).

Amorf hidrojel: Hidrojeller, büyük bir yüzdesini suyun oluşturduğu hidrofilik polimerlerin üç boyutlu ağları olarak tanımlanır. Amorf hidrojel çapraz bağlanmamış hidrojellerdir. Bu tip yara örtü malzemeleri nekrotik yaralarda ve kabuklu yara yataklarında ortamda kaybolan nemi yeniden sağlamak amacıyla ve ölü dokuları ortamdaki uzaklaştırmak için kullanılırlar. Yüksek eksüdalı yaralar için uygun değildirler (Intrasite).

2.2.2.3. Biyoaktif yara örtüleri

Hidrokolloidler: Hidrokolloid yara örtüleri genellikle bir matriks içerisinde çözülmüş hidrofilik polimer taneciklerinden oluşur. Katı haldeki yarı geçirgen poliüretan filmler, hidroaktif olarak karboksimetil selüloz içerirler ve eksüdayı emdiklerinde jel formuna dönüşürler. Hidrokolloid yara örtü malzemeleri düşük veya yüksek eksüdalı yaralarda, kabuklu ve granüllü yaralarda kullanılabilirler (DouDERM).

Aljinatlar: Aljinat lifleri iyon değişimi özelliğine sahiptir. Yara bölgesindeki eksüda ile temas ettiğinde aljinattaki kalsiyum iyonları vücut sıvısındaki sodyum iyonlarıyla yer değiştirmektedir. Bu iyon değişimi sonrasında lifler şişer ve yara bölgesinde jel oluşturur. Eksüdalı yaralar için oldukça uygundur. Kabuklu yaralardaki yara bölgesindeki yabancı maddelerin dışa atılmasında oldukça etkilidirler. Düşük eksüdalı yaralarda kuruluğa sebep olduğundan kullanımı uygun değildir. Kullanım esnasında yara örtüsü günlük olarak değiştirilmelidir (Kaltostat).

Kollajenler: Yara örtü malzemesi olarak kollajenin kullanımı, ped, jel veya partiküler şeklinde olabilmektedir. Bilindiği üzere kollajen yara yatağında yeni oluşan dokuları desteklemekte ve ortamdaki eksüdayı absorplayarak ortamın nemini ayarlamaktadır.

Hidrofiberler: Karboksiselülozdan yapılmış, hidrofiberler ped veya bant şeklinde kullanılabilir. Ortamdaki eksüdayı absorblamada ve nem dengesini sağlamada oldukça etkilidirler (Aquacel) (Zahedi, Rezaeian ve ark. 2010).



Şekil 2.8 Yara örtüsü malzemeleri; a) gauze, b) tül, c) poliüretan membran, d) poliüretan köpük, e) hidrojel, f) hidrokolloid, g) aljinat, h) kollajen, i) hidrofiber

2.2.2.4. Antimikrobiyal yara örtüleri

Yara bölgesinde gelişen enfeksiyon iyileşmeyi son derece karmaşık bir sürece sokmaktadır. Enfeksiyon, vücut savunmasını yenen patojenlerin oluşturduğu bir çeşit kontaminasyondur. Bakteriler, yara bölgesine dışardan, kan yoluyla veya ameliyathane şartlarından gelirler. Bir gram dokuda 100 000'den fazla bakteri varsa yarada enfeksiyon ihtimali % 50'dir. Enfeksiyon yara iyileşmesinde ciddi gecikmelere neden olur. Bakteriler kollajenaz üreterek yara direncini azaltır. Enfekte yaralarda fibroblastik aktivite azalır. Geleneksel yara örtüleri bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruyucu bir özellik göstermediğinden yara bölgesini bakteri ve mantar enfeksiyonlarına karşı savunmasız bırakır. Bu dezavantajlardan kurtulmak için yeni geliştirilen yara örtü malzemelerinde, yaraya yapışmayan, iyileşme periyodu boyunca yarayı mikroorganizmalardan koruyan malzemeler geliştirilmiştir (Rigby, Anand ve ark. 1997; Rajendran ve Anand 2002).

Yüksek dozda sistemik olarak kullanılan antibiyotiklerin toksik etkilerini azaltmak için bazı antibiyotikler yara örtüleri içine katılarak enfekte yaralara

uygulanmaktadır. Örneğin; gentamisin kollajen süngerlerde (Rutten ve Nijhuis 1997), ofloksasin silikon jel tabakalarda (Sawada, Ara ve ark. 1990) ve minosiklin kitosan film örtülerle yaralara uygulanmaktadır (Rutten ve Nijhuis 1997). Yeni yara örtülerinde fibrin diskler aracılığıyla tetrasiklin ve laktik asit bazlı ofloksasin salımı ile *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus*'un sıçanlardaki yaralarda çoğalması inhibe edilmiştir (Sawada, Ohkubo ve ark. 1994). Yanıklara bağlı yüzeysel yaralarda antimikrobiyal salımı yapan silikon jel tabakaları kullanımının epitelizasyona katkıda bulunduğu Sawada ve çalışma arkadaşları tarafından tespit edilmiştir (Sawada, Ara ve ark. 1990). Minosiklin içeren kitosan-poliüretan film örtüleri ise bazı yanık yaralarında yararlı etkiler göstermiştir (Aoyagi, Onishi ve ark. 2007). Yara örtülerinde kullanılan antibiyotiklerin dokuyla uyumlu olması, bakteriyel direnç gelişiminin düşük olması ve ilaç açısından daha az takip edilebilme şansı bakımından avantajları vardır.

Klorhekzidin, iyot, gümüş gibi antiseptik maddeleri içeren antibakteriyel özellikli yara örtüleri de yaygın olarak yara tedavisinde kullanılmakta ve enfeksiyon kontrol altına alınmaktadır. Gümüş emdirilmiş modern yara örtüleri fibröz hidrokolloid, poliüretan köpük film ve silikon jel şeklinde kullanılmaktadır.

Son yıllardaki çalışmalar gümüş nanopartiküller içeren yara örtüleri üzerine yoğunlaşmıştır. Gümüş nanopartiküller, 1'den 100 nm'ye kadar değişebilen çaplarda oluşturulabilen gümüş atomları topluluğudur. Gümüş nanopartiküller UV-görünür bölgede, katalitik, optik ve biyosensör özellikleriyle son dönemde ilgi çeken malzemelerdir. Antimikrobiyal özelliği sayesinde atık suların arındırılmasında, kişisel bakım ürünlerinde, medikal malzemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gümüş nanopartiküllerin bakterisit etkisi gümüş iyonlarının elektron transfer zincirine dahil olmaları ve bakterilerde DNA hasarı ile açıklanmaktadır. Ancak bilindiği üzere gümüş nanopartiküller reaktif oksijen türevlerinin oluşumuna sebep olmaktadır. Bu reaktif oksijen türevleri gümüş nanopartiküllere antimikrobiyal özellikler kazandırmakta birlikte canlılar üzerinde de toksik etki göstermektedir (Blaker, Nazhat ve ark. 2004; Ahamed, Karns ve ark. 2008; Maneerung, Tokura ve ark. 2008; Park, Neigh ve ark. 2011).

Son yıllarda yara örtülerinde gümüşün hücreler üzerindeki toksik etkilerini elimine etmek ve aynı zamanda antibakteriyel özellikler kazandırmak için antibakteriyel

özellik gösteren polimerlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bölüm 2.2.2.5’de bu polimerlerden bahsedilecektir.

Çizelge 2.1 Antimikrobiyal yara örtüleri

Yara örtü malzemesinin adı	Antimikrobiyal içerik	Yara örtü formatı	Kuruluş
Acticoat absorbent	İyonik gümüş	Kalsiyum aljinat	Smith & Nephew, Inc, Largo, FL, USA
Actisorb Silver 220	İyonik gümüş	Gümüş içerikli örtü	Johnson and Johnson Wound Management
Arglaes	İyonik gümüş	Transparan örtü veya toz	Somerville, NJ, USA
Aquacel AG	İyonik gümüş	Hidrofiber	Medline Industries, Inc, Mundelein, IL, USA
Contreet H	İyonik gümüş	Hidrokolloid	Convatec, Skillman, NJ, USA
Contreet F	İyonik gümüş	Köpük	Coloplast Corp, Marietta, GA, USA
Iodosorb	Moleküler iyodin	Jel	HealthPoint Ltd, Ft. Worth, TX, USA
Silvasorb Antimicrobial	İyonik gümüş	Hidrojel tabaka veya amorf jel	Medline Industries, Inc, Mundelein, IL, USA
Silver Dressing		Hidrojel tabaka veya amorf jel	
Kerlix AMD Gauze	PHMB	Gauze	Tyco Healthcare/Kendall, Mansfield, MA, USA

2.2.2.5. Yara iyileşmesinde kullanılan bazı polimerler

Yara iyileşmesinde kullanılacak polimerler biyomalzemeler açısından oldukça önem taşımaktadır. Hidroilitik olarak kararsız olan alifatik poliester sınıfında yer alan poli(glikolik asit) (PGA), poli(laktik asit) (PLA) ve poli(laktik-co-glikolik asit) (PLGA) gibi polimerler cerrahi implantlar, kemik çimentosu, yeniden emilebilir dikiş malzemesi ve kontrollü salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu malzemeler, degrade olabilme ve yüksek biyouyumluluğa sahip olmalarına rağmen degradasyon ürünlerinin kullanılan bölgeyi asidik hale getirmesi, bu sınıftaki malzemelerin yara iyileşmesindeki kullanımlarını kısıtlamaktadır.

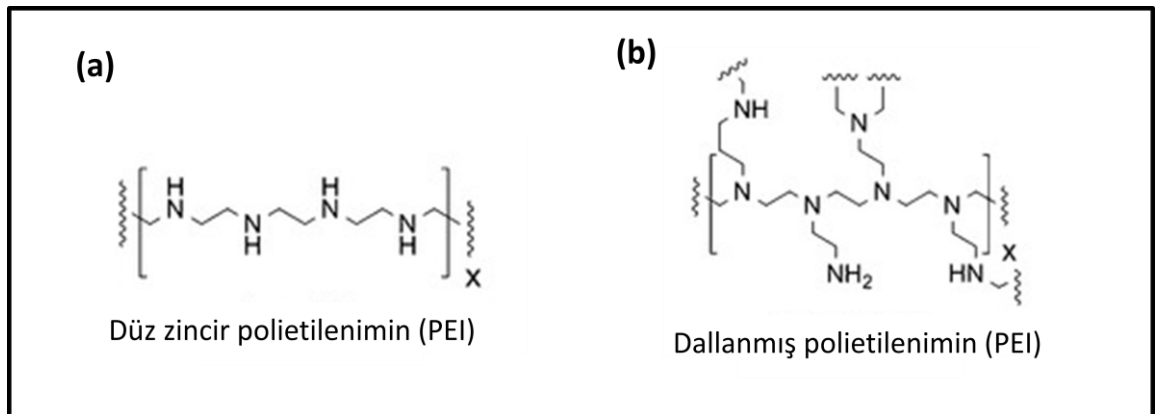
Doğal bir polimer olan kitosan, polisakkarit iskelesinde heparin benzeri glukozamin ve N-asetilglukozamin grupları içermektedir. Kitosan ihtiva ettiği bu gruplar sayesinde trombojenik ara yollar vasıtasıyla yara bölgesine hücre göçlerini uyararak, yara iyileşme süresini kısalttığı görülmüştür. Ancak asidik yara bölgesine konulan kitosan biyomalzemeler içerdikleri amin grupları yüzünden çözünürlük problemi yaşarlar ve mekanik dayanımlarının büyük bölümünü kaybederler. Ortaya çıkan bu problem, kitosanın farklı polimerle kopolimerizasyonu ile aşılabilmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı yara bölgesi için en uygun malzemeler kitosan dışındaki protein bazlı, doğal yapıli biyopolimerlerdir (Wharram, Zhang ve ark. 2010).

İpek fibroin ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, ipek fibroin filmler ıslak haldeyken tıpkı insan derisi gibi yüksek oksijen geçirgenliğine sahiptir (Lu, Wang ve ark. 2009). Bu özelliği sayesinde fibroin filmler deri doku mühendisliğinde, yaranın iyileşme periyodu süresince yarayı dış etkilerden ve mikroorganizmalardan koruma amaçlı bir biyomalzeme olarak kullanıma uygundur. Yara iyileşmelerinde üzerinde durulan önemli noktalardan diğeri de oluşacak yeni dokuda kan damarlarının oluşumudur. Ratlarda neovaskularizasyon incelendiğinde gözenekli ipek fibroin filmler dermise yerleştirildikten 24 saat sonunda damar oluşumu incelendiğinde, gözenekli ipek flimler ile subkutan doku arasında kan damarlarının oluşumu gözlenmiştir. 5. Günün sonunda gözenekli ipek filmlerde az sayıda kılcal damar oluşumu, 23 günün sonunda ise kılcal damarların ve kan damarların yüzdesinin normal deri dokusuyla aynı seviyeye geldiği gözlenmiştir. Bu sonuç poröz ipek filmlerin damar oluşumunu engellemediği aksine teşvik ettiğini göstermektedir. Görüldüğü gibi gerek deri doku mühendisliğinde gerekse yara iyileşmesi uygulamalarında ipek filmler oldukça uygun biyomalzemelerdir (Guan, Bai ve ark. 2009).

Schneider ve arkadaşları, yara iyileşmelerinde kullanılmak üzere epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor, EGF) yüklü elektroğrilmiş nano fibröz ipek fibroin membran üretmişlerdir. EGF büyüme faktörünün nanofiberlerden kontrollü salımı ile yara bölgesinde epitelizasyonunu hızlandırdığını izlemişlerdir (Schneider, Wang ve ark. 2009). Diğeri bir çalışmada Rho ve arkadaşları doku iskelesi olarak elektroğirme yöntemiyle kolajen (tip I) nanofiber membranlar üretmişler ve membranların yapısal kararlılığını sağlamak için glutaraldehit buharı

kullanmışlardır. Böylece mekanik olarak daha stabil doku iskeleleri elde edilmiştir. Membranların hücrelerle etkileşimlerini incelediklerinde insan keratinosit hücrelerinin membranlara yapıştığını ve yayıldıklarını gözlemlemişlerdir (Rho, Jeong ve ark. 2006).

Antibakteriyel polimerler incelendiğinde polietilenimin (PEI), başta gen terapisi uygulamalarında gen taşıyıcı polimerik sistemler (Jeon, Yang ve ark. 2008; Shen, Deng ve ark. 2009; Fortune, Novobrantseva ve ark. 2011) olmak üzere, dental kompozitlerde (Beyth, Yudovin-Farber ve ark. 2006), protein taşıma sistemlerinde (Zhang, Kucharski ve ark. 2010), filtrasyon teknolojisinde (Fang, Xiao ve ark. 2011) ve doku iskelelerinde (Khanam, Mikoryak ve ark. 2007) yaygın şekilde kullanılan polikationik bir polimerdir. Bu polimerin etkili antibakteriyel özelliği Klibanov ve arkadaşları tarafından pek çok çalışma ile rapor edilmiştir (Tiller, Liao ve ark. 2001; Lin, Qiu ve ark. 2002; Milovi, Wang ve ark. 2005; Wong, Li ve ark. 2010). Bu çalışmalarda, PEI immobilize edilmiş yüzeyler gram (+) *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve gram (-) *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* gibi bakterilere karşı yüksek bir antibakteriyel etkinlik sergilemişlerdir. PEI zincirleri immobilize edilmiş yüzeyler bu bakterilere karşı test edildiğinde uygulanan bakterilerin yaklaşık % 98'nin öldüğü tespit edilmiştir. PEI bu özelliği güçlü antibakteriyel etkisi sayesinde antimikrobiyal yara örtülerinin geliştirilmesinde son derece cazip bir polimerdir. PEI'nin yapısı Şekil 2.9'da verilmiştir.



Şekil 2.9 Polietileniminin yapısı (a) Düz zincir PEI, (b) Dallanmış PEI

Bu çalışma kapsamında yukarıda bahsedilen özellikleri nedeniyle ipek fibroni hazırlanacak biyonanotekstillerde temel malzeme olarak seçilmiş olup, aynı zamanda antibakteriyel ve biyuyumluluk özelliklerinde dolayı PEI'nin fibroin yapılarına eklenerek kompozit malzemelerin yara örtüsü modeli olarak hazırlanması planlanmıştır.

İyi bir yara örtü malzemesi, antimikrobiyal özelliğe sahip, yüksek absorpsiyon kapasitesi gösteren, toksik madde içermeyen, oksijen geçirgenliği yüksek ve yeterli mekanik dayanımı kaldırarak güçte olmalıdır.

Son yıllarda nanoteknolojide üretim metodlarının sağladığı avantajlar ile nanoboyutta topografiye ya da nanoyapılı nesil yara örtüleri geliştirilmeye başlanmıştır. Gümüş nanopartiküller içeren yara örtüleri bunlara en iyi örnektir. Bu kapsamda nanoeğirme yöntemi ile elde edilen nanofiber yapıya sahip medikal tekstiller (örgülü veya değil) oldukça yaygınlaşmıştır. Çünkü nanofiberlerin yara bölgesinde sağladığı bazı avantajlar vardır:

- Nanofiberler, küçük por çapları ve etkili yüzey alanları sayesinde yara bölgesinde ortadan kaybolmuş destek elemanı görevi üstlenirler.
- Sahip oldukları yüksek yüzey/hacim oranları sayesinde ortamdaki eksüdayı absorbe etme yeteneğine sahiptirler.
- Yarı geçirgen özellikleri sayesinde ortama oksijenin geçmesine olanak sağlarlar.
- Sahip oldukları küçük por çapları sayesinde yara bölgesine bakteri geçmesini engelleyerek yara bölgesini enfeksiyondan korurlar (Zahedi, Rezaeian et al. 2010).

Bu özellikleri ile nanofiberlerin yara örtüsü materyali olarak kullanımı son yıllarda önem kazanmıştır.

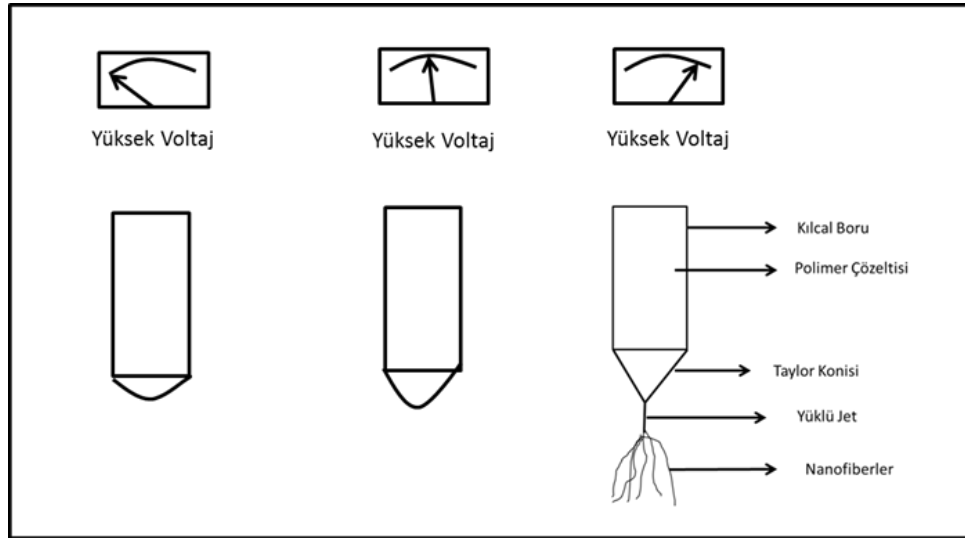
2.3. Elektroegirme Yöntemi

2.3.1. Elektroegirme yönteminin tarihçesi

Elektroegirme yönteminin tarihsel gelişimi incelenecek olursa çok eski bir teknik olduğu görülecektir. Bu yöntem ile ilgili ilk çalışmalar 1600'lü yıllarda başlamıştır. Elektroegirme yöntemi William Gilbert'in manyetizma üzerine çalışırken elektro-manyetizmanın sıvılar üzerine etkisini gözlemlemesiyle ortaya çıkmıştır. Gilbert

alışmasında bir su damlasını elektriksel olarak kuru bir yüzeyden belli bir mesafede, bir koni biçiminde çekildiğini kanıtlamıştır. 1934 yılında Anton Formhalas, aseton/ alkol çözelti karışımında mikrometre çaplarında selüloz asetat fiberler üretmeyi başarmıştır. Daha sonra 1969 yılında Taylor tarafından jet oluşumu ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Taylor, koni şeklinde olan ve iğne ucunda elektrik alan sebebiyle oluşan polimer damlasının şekli ile ilgili çalışmalar yapmıştır. Bu yıllardan sonra polimer damlacığının konik şekli araştırmacılar tarafından Taylor konisi olarak anılmaya başlanmıştır. Taylor konisi, iğne ucundaki polimer damlasının elektriksel çekim kuvvetinin yerçekimi ve yüzey alanı kuvvetlerini yendiği anda oluşur (Sill ve von Recum 2008).

Elektroeğirme yöntemiyle üretilen malzemelerin doku mühendisliği uygulaması olarak ilk kullanımı 1978 gerçekleşmiştir. Bu alışmada Annis ve Bornat poliüretan nanofiberleri vasküler protez olarak kullanmışlardır. 1990'lü yılların başlarından itibaren elektroeğirme teknolojisi biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Sill ve von Recum 2008).



Şekil 2.10 Taylor konisi oluşumu

2.3.2. Elektroeğirme sisteminin özellikleri

Biyomalzeme amaçlı kullanılmak üzere tek boyutlu nano yapıları tasarlaması için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bu teknikler arasında çizme, faz ayırma, self-assembly, nano-kalıp (Ramakrishna 2005), kimyasal buhar çöktürme (CVD) lazer buharlaştırma (Rao ve Govindaraj 2005), eriyik püskürtme gibi yöntemler sayılabilir (Fedorova ve Pourdeyhimi 2007).

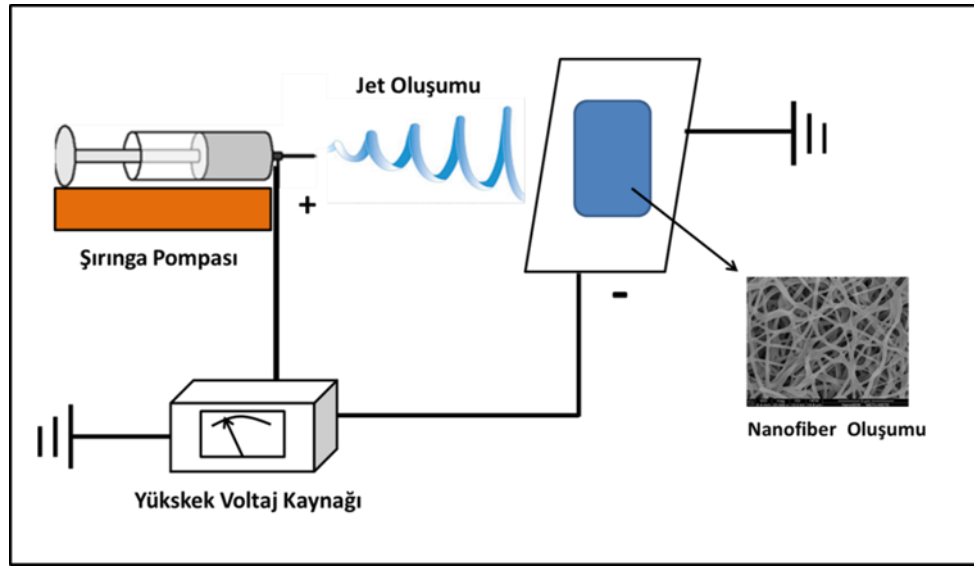
Ancak bu yöntemlerin bazı dezavantajlar mevcuttur. Bahsi geçen tekniklerde kullanılan kimyasallar doğal kaynaklı polimerlerin yapısına zarar vermektedir ve birçok polimer için uygun yöntemler değildir. Tüm bu yöntemlere alternatif olarak elektroeğirme tekniğinde 50 farklı polimerden, örülmemiş ya da doğrusal yapıda nano ve mikrofiberler elde edilebilmiştir (Zhang, Reagan ve ark. 2009).

Elektroeğirme tekniği polimer çözeltiden belirli bir elektrik alan altında, katı ve boşluklu içyapılı, uzun boylarda, homojen çapta ve çeşitli bileşimlerde nanofiber üretimi sağlayan bir yöntemdir (Li ve Xia 2004). Elektroeğirme fabrikasyon tekniğinde kapiler besleme ünitesinde bulunan polimer çözeltisine yüksek voltaj uygulanır. İşlem sırasında oluşan elektrostatik kuvvetler, iğne ağzındaki yerçekimi ve yüzey gerilimi kuvvetlerini yendiğinde sıvı jet meydana gelir. Bu elektriklenmiş jet hızla uzayarak uzun ve ince ipliksi yapılar oluşur. Sıvı jetin devamlı uzaması ve çözücünün buharlaşması sonucunda iletken toplayıcıda fiber çapı mikrometre seviyesinden nanometre seviyesine kadar fiberler oluşur (Min, Lee ve ark. 2004; Kowalewski, NSKI ve ark. 2005).

Bu teknik birçok polimere uygulanabilmesi nedeniyle son dönemdeki doku mühendisliği çalışmalarında büyük bir öneme sahip olmuştur. Bu teknik ile örülmemiş ağ yapıda (non-woven) ya da doğrusal (aligned) yapıda nanoboyutta fiberlerin üretimi mümkündür. Bununla birlikte oluşturulan yüksek yüzey alanı ve poroziteye sahip nanotopografik yüzeyler, hücre dışı matriksin (ECM) besin ve gaz transferi, mekanik destek gibi kimyasal ve fiziksel fonksiyonlarını taklit edecek özelliktedir. Özellikle örülmemiş ağ yapıda (non-woven) olan fiberler hücre dışı matriksteki kollajen ağ yapısının nanotopografisiyle benzerlik gösterir (Min, Lee ve ark. 2004).

Sistemdeki çözelti özellikleri (moleküler ağırlık ve vizkozite, yüzey gerilim kuvveti, iletkenlik), işlem parametreleri (uygulanan voltaj, akış hızı, iğne ile toplayıcı arası mesafe), çevre koşulları (sıcaklık, nem, atmosfer cinsi, sıcaklık) gibi değişkenlerin optimize edilmesiyle başta doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere farklı porozitelere ve degradasyon oranlarına sahip biyomalzemeler üretilabilmektedir (Zhang, Reagan ve ark. 2009).

Bu tezde kullanılan deney düzeneği Şekil 2.11’de şematik olarak verilmiştir. Deney düzeneği genel olarak yüksek voltaj kaynağı, şırınga pompası, toplayıcı ve pleksiglastan yapılmış kapalı bir hücreden oluşmaktadır.



Şekil 2.11 Elektroëirme sistemi

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bombyx mori kozası (Bursa Koza Birlik, Bursa)

Sodyum bikarbonat (NaHCO_3) - Sigma & Aldrich, Inc. (Almanya)

Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) - Sigma & Aldrich, Inc. (Almanya)

Metanol (CH_3OH) – Merck & Co, Inc. (Almanya)

Kalsiyum klorür (CaCl_2) - Sigma & Aldrich, Inc. (Almanya)

Formik asit - Merck & Co, Inc. (Almanya)

Piridin - Sigma & Aldrich, Inc. (Almanya)

Klorosülfonik asit (HSO_3Cl) - Sigma & Aldrich, Inc. (Almanya)

Sodyum hidroksit (NaOH) - Merck & Co, Inc. (Almanya)

Hidroklorik asit (HCl) - Merck & Co, Inc. (Almanya)

Poli(etilenimin) (PEI); Mw 750.000 %50 (w/v) suda

Gümüş nitrat (AgNO_3) - Sigma & Aldrich, Inc. (Almanya)

İzopropanol - Sigma & Aldrich, Inc. (Almanya)

Glutaraldehit (GA) - Sigma & Aldrich, Inc. (Almanya)

Diyaliz membranı (12kDa) - Sigma & Aldrich, Inc. (Almanya)

3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2-5-difeniltetrazolyum bromit (MTT)-Sigma & Aldrich, Inc. (A.B.D.)

Dulbecco's MEM (BIOCHROM, Berlin)

PBS Dulbecco (BIOCHROM, Berlin)

Trypsin/EDTA (BIOCHROM, Berlin)

L-Glutamin (BIOCHROM, Berlin)

Fetal Sığır Serum (FBS) (BIOCHROM, Berlin)

Penisilin/Streptomisin (BIOCHROM, Berlin)

L929 Fibroblast Hücresi (Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürlüğü)

Staphylococcus aureus ATCC (American Type Culture Collection) 6538

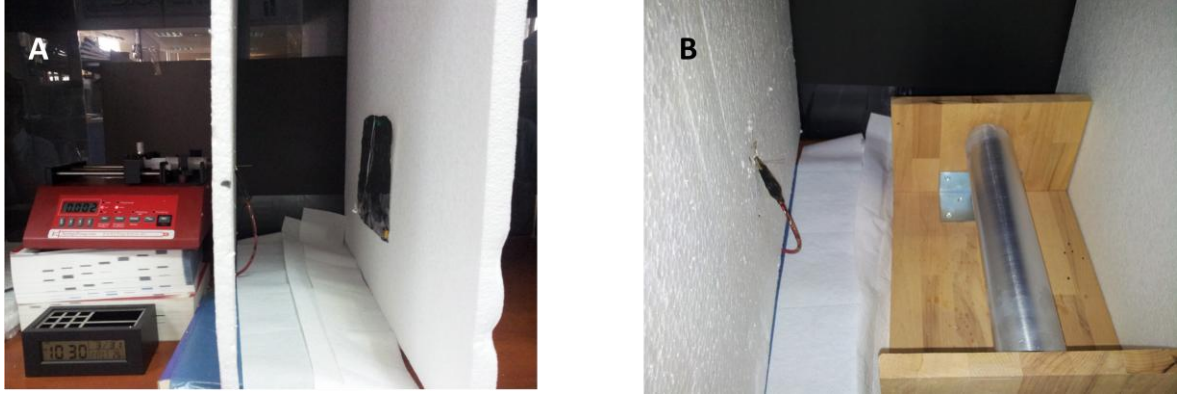
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442

Triptic Soy Agar (TSA; Acumedia Manufactures Inc. Lansing, Michigan)

3.2. Yöntem

3.2.1. Elektroeğirme sisteminin kurulması

Bu çalışmada kullanılan elektroeğirme sistemi el yapımı bir sistem olup, bir adet yüksek voltaj kaynağı (Gamma High Voltage Research, Model ES40P-20W), bir adet şırınga pompası (NE-1000 Family of Programmable Syringe Pumps, Model NE-3000) ve toplayıcıdan oluşmaktadır (Şekil 3.1). Sistemin topraklaması için bina topraklama sistemi kullanılmış ve yüksek voltaj kaynağı şehir şebekesinin akım değişimlerinden etkilenmemesi için kesintisiz güç kaynağına bağlanmıştır. Daha sonra polimer çözeltileri şırınga içerisine konarak şırınga pompasına yerleştirilmiş ve akış hızı kullanılan polimerin derişimine göre ayarlanmıştır. Yüksek voltaj kaynağının pozitif ucunun “+” enjektörün ucuna krokodil uçlu kablo yardımıyla bağlantısı yapılmıştır. Yüksek voltaj kaynağının negatif ucu “-” ile toprak hattından gelen negatif uç toplayıcı plakaya bağlanmıştır. Şırınganın kapiler iğne ucu ile toplayıcı arasındaki uzaklık ayarlandıktan sonra iğne ucuna yüksek voltaj uygulanmıştır. İğne ucundan çıkan jet alüminyum folyo üzerine rastgele dağılmış nanofiberler gözlemlenmiştir.

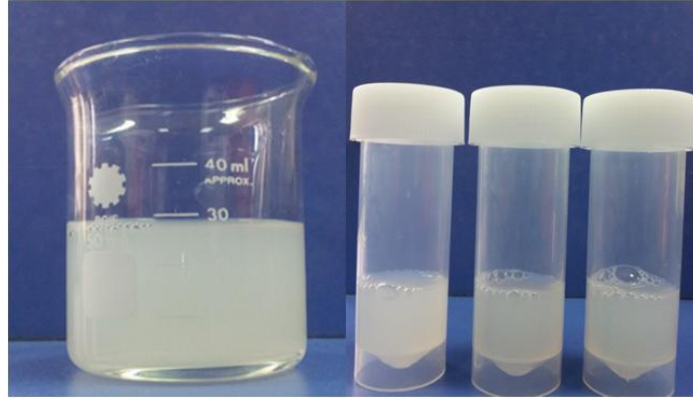


Şekil 3.1 Elektroeğirme sistemi; A) Düz plaka toplayıcı, B) Döner silindir toplayıcı

3.2.2. Nanofiberlerin üretimi

3.2.2.1. İpek fibroin sulu çözeltisinin hazırlanması

Bu çalışmada, Bursa Koza Birlik'ten alınan *Bombyx mori* ipeğinden elde edilen fibroin proteini kullanılmıştır. Bu amaçla, içlerinden böceği çıkarılmış kozalar %0.5 (w/v)'lik NaHCO_3 alkali çözeltisinde 100°C 'de 1 saat boyunca kaynatılarak serisin proteinini uzaklaştırılmıştır. Daha sonra elde edilen ipek fibroin fiberler ılık distile suda 3 kez yıkanmış ve yıkanan fiberler 24 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. Bu aşamadan sonra elde edilen ipek fibroin fiberlerini çözmek için CaCl_2 , etanol ve distile su'dan oluşan ($\text{CaCl}_2/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$, molar oranları:1:2:8) Ajisawa çözeltisi kullanılmıştır. İpek fiberler Ajisawa çözeltisinde 70°C 'de 3 saat boyunca çözülmüştür. Fibroin içerisindeki çözünmeyen safsızlıklardan kurtulmak için elde edilen çözelti 4000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj cihazında (Eppendorf 5430 R Almanya) santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen polimer çözeltisindeki tuz ve alkolü uzaklaştırmak için diyaliz membranları (12kDa) ile üç gün boyunca diyaliz edilmiştir. Diyaliz suyunun çözeltisi ilk üç saatte saat başı, diğer zamanlar ise 12 saatte bir değiştirilmiştir. Ortamdan uzaklaşan Ca^{+2} iyonunun tayini % 5 (w/v)' lik AgNO_3 çözeltisi ile yapılmıştır. Bilindiği üzere AgNO_3 , Ca^{+2} iyonunun indikatörüdür ve ortamdaki Ca^{+2} varlığında beyaz bir çökelek oluşturur. Tüm bu işlemlerin sonunda ipek fibroin sulu çözeltisi (Şekil 3.2) elde edilmiştir. Bu çözelti çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmak üzere $+4^\circ\text{C}$ 'de buzdolabında saklanmıştır (Min, Lee ve ark. 2004).



Şekil 3.2 İpek fibroin sulu çözeltisi

3.2.2.2. İpek fibroin süngerlerin hazırlanması

İpek fibroin sulu çözeltisi (+4°C'de) -20°C'de 6 saat boyunca dondurulduktan sonra ortamdaki suyu uzaklaştırmak için 24 saat liyofilizatörde (Heto PowerDry PL3000,Denmark) kurutulmuştur. Elde edilen ipek fibroin süngerler nanofiber üretiminde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 İpek fibroin süngerler

3.2.2.3. İpek fibroin süngerlerin sülfatlanması

Sülfatlanmış ipek fibroinler için Bölüm 3.2.2.2'de hazırlanan fibroin süngerleri kullanılmıştır. Bu amaçla 10 mL klorosülfonik asit çözeltisi, 60 mL piridin çözeltisine buz banyosunda yavaş yavaş eklenmiştir. Daha sonra elde edilen çözeltiye 1g ipek fibroin süngerlerden eklenmiştir ve sistem geri soğutucu altında 80°C'ye yavaş yavaş ısıtılmıştır. Sülfatlama reaksiyonu 1.5 saat boyunca

sürdürülmüştür. Reaksiyon bitiminde sisteme 200 mL distile su eklenmiştir. Daha sonra 0.1N NaOH çözeltisi kullanılarak nötrleştirilmiştir. Ortamdaki safsızlıklardan kurtulmak için çözelti vakum filtrasyon yöntemiyle süzölmüştür. Sülfatlanmış fibroin polimerini çöktürmek için sisteme 500 mL etanol eklenmiş ve sülfatlanmış fibroinler 4000 rpm de 5 dakika santrifüjde çöktürölmüştür. Elde edilen çökelti az miktarda distile su kullanarak çözüldükten sonra 3 gün boyunca 12 kDa molekül ağırlığına sahip diyaliz tüplerinde distile suya karşı diyalize bırakılmıştır. Diyaliz çözeltisi ilk 3 saat boyunca saat başı diğer zamanlar ise 12 saatte bir değiştirilmiştir. Elde edilen sülfatlanmış ipek fibroin sulu çözeltisi kullanılmak üzere +4°C'de buzdolabında saklanmıştır (Tamada 2004).

3.2.2.4. Fibroin nanofiberlerin üretimi

Bölüm 3.2.2.2'de hazırlanan ipek fibroin süngerler formik asit içinde çözölerek farklı derişimlerde (% 8, 12, 13, 15, 20) fibroin çözeltileri elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra fibroin çözeltileri şırınga içine doldurularak, şırınga pompasına yerleştirilmiş ve 0.1 µL/dk akış hızı ile 10-17 kV arasında farklı voltajlar uygulanarak, 13 cm mesafedeki toplayıcı üzerinde fiber oluşumları sağlanmışır. Elektroeğirme sisteminde düzgün fiberler elde etmek için değiştirilen parametreler Tablo 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 İpek fibroin nanofiber üretimine ait elektroeğirme parametreleri

Fibroin çözeltisi derişimi (w/v)	Mesafe (cm)	Uygulanan Voltaj (kV)	Akış Hızı µL/dk	Gözlemler
%8	13	10	0.1	Boncuklanma
%12	13	15	0.1	Düzgün nanofiberler
%13	13	17	0.1	Düzgün nanofiberler
%15	13	17	0.1	Düzgün nanofiberler
%20	13	17	0.1	Düzgün nanofiberler

3.2.2.5. Ag/Fibroin kompozit nanofiberlerin üretimi

Antimikrobiyal özelliğı birçok çalışmayla kanıtlanmış Ag nanopartiköller içeren fibroin bazlı nanofiberler hazırlamak için %13 (w/v)'lük ipek fibroin/formik asit çözeltilerine ağırlıkça %0.5 %1 ve %2 oranlarında AgNO₃ çözeltisi katılmışır. Hazırlanan çözeltiler şırınga içine konarak 0.1 µL/dk akış hızı ile 17 kV voltaj

uygulanarak nanofiberler oluşumları gözlenmiştir. Nanofiberlerin yüzeyinde Ag nanopartiküllerin oluşturulması için nanofiberler 30 dakika boyunca 254 nm dalga boyunda UV ışık altında bekletilmiştir (Hong, Park ve ark. 2006). Elektroeğirme sisteminde uygulanan parametreler Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Ag/Fibroin nanofiber üretimine ait elektroeğirme parametreleri

Malzeme	AgNO ₃ Derişimi (w/v)	Mesafe (cm)	Uygulanan Voltaj (kV)	Akış Hızı μ L/dk	Gözlemler
Ag/Fibroin	%0.5	13	17	0.1	Düztün nanofiberler
Ag/Fibroin	%1	13	17	0.1	Düztün nanofiberler
Ag/Fibroin	%2	13	17	0.1	Düztün olmayan nanofiber

3.2.2.6. PEI/Fibroin kompozit nanofiberlerin üretimi

Polikasyonik ve antibakteriyel bir polimer olan PEI, ağırlıkça %10, %20 ve %30 oranlarında fibroin süngerlerle birlikte formik asit içinde çözülerek, toplam çözelti derişimi %15 (w/v) olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra sistemdeki nanofiber parametreleri optimize edilmiştir. Farklı derişimlerdeki PEI/Fibroin çözeltisi şırınga içine konarak 0.1 μ L/dk akış hızı ile 17 kV voltaj uygulanarak 13 cm mesafedeki toplayacı üzerinde nanofiberlerin oluşumları gözlenmiştir. Nanofiber üretiminde kullanılan PEI ağırlıkça %10, %20 ve %30 oranlarında katılarak elde edilen fiberler sırasıyla PEI(10)/Fibroin, PEI(20)/Fibroin ve PEI(30)/Fibroin olarak isimlendirilmiştirlerdir.

Çizelge 3.3 PEI/Fibroin nanofiber üretimine ait elektroeğirme parametreleri

Malzeme	PEI derişimi (w/v)	Mesafe (cm)	Uygulanan Voltaj (kV)	Akış Hızı μ L/dk	Gözlemler
PEI(10)/Fibroin	%10	13	17	0.1	Düztün nanofiberler
PEI(20)/Fibroin	%20	13	17	0.1	Düztün nanofiberler
PEI(30)/Fibroin	%30	13	17	0.1	Düztün nanofiberler

3.2.2.7. Sülfatlanmış fibroin nanofiberlerin üretimi

Sülfatlanmış ipek fibroin nanofiberlerin üretimi için daha önceden hazırlanmış +4°C'de saklanan sülfatlanmış ipek fibroin sulu çözeltisi 24 saat -20°C'de dondurulduktan sonra, bir gün boyunca liyofilize edilerek sülfatlanmış ipek fibroin süngeler elde edilmiştir. Bu süngerler formik asit çözeltisinde çözülerek %13 (w/v)'lük çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti şırınga içine konarak 0.1 µL/dk akış hızı ile 17 kV voltaj uygulanarak 13 cm mesafedeki toplayıcı üzerinde nanofiberlerin oluşumları gözlenmiştir. Sülfatlanmış fibroin nanofiberler S/Fibroin olarak isimlendirilmişlerdir.

3.2.3. Nanofiberlerin sulu ortamda kararlı hale geçirilmesi

Elde edilen nanofiberlerin mekanik dayanımını arttırmak ve sulu ortamda degradasyonlarını önlemek için aşağıda verilen yöntemlerle glutaraldehit (GA) buharına maruz bırakılmış veya metanol muamelesinden geçirilmiştir.

3.2.3.1. Nanofiberlere glutaraldehit buharı muamelesi

Elde edilen Fibroin, PEI/Fibroin ve Ag/Fibroin nanofiberlerin sulu ortamda kararlılıklarını artırmak için glutaraldehit (GA) ile çapraz bağlanmıştır. Bu amaçla nanofiber membranlar, 20 mL %25'lik GA çözeltisi içeren desikatör içindeki bir tepsi üzerinde 0.5, 1, 3, 6, 12 ve 24 saatleri boyunca GA buharında inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler saf su ile 24 saat boyunca yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen kararlı nanofiber membranlar Fibroin-G, PEI/Fibroin-G ve Ag/Fibroin-G olarak adlandırılmışlardır.

3.2.3.2. Nanofiberlere metanol muamelesi

İpek fibroin ve sülfatlanmış ipek fibroin fiberleri kararlı hale geçirmek için %90 (v/v)'lık metanol kullanılmıştır. Nanofiber membranlar 10 dakika boyunca %90 (v/v)'lık metanol çözeltisinde bekletilerek daha sonra 3 kez distile su ile yıkanmış ve 24 saat kurumaya bırakılmışlardır. Bu nanofiber membranlar Fibroin-M, S/Fibroin-M olarak adlandırılmışlardır.

3.2.4. Nanofiberlerin karakterizasyonu

3.2.4.1. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

Nanofiberlerin morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM, Nova NanoSEM) ile incelenmiştir. Nanofiberlerin ortalama çaplarını hesaplamak için Image J programından faydalanarak 80.000 büyütmedeki bütün fiberlerin çapı ölçülmüş ve ortalaması alınmıştır.

3.2.4.2. Fourier transform infrared (FT-IR) analizi

Nanofiber membranların yapısal analizleri için Fourier Transform Infrared (FT-IR) (Perkinelmer Spectrum BX FT-IR system (A.B.D) spektroskopisi kullanılmıştır. Membranların yapısal tayini cihazın ATR eklentisi kullanılarak yapılmıştır.

3.2.4.3. Termal analizler

3.2.4.3.1. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi

Nanofiber membranların DSC analizleri “Perkin Elmer Diamond DSC” cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz tarama hızı 10°C/dk ve sıcaklık aralığı 0-300°C olarak kullanılmıştır. Deney nitrojen gazı ortamında gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3.2. Termogravimetrik analiz (TGA)

Nanofiber membranların TGA analizleri “Setaram Labsys TGA” cihazında gerçekleştirilmiştir. Analiz tarama hızı 10°C/dk ve sıcaklık aralığı 25-800°C’dir. Deney ortamı nitrojendir.

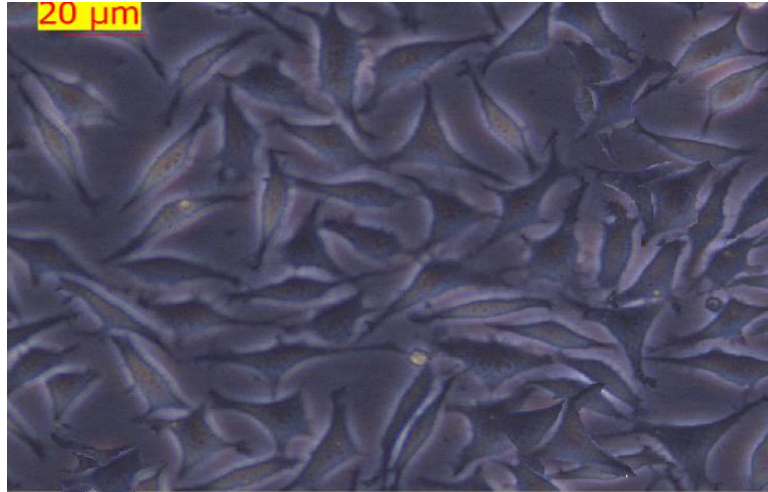
3.2.5. Yüzey özellikleri

Nanofiber membranların temas açıları “Attension Theta” temas açısı ölçüm cihazıyla incelenmiştir. Temas açılarının ölçümü, membranların üzerine 0.8 µL ultra saf su damlası damlatılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Sitotoksosite testleri

Nanofiber membranların sitotoksisite testleri ISO 10993-5:2009(E) standardına göre indirekt sitotoksosite testi ile incelenmiştir. Nanofiber membranlar test öncesi UV ışığında 1 saat boyunca steril edilmişlerdir. Nanofiber membranların

sitotoksitelerinin belirlenmesi amacıyla 5x5mm boyutunda kesilerek 24 kuyucuklu petri kaplarına yerleştirilmiş, 1,8 mL besi yeri (%90 DMEM, %10 FBS %1 L-Glutamin %0,2 Penisilin/Streptomisin) eklenerek, inkübatörde (Thermo Scientific HeraCell (Almanya)) (37°C ve %5 CO₂) 72 saat bekletilmiştir. Daha sonra 1x10⁴ L929 fibroblast hücresi 96 kuyucuklu petri kaplarına ekilerek inkübatörde (37°C ve %5 CO₂) 24 saat kültür edilmiştir. Daha sonra kuyucuklardan besiyerleri çekilerek, üzerlerine 72 saat boyunca nanofiberlerin içinde bekletildiği besiyerleri eklenmiştir. Hücreler bu besiyerleriyle 24 saat inkübe edilmiştir. % Hücre canlılığını belirlemek için MTT testi uygulanmıştır. Bu amaçla hücrelerin 24 saat inkübasyonlarından sonra kuyucuklara 100 µL hücre kültür ortamı ve PBS içinde hazırlanmış 1 mg/mL derişimindeki 25 µL MTT çözeltisi eklenerek 4 saat inkübatörde kültür edilmiştir. Daha sonra hücrelerin oluşturduğu formazan kristallerini açığa çıkarmak ve hücre zarlarını parçalamak amacıyla kuyucuklara izoopropanol/HCl çözeltisi eklenmiştir. Yarım saat boyunca karanlık ortamda tutulan hücrelerin absorbansları 570 nm’de mikroparka okuyucuda okunmuştur. Nanofiberlerin maruz bırakılmadığı besiyeri eklenen kuyucuktaki hücrelerin verdiği absorbans %100 kabul edilip, % hücre canlılığı hesaplanmıştır. Deney 6 tekrarlı yapılarak, ortalama değerler alınmıştır.



Şekil 3.4 Kültür edilen L929 fibroblast hücrelerinin ışık mikroskobu (Leica, Germany) görüntüsü

3.2.7. Antibakteriyel aktivite testi

3.2.7.1. Bakteri hazırlanması

Staphylococcus aureus (ATCC 6538) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) bakteri suşları “Mueller Hinton” sıvı besiyerinde (MHB) kültürü yapılarak çalkalayıcı inkübatörde 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün kültür vasatından 1 mL alınıp taze MHB içine aktarıldıktan sonra erken logaritmik faza ulaşması amacıyla 4 saat kadar 37°C etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda besiyeri 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp bakteri peleti “Ringer” solusyonunda süspanse edilerek başlangıç inokulum miktarı 1×10^8 cfu/mL (colony forming unit) olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.7.2. Antibakteriyel aktivite

Nanofiberler membranların antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmesi için AATCC (American Association of Textile Chemist and Colorist) Kantitatif Test Metodu 100-1999 uygulanmıştır. Bu amaçla nanofiber membranların boyutları 10x10mm olacak şekilde kesilerek, mikrobiyolojik test çalışmaları öncesinde petri kaplarına ağızları kapalı yerleştirilip laminar akışlı kabinde UV ışığı altında steril edilmişlerdir. Daha sonra steril nanofiber membranlar 6 kuyucuklu hücre kültür plaklarına yerleştirilmiştir. Bir gece önceden hazırlanmış bakterilerin derişimleri 1×10^7 cfu/mL olacak şekilde seyreltilmiştir. Daha sonra bakteri çözeltisinde her numunenin üzerine 20’şer μ L eklenerek, 37°C’de 5 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası her örneğe 1 mL steril distile su eklenmiş ve örnekler 30 saniye vortekslenmiştir. Koloni sayımı için, her örneğin 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} dilüsyonları yapılarak her dilüsyondan 3 kez olmak üzere ve “Miles & Misra” tekniği kullanılarak Triptik Soy Agar (TSA) besiyeri içeren petri plaklarına ekimleri yapılmıştır (Miles, Misra ve ark. 1938). Bakterilerin 37°C’de 24 saatlik inkübasyon sonrası oluşan koloniler sayılarak bakteri sayısı cfu/mL olacak şekilde hesaplanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Nanofiberlerin Üretimi

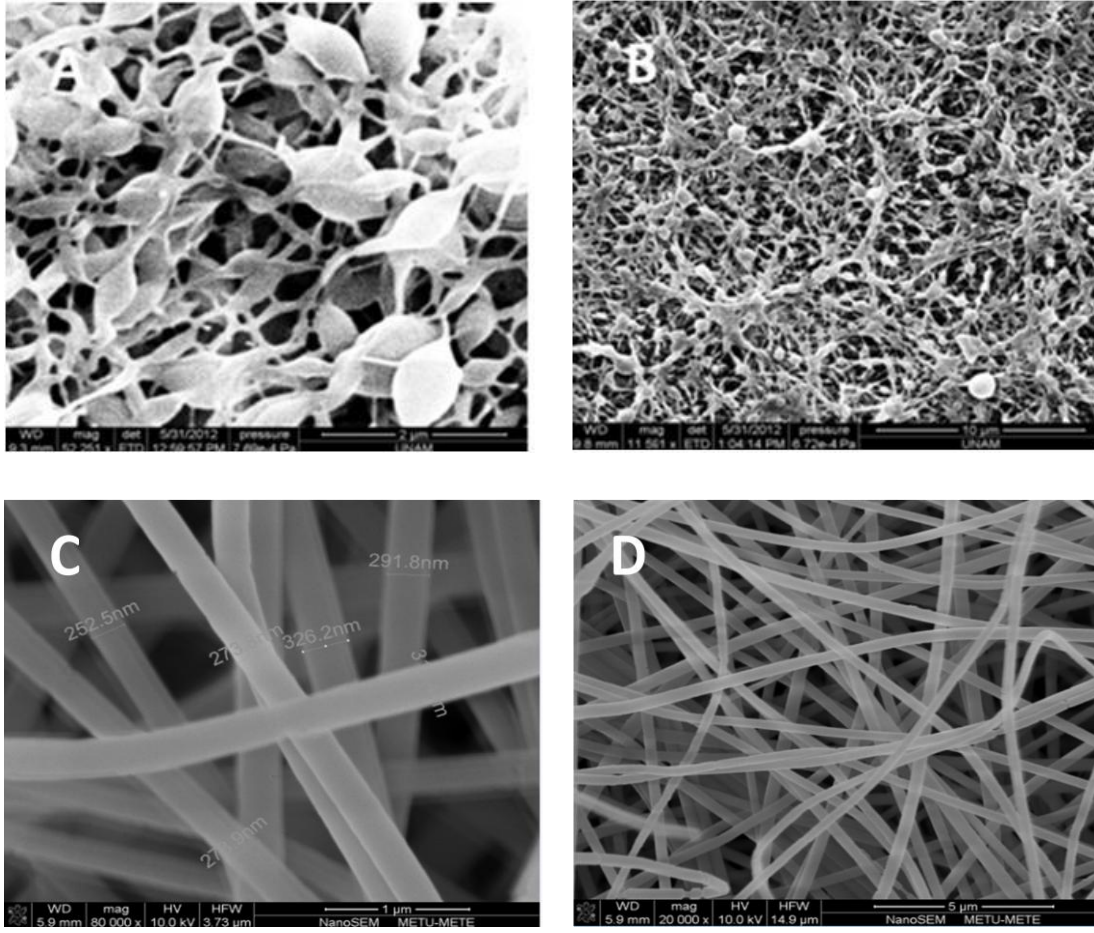
Bu çalışmada, elektroğirme sistemi ile çeşitli derişimlerde ipek fibroin çözeltileri kullanılarak fibroin nanofiberleri, çeşitli derişimlerde Ag nanopartiküller içeren Ag-fibroin kompozit nanofiberler, benzer şekilde farklı polietilenimin içeren PEI-fibroin kompozit nanofiberleri ve sülfatlanmış fibroin çözeltisinden elde edilen nanofiberler, 0.1 µL/dk akış hızı ile 10 ile 17 kV arasında voltaj uygulanarak 13 cm mesafedeki toplayıcı üzerinde üretilmiştir.

Düzgün ve homojen nanofiber üretimi için temel sistem parametreleri; akış hızı, uygulanan voltaj ve polimer derişimi optimize edilmiş, bu şartlarda üretilen nanofiberler, biyonanotekstiller olarak kullanılmak üzere ileriki çalışmalar için seçilmiştir.

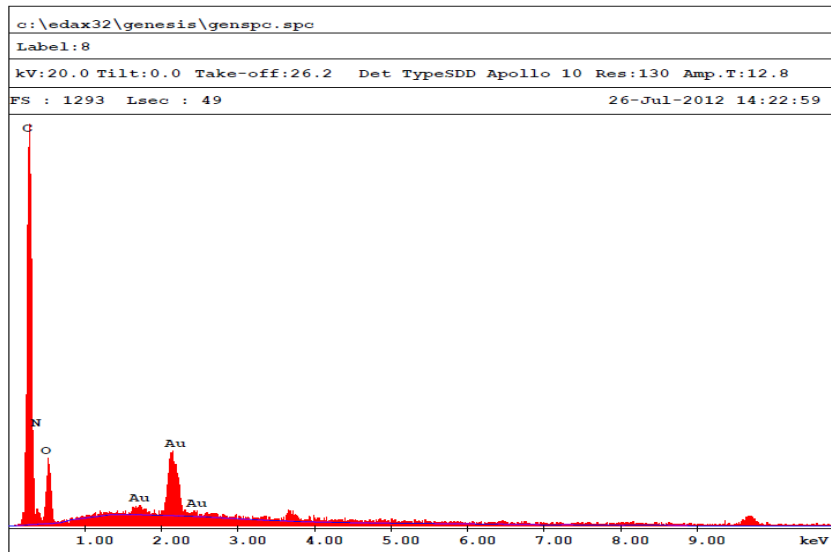
Genel olarak düşük çözelti derişimlerinde (%1-10) homojen ve düzgün nanofiberler elde edilememiş, “boncuk” şeklinde yapıların oluştuğu gözlenmiştir. Çözelti derişimi %10-20 arasında ise düzgün yapıda, homojen, çapları 33 nm ile 332 nm arasında değişen nanofiber ağlarının oluştuğu gözlenmiştir. Detaylar aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

4.1.1. Fibroin nanofiberler

Elektroğirme sisteminde, fibroin çözelti derişimleri (%8 12, 13, 15, 20 (w/v)) hazırlanarak nanofiberler üretilmiş ve yapıları SEM ile incelenmiştir. % 8 (w/v)'lik fibroin çözeltisinde 0.1 µL/dk akış hızı ile 10 kV voltaj uygulanarak 13 cm mesafedeki toplayıcı üzerinde elde edilen membranlar incelendiğinde düzgün fiber oluşumların olmadığı, boncuklanmaların olduğu görülmüştür (Şekil 4.1). %10-20 (w/v) arasındaki çözelti derişimleri kullanılarak, aynı akış hızında 15 kV ve 17 kV voltaj uygulamalarında ise homojen, düzgün nanofiber ağları elde edilmiştir. Fibroin nanofiberler arasından %13 (w/v) derişimde ve 246 nm ortalama çapa sahip, uygun homojenliği gösteren nanofiberler, modifiye edilmek üzere tekstil malzemesi olarak seçilmiştir. Fibroin nanofiberlerin EDAX analizleri incelendiğinde fibroin protein iskeletinde bulunan C, N ve O elementlerinin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Tezin ileriki aşamalarında bu derişimdeki nanofiberler sadece “Fibroin” olarak anılacaktır.



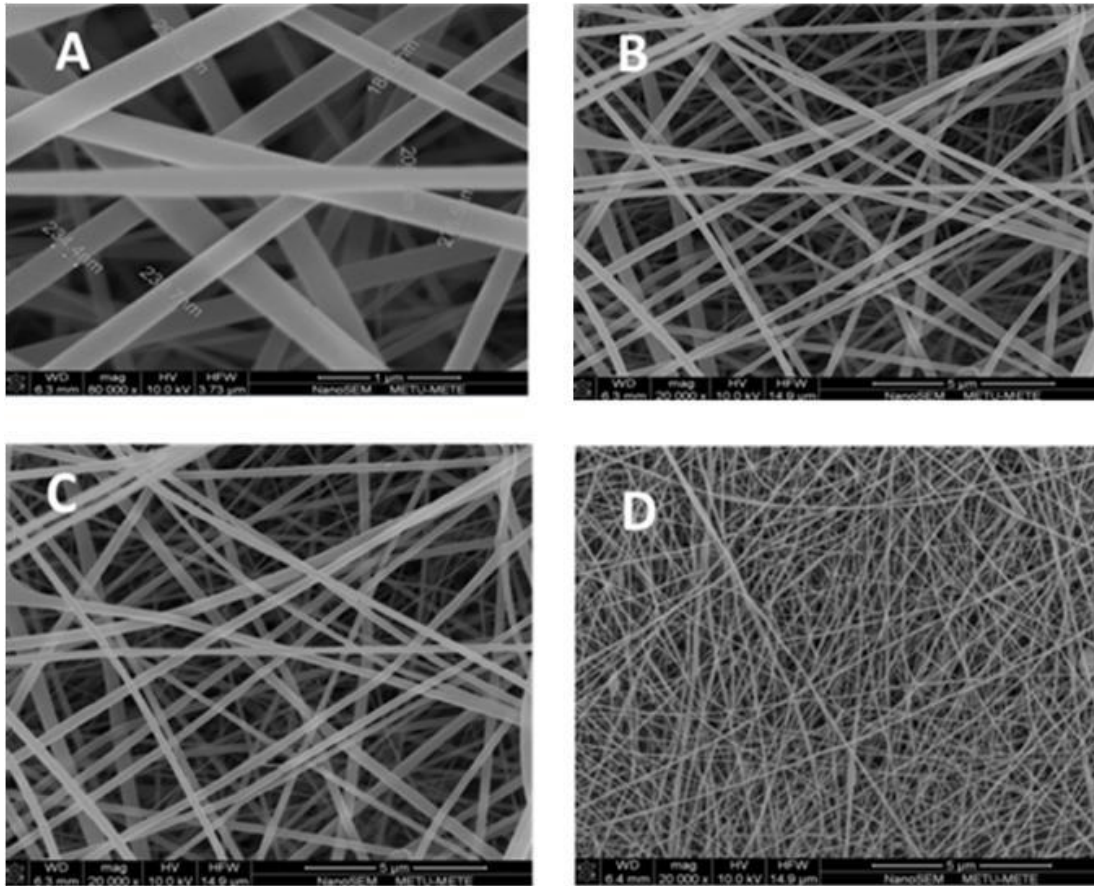
Şekil 4.1 Fibroin nanofiberler; A) % 8 (w/v) Fibroin (Skala bar 1 μm), B) %8 (w/v) Fibroin (Skala bar 10 μm), C) %13 (w/v) Fibroin (Skala bar 1μm), D) %13 (w/v) Fibroin (Skala bar 5μm)



Şekil 4.2 Fibroin nanofiberlerin EDAX sonuçları

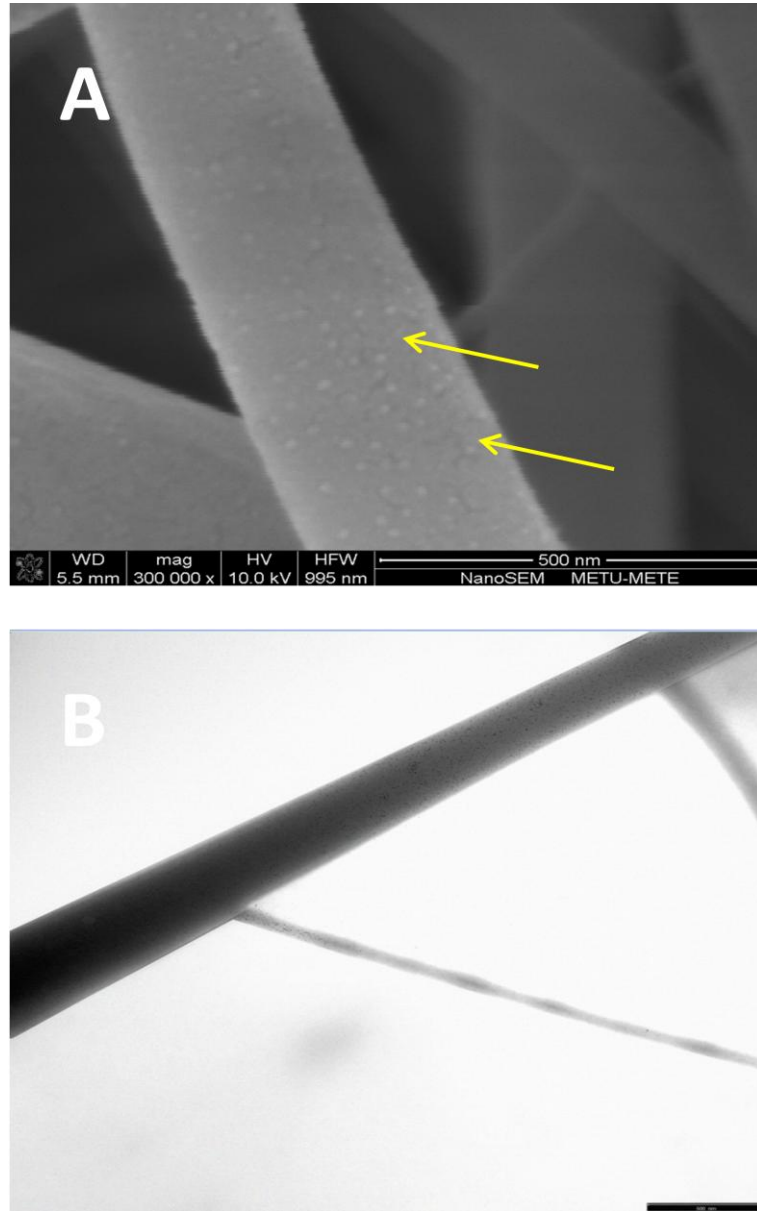
4.1.2. Ag/Fibroin nanofiberler

Elektroeğirme sisteminde, %13 (w/v)'lük fibroin çözeltisine ağırlıkça % 0.5 ve %1 oranlarında AgNO_3 katılmasıyla üretilen membranlarda homojen ve düzgün nanofiberlerin oluştuğu gözlenmiştir. % 0.5 (w/v) AgNO_3 içeren çözeltiden ortalama 181 nm çapa sahip fiberler elde edilirken, %1 (w/v) AgNO_3 derişiminde 70 nm ortalama çapa sahip nanofiberler elde edilmiştir. Çözeltideki AgNO_3 derişimi % 2 (w/v)'ye çıkarıldığında nanofiber oluşumu gözlenmemiştir. AgNO_3 derişimi % 0.5'ten %1'e artırıldığında nanofiber çaplarında meydana gelen azalmanın çözeltiye geçen Ag^+ iyonlarının şırınganın (+) ucunu daha kuvvetli pozitif yüklemesinden kaynaklanmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Böylece daha düzgün ve homojen nanofiberler elde edilmiştir. Tezin ileriki aşamaları için %1 (w/v) AgNO_3 içeren fibroin çözeltisinden elde edilen nanofiber ağları (Ag/Fibroin) çalışılmak üzere seçilmiştir.



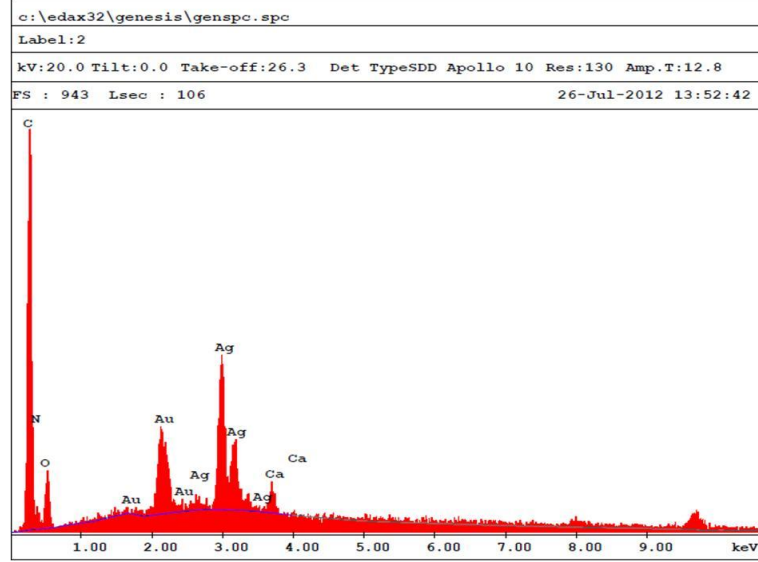
Şekil 4.3 Ag/Fibroin nanofiberler; A) ve B) % 0.5 (w/v) Ag/Fibroin, C) ve D) %1 (w/v) Ag/Fibroin, (A) ve (C) skala bar 1µm, (B) ve (D) skala bar 5µm

Ag/Fibroin nanofiberlerin yüzeyinde UV ışığı kullanarak Ag nanopartiküllerin oluşumu teşvik edilmiştir (Hong, Park ve ark. 2006; Lu, Mei ve ark. 2007). Nanofiber membranlar 30 dakika 254 nm’de UV ışığına maruz bırakıldıktan sonra yüzeylerinde Ag nanopartiküllerin olduğu SEM ve TEM ile izlenmiştir. Nanofiberlerin yüzeyinde yaklaşık 5-20 nm arasında değişen gümüş nanopartiküllerin olduğu gözlenmiştir. Ag/Fibroin yüzeyinde oluşan nanopartiküllerin SEM ve TEM görüntüleri Şekil 4. 4.’te verilmiştir.



Şekil 4.4 Ag/Fibroin nanofiber yüzeyindeki Ag nanopartiküller (% 1 w/v);
A) SEM görüntüsü (skala bar 500 nm), B) TEM görüntüsü (skala bar 500 nm)

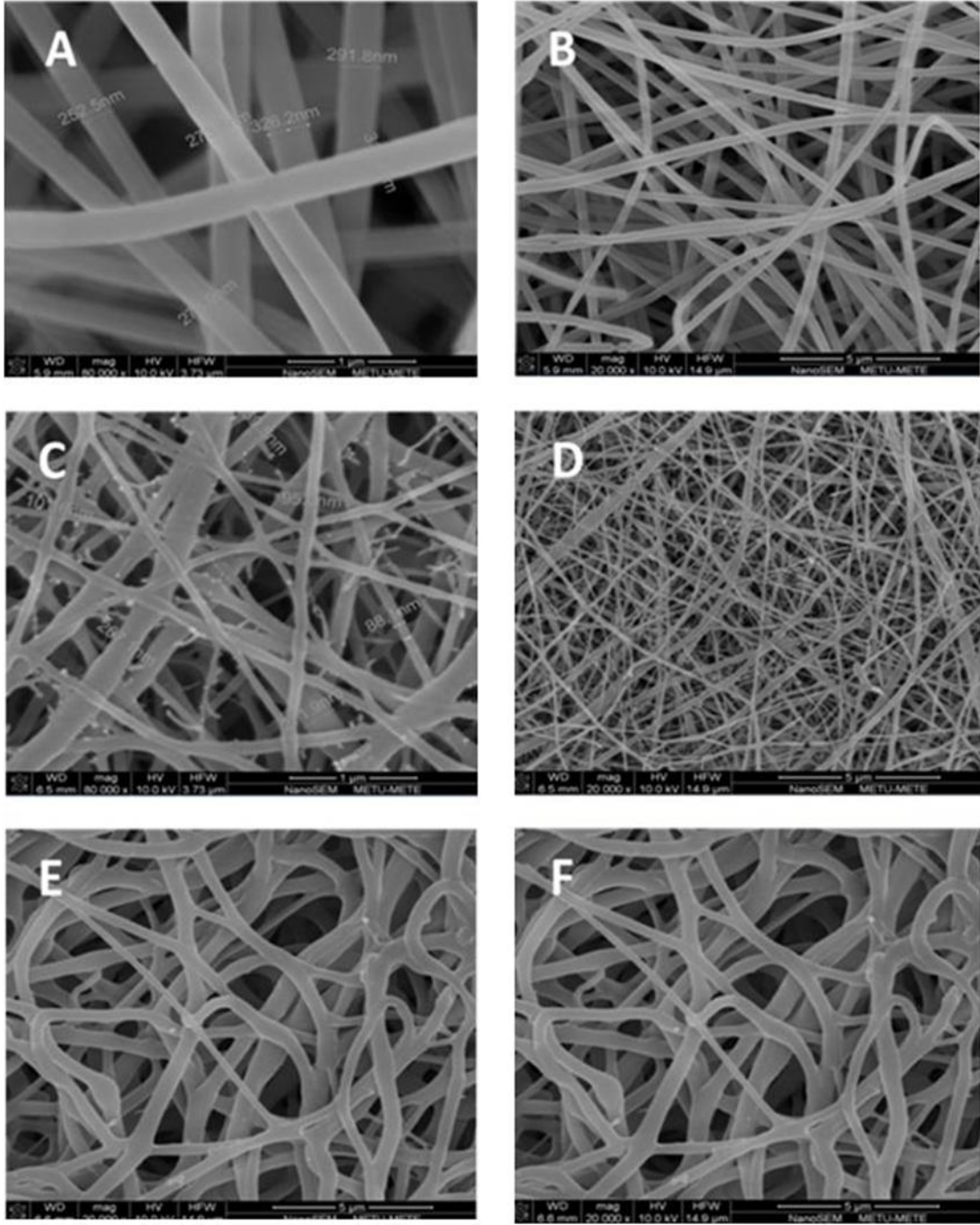
Ag/Fibroin nanofiberlerin EDAX analizleri incelendiğinde fibroin proteininin iskeletinde bulunan C, N ve O elementlerinin yanı sıra nanofiberler arasında bulunan Ag nanopartiküllerden gelen Ag pikine de rastlanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Ag/Fibroin nanofiberlerin EDAX sonuçları

4.1.3. PEI/Fibroin kompozit nanofiberler

Polikatyonik bir polimer olan PEI, bu çalışmada ipek fibroin nanofiberlere antibakteriyel özellik kazandırması amacıyla farklı yüzdelerde PEI/Fibroin nanofiberleri elde edilmiştir (Şekil 4.6). Hazırlanan çözeltilerin toplam polimer derişimi %15 (w/v) olacak şekilde PEI polimeri ipek fibroine ağırlıkça %10, %20 ve %30 oranlarda katılmıştır. PEI(10)/Fibroin, PEI(20)/Fibroin ve PEI(30)/Fibroin nanofiberlerde sırasıyla 144, 210 ve 236 nm ortalama çapa sahip fiberler elde edilmiştir. Farklı PEI derişimlerinde hazırlanan çözeltilerden elde edilen nanofiberlerin çaplarının PEI derişimi arttıkça arttığı görülmüştür. Düşük derişimlerde (%10 ve %20) PEI/Fibroin nanofiberler (Şekil 4.6 A-D) düzgün dağılım gösterirken, daha yüksek derişimlerde nanofiber çaplarının arttığı ve fiber homojenliğinin ve kararlılığın bozulduğu izlenmiştir (Şekil 4.6 E-F).

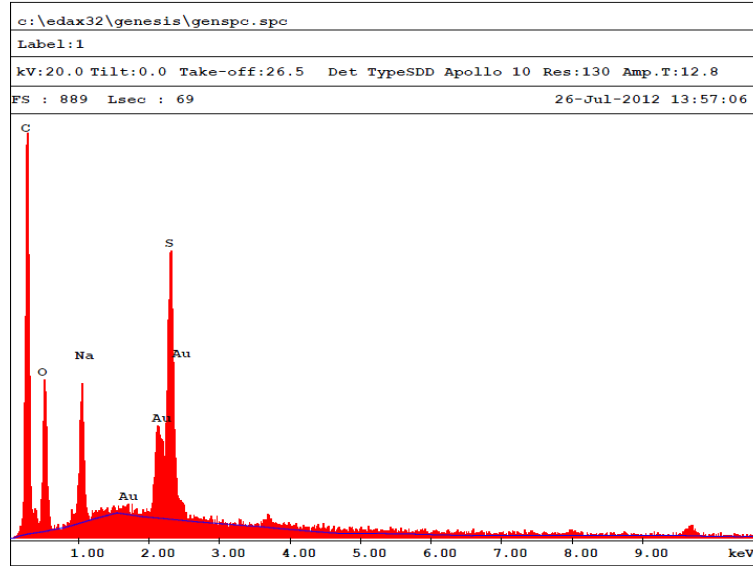


Şekil 4.6 PEI/Fibroin nanofiberler; A ve B) PEI(10)/Fibroin, C ve D) PEI(20)/Fibroin, E ve F) PEI (30)/Fibroin. (A, C ve E'de skala bar 1µm, B, D ve F'de skala bar 5 µm)

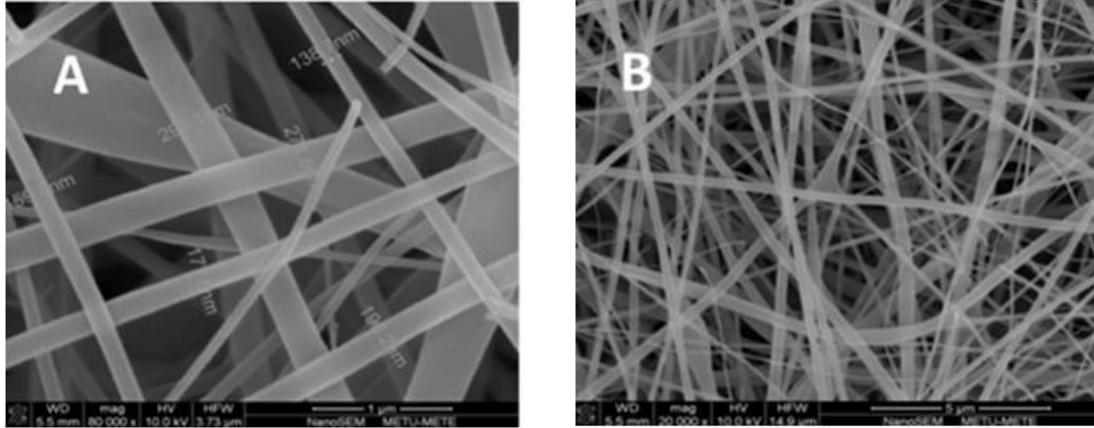
4.1.4. Sülfatlanmış fibroin nanofiberler

Liu ve ark. tarafından yapılan çalışmada ipek fibroin moleküllerine sülfat grupları takarak, antikoagulan özelliğe sahip heparin benzeri moleküller oluşturulmuş ve heparine yakın antikoagulan özelliğe sahip yüzeyler elde edilmiştir. Bu çalışmada ise antibakteriyel özellikleri incelenmek üzere benzer şekilde sülfatlanmış fibroinlerden elektroçirme yöntemi ile nanofiberler (S/Fibroin nanofiberler) üretilmiştir. %13 (w/v)' lük sülfatlanmış fibroinlerden elde edilen nanofiberlerin homojen olduğu izlenmiş ve ortalama çaplarının 181 nm sahip olduğu bulunmuştur. Aynı şartlarda elde edilen fibroin nanofiberlere göre ortalama fiber çaplarında bir azalma görülmüştür (Şekil 4.8).

Sülfat gruplarının fibroin nanofiberlere bağlandığı FTIR sonuçları ile desteklenmiştir. EDAX analizinde fibroin protein iskeletinden gelen C, N ve O elementlerinin yanı sıra S elementinin kuvvetli bir pikine rastlanmıştır. Bu da fibroin molekülüne SO₂ gruplarının bağlandığının kanıtıdır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Sülfatlanmış Fibroin nanofiberlerin EDAX sonuçları



Şekil 4.8 Sülfatlanmış Fibroin nanofiberler (A: skala bar 1µm, B:skala bar 5 µm)

Sonuç olarak değişik kompozisyonlarda elde edilen nanofiberlerin, % 30 PEI içeren nanofiberler hariç olmak üzere dağınık, homojen bir ağ yapısı sergiledikleri ve ortalama çaplarının 33 ile 332 nm arasında değiştiği gözlenmiştir (Tablo 4.1).

Çizelge 4.1 Hazırlanan nanofiberlerin ortalama çapları

Üretilen Nanofiber membranlar	Fiber Kompozisyonu	Minumum Nanofiber Çapı (nm)	Ortalama Nanofiber Çapı (nm)	Maksimum Nanofiber Çapı (nm)
Fibroin	%13 Fibroin	170	246	279
Ag(1)/ Fibroin	%1 Ag	33	70	93
Ag (1/2)/Fibroin	% 0.5 Ag	104	181	304
PEI (10)/Fibroin	%10 PEI	104	144	183
PEI/(20)Fibroin	% 20 PEI	142	210	248
PEI/(30)Fibroin	% 30 PEI	186	286	332
S/Fibroin	Sülfatlanmış Fibroin	72	181	321

4.2. Nanofiberlerin Sulu Ortamda Kararlı Hale Geçirilmesi

Genel bilgilerde bahsedildiği üzere ipek fibroin proteininin çeşitli konformasyon yapıları vardır. Bunların başlıcaları düzensiz sarmal yapı olarak adlandırılan Silk I yapısı (amorf yapı) sulu ortamda kararsızdır. Diğerleri ise kristalin yapı olarak bilinen silk II yapısı (β -tabakalı) sulu ortamda oldukça karardır. Bu açıdan silk I yapıdan, silk II yapıya geçerek kararlı yapıların elde edilmesi biyomalzemeler için oldukça önemlidir. Bu amaçla literatürde çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bunlar; ısı ile

muamele, mekanik germe, polar organik çözücüler ile muamele etme ve su buharına maruz bırakmaktır. Tüm bu yöntemlere alternatif olarak düzensiz sarmal haldeki fibroin molekülleri çapraz bağlanarak kararlı hale getirilmektedir.

Bu çalışmada kararlı biyonanotekstiller elde etmek amacıyla hazırlanan nanofiberler glutaraldehit (GA) buharına maruz bırakılarak çapraz bağlanması sağlanmış, diğer taraftan metanol muamelesinden geçirilmiştir. Her iki yöntemle hazırlanan nanofiberlerin yapıları incelenmiş ve aşağıda sunulmuştur.

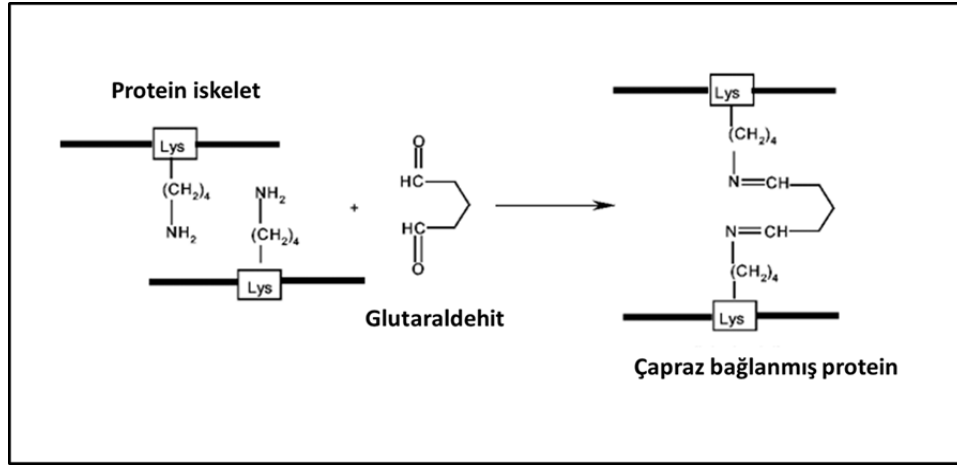
4.2.1. Nanofiberlerin glutaraldehit ile çapraz bağlanması

Hazırlanan nanofiberlerin sulu ortamda fiber yapısını bozmadan kararlı hale getirmek için Glutaraldehit (GA) buharı ile çapraz bağlanmıştır (Fang, Xiao ve ark. 2011). GA, kalp kapağı, vasküler greft, elastik kıkırdak ve yapay deri gibi birçok biyoprotezin stabilizasyonunda sıklıkla kullanılan bir çapraz bağlayıcıdır. GA, yapıda “inter” ve “intramoleküler” kovalent bağ oluşturarak protein zincirlerini birbirlerine bağlamakta ve dolayısı ile yapıların kararlılığını arttırmaktadır. Çapraz bağlanma; protein yapılarındaki lizin veya hidroksilizin amino gruplarının, aldehit grupları ile reaksiyonu (Schiff baz formasyonu) veya iki aldehitin “aldol” kondenzasyonu ile gerçekleşmektedir (Ulubayram, Aksu ve ark. 2002). GA sadece amino grupları ile değil, aynı zamanda karboksi, amido ve protein yapısındaki diğer gruplarla da reaksiyon vermektedir. GA ile proteinler ile çapraz bağlanma reaksiyonu Şekil 4.9’da verilmiştir. GA ile çapraz bağlama biyomalzemelerin in-vivo degradasyonunu önlerken aynı zamanda anatomik bütünlüğünü korumakta ve malzemelerin mekanik dayanımını ve fleksibilitisini artırmaktadır.

Bu çalışmada GA’nın ucuz olması, düşük sıcaklıklarda sulu çözeltide hızlı reaksiyon vermesi ve protein yapısında (albümin, kollajen, jelatin gibi) bulunan birçok amino grupta ve heparin gibi mukopolisakkaritlerle reaksiyon vermesi nedeniyle; fibroin, PEI ve sülfatlanmış fibroin için ortak çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır.

Bu amaçla nanofiber membranlar, Fang ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada olduğu gibi desikatör içerisinde %25 (v/v) GA sulu çözeltisi buharına 24 saat boyunca maruz bırakılmışlardır. Ancak bu süre sonucunda nanofiberlerin GA

ile çapraz bağlanmaları sırasında fiber yapılarını kaybederek bozulmaların başladığı ve 24 saat sonunda film haline dönüştükleri izlenmiştir.



Şekil 4.9 Glutaraldehit ile proteinin çapraz bağlanma reaksiyonu (Ulubayram, Aksu ve ark. 2002)

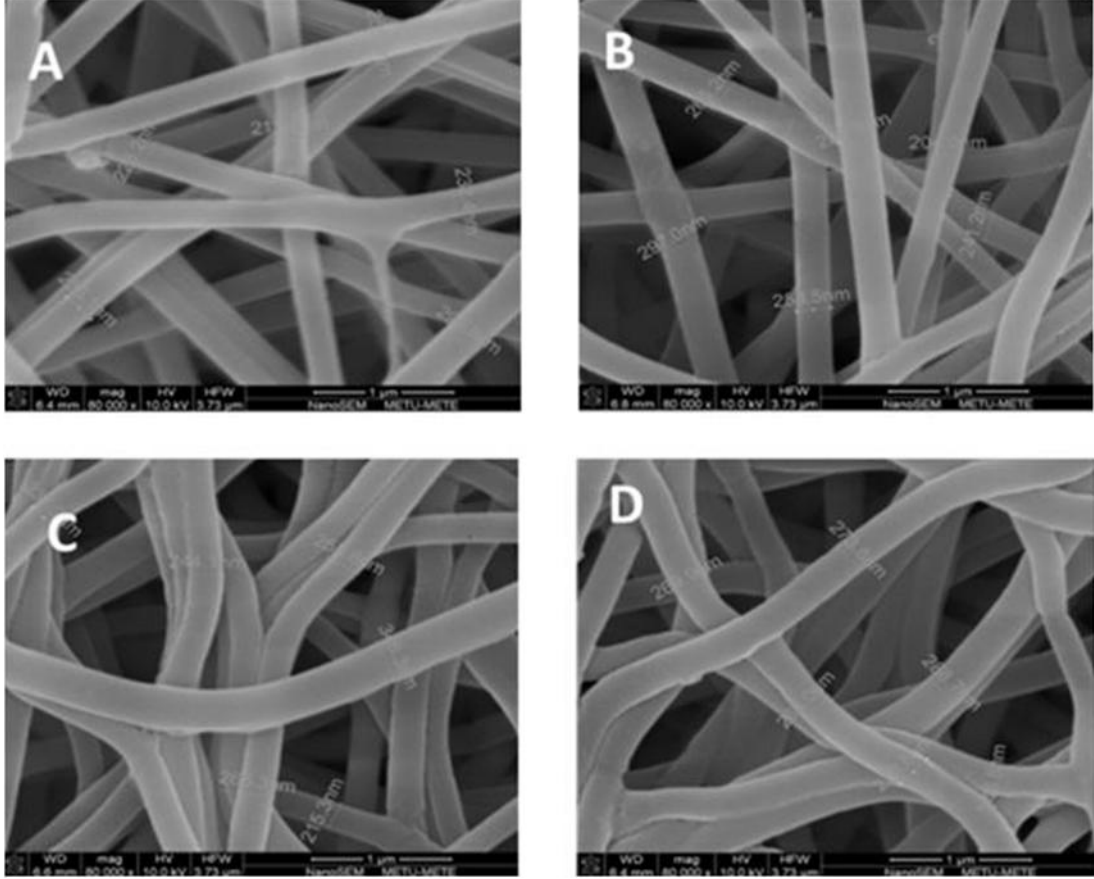
Bu nedenle optimum sürenin bulunması için seçilen nanofiberler (Fibroin nanofiberler, Ag/Fibroin nanofiberler ve PEI(20) / Fibroin nanofiberler belirli saat aralığında GA buharına maruz bırakılmışlardır. Nanofiber membranlar GA buharına 0.5, 1, 3, 6, 12 ve 24 saat boyunca maruz bırakıldıklarındaki nanofiber yapılarındaki meydana gelen değişimler SEM kullanılarak izlenmiştir.

SEM görüntüleri incelendiğinde nanofiber membranların GA buharına maruziyet süresi arttıkça nanofiber çaplarında kalınlaşma meydana gelmekte ve 12 saatten sonra fiber formasyonu bozularak film formasyonuna dönüştükleri gözlenmiştir (Şekil 4.10-4.15) Bu nedenle 12. Saatten sonra fiber çaplarından ölçüm alınamamaya başlanmıştır.

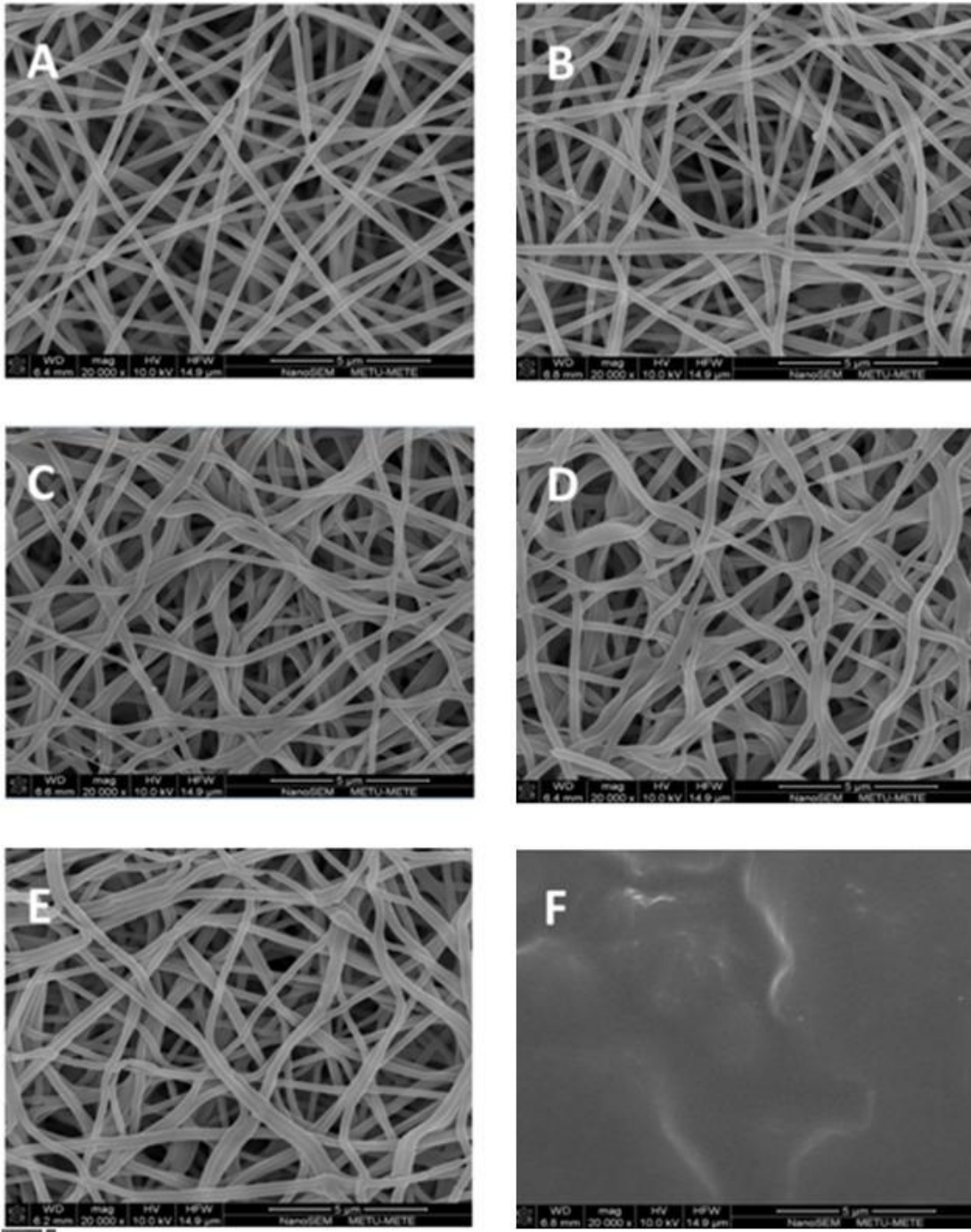
Fibroin nanofiberlerin, çapraz bağlanmadan önce ortalama çapları 203 nm'dir. GA buharına maruziyet süresi zamanla arttıkça 1/2. saat sonunda 214, 1. saat sonunda 230, 3. saat sonunda 234, 6. saat sonunda 250 ve 12. saat sonunda 283 nm ortalama çapa sahip nanofiberler elde edilmiştir. 24. saatte ise nanofiberlerin hepsinin morfolojisi bozulmuş ve çap ölçümü alınamamıştır. Nanofiberlerin zamana bağlı olarak değişen morfolojileri Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.

Ag/Fibroin nanofiberlerin morfolojilerinin, Fibroin ve PEI/Fibroin nanofiberlere oranla daha hızlı bozulduğu gözlemlenmiştir. Ag/Fibroin nanofiberlerin çapraz

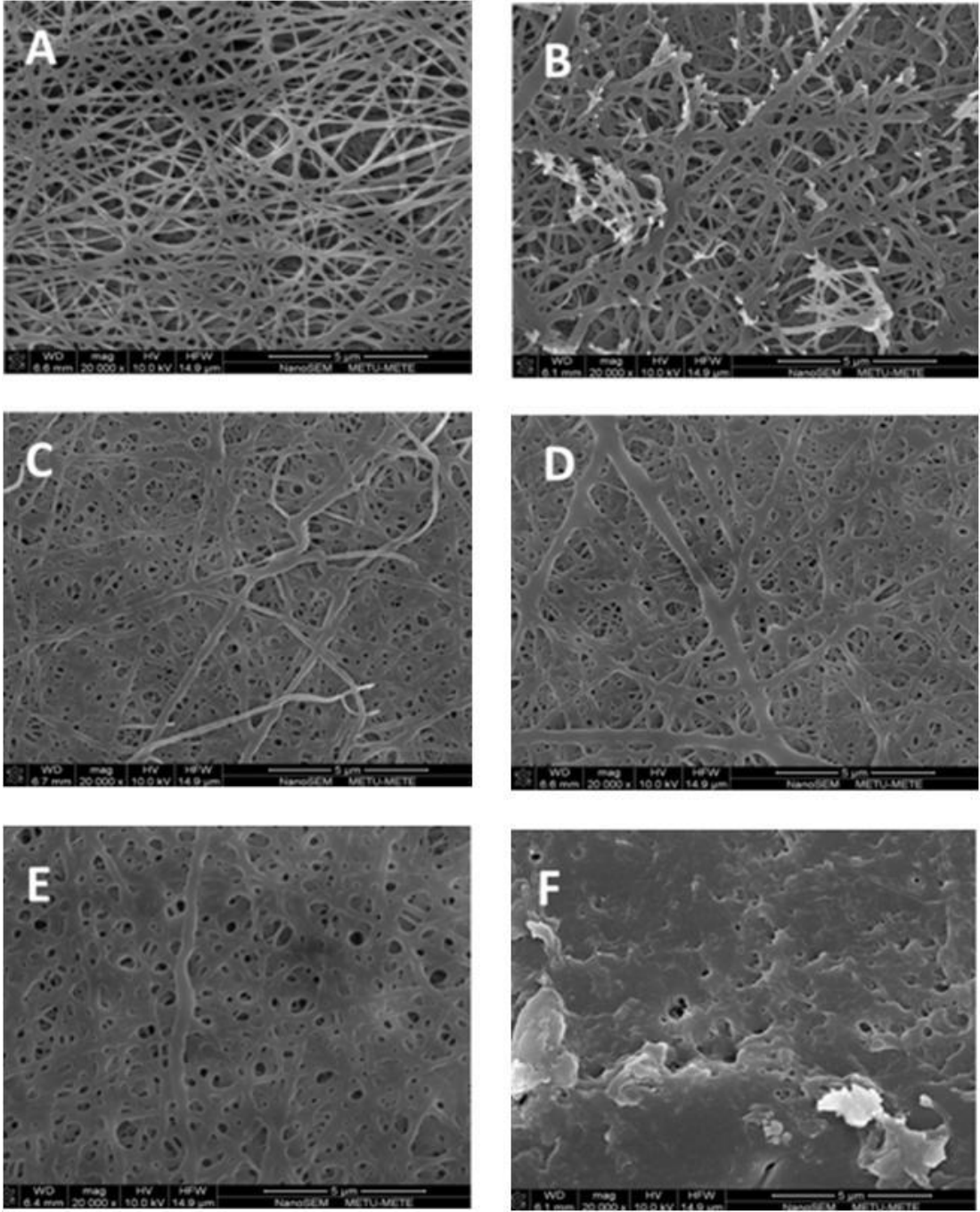
bağlanamadan önceki ortalama çapları 120 nm'dir. 1/2. saat sonunda 124, 1. saat sonunda 231, 3. saat sonunda 245, 6. saat sonunda 257 ve 12. saat sonunda ise nanofiberlerin hepsinin morfolojisi bozulmuş ve çap ölçümü alınamamıştır. Nanofiberlerin zaman bağılı olarak değişen morfolojileri Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de verilmiştir.



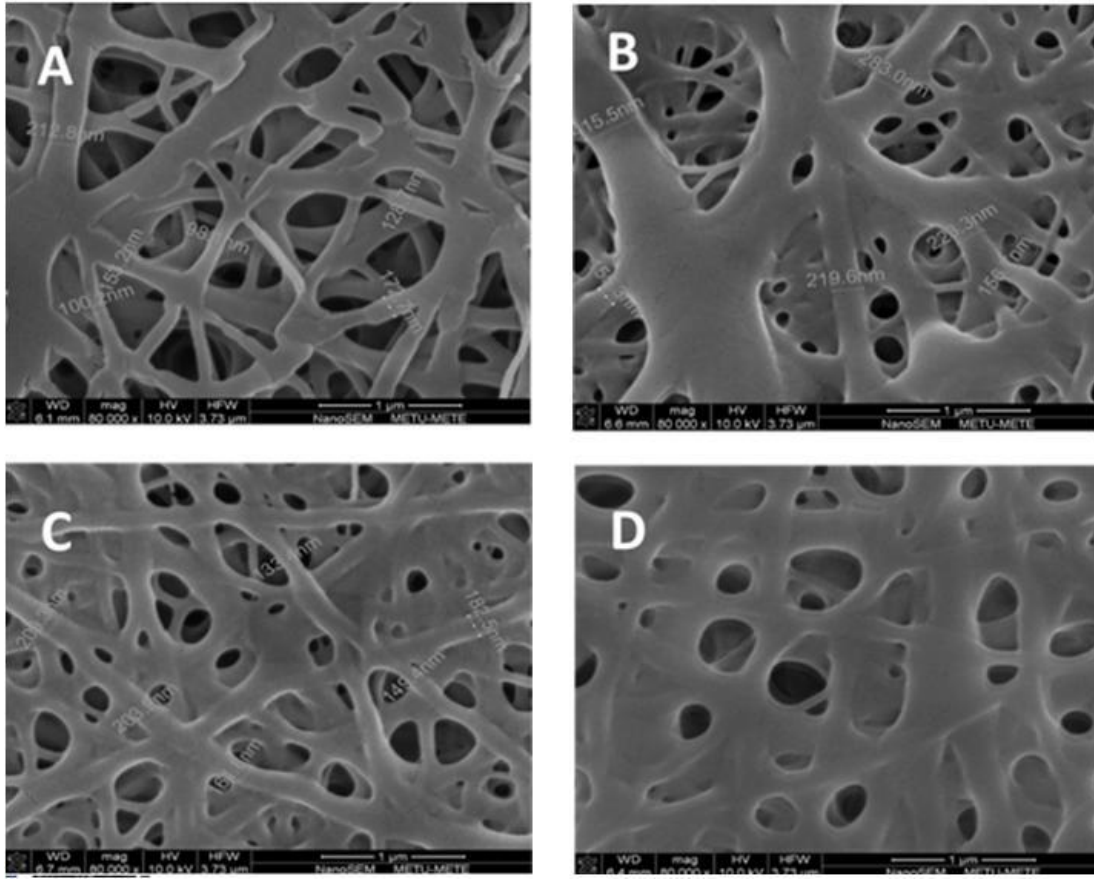
Şekil 4.10 Çapraz bağlı Fibroin nanofiberler (skala bar 1µm). Glutaraldehit buharı işlem süresi; A) 1 saat, B) 3 saat, C) 6 saat, D) 12 saat



Şekil 4.11 Çapraz bağlı Fibroin nanofiberler (skala bar 5µm). Glutaraldehit buharı işlem süresi; A) 0,5 saat, B) 1 saat, C) 3 saat, D) 6 saat, E) 12 saat, F) 24 saat

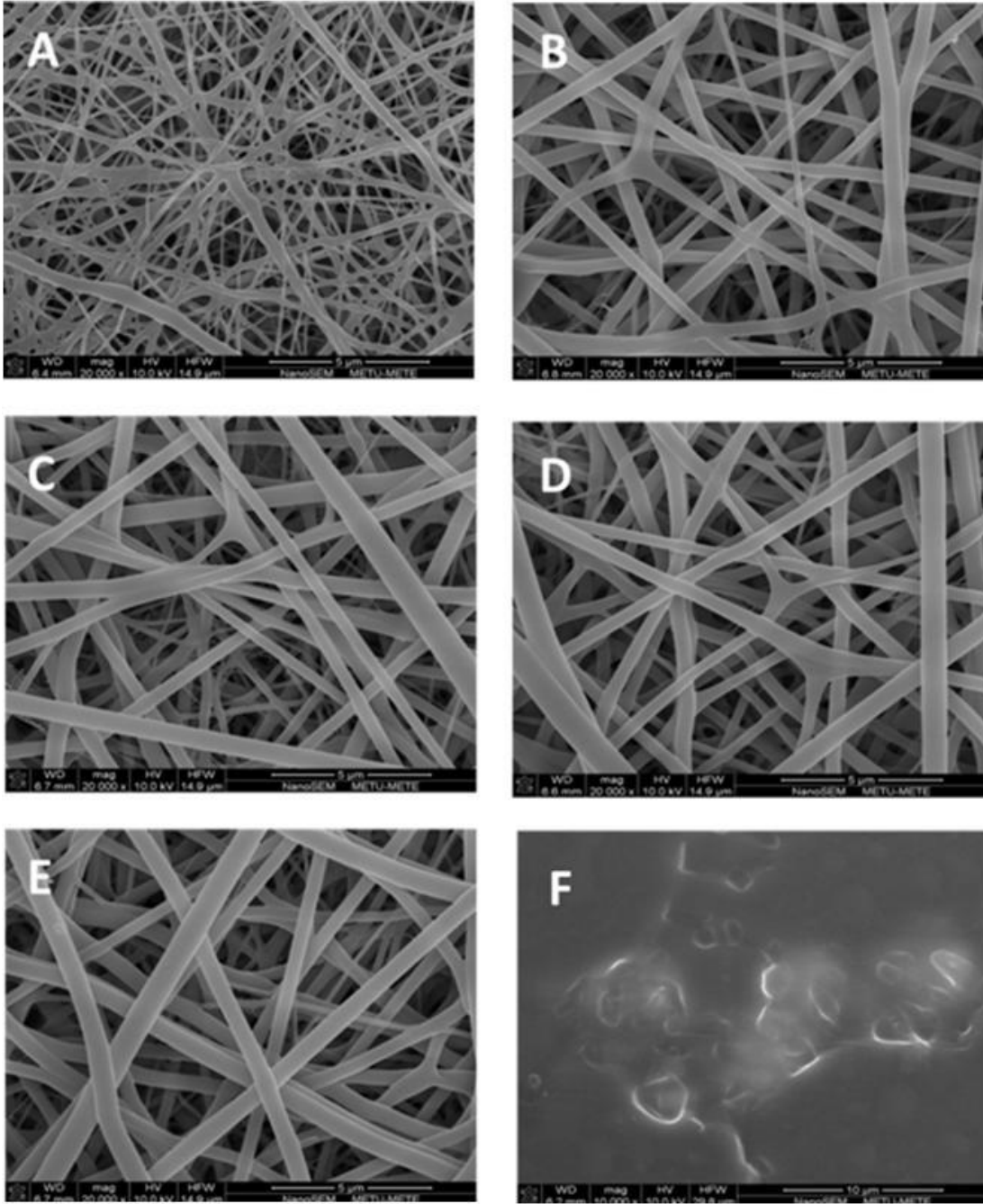


Şekil 4.12 Çapraz bağlı Ag/Fibroin nanofiberler (skala bar 5µm). Glutaraldehit buharı işlem süresi; A) 0,5 saat, B) 1 saat, C) 3 saat, D) 6 saat, E) 12 saat F) 24 saat

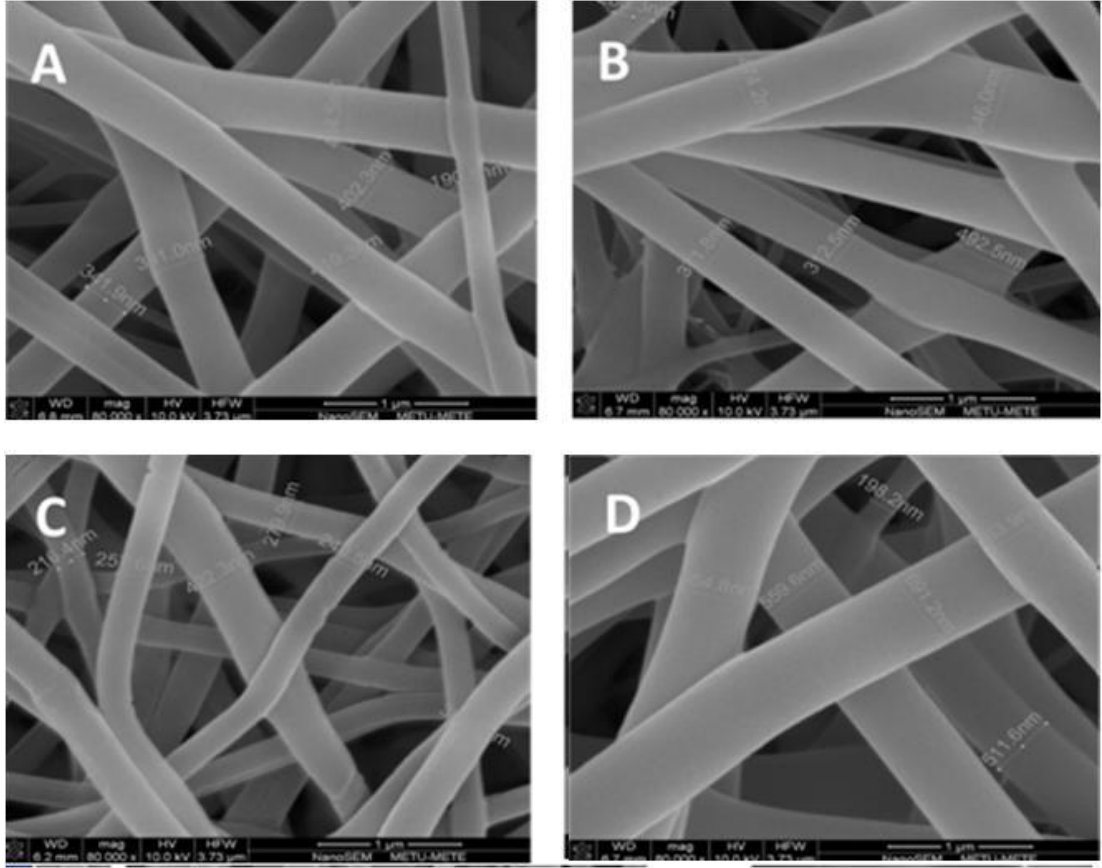


Şekil 4.13 Çapraz bağlı Ag/Fibroin nanofiberler (skala bar 1µm). Glutaraldehit buharı işlem süresi; A) 1 saat, B) 3 saat, C) 6 saat, D) 12 saat

PEI(20)/Fibroin nanofiberlerin, çapraz bağlanmadan önce ortalama çapları 267 nm'dir. 1/2. saat sonunda 331, 1. saat sonunda 335, 3. saat sonunda 398, 6. saat sonunda 425 ve 12. saat sonunda 478 nm ortalama çapa sahip nanofiberlere dönüşmüştür. 24. saatte ise nanofiberlerin hepsinin morfolojisi bozulmuş ve çap ölçümü alınamamıştır. Nanofiberlerin zaman bağlı olarak değişen morfolojilerinin görüntüleri Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de verilmiştir.



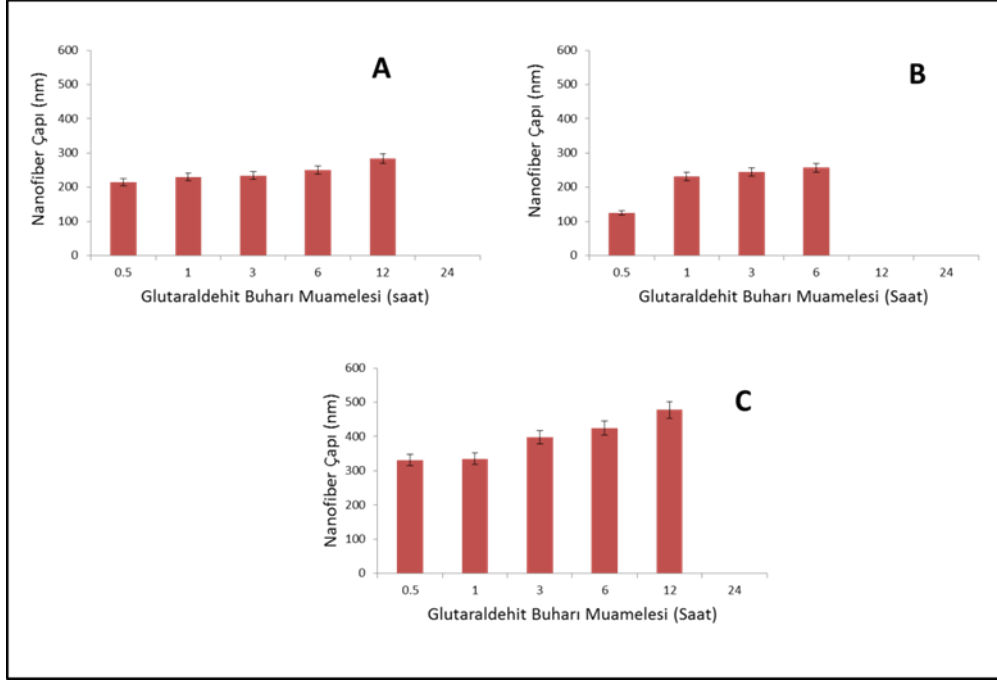
Şekil 4.14 Çapraz bağlı PEI(20) / Fibroin nanofiberler (skala bar 5µm).
Glutaraldehit buharı işlem süresi; A) 0,5 saat, B) 1 saat, C) 3 saat, D) 6 saat, E) 12 saat, F) 24 Saat



Şekil 4.15 Çapraz bağlı PEI(20) / Fibroin nanofiberler (yüksek büyütme, skala bar 1µm). Glutaraldehit buharı işlem süresi; A) 1 saat, B) 3 saat, C) 6 saat, D) 12 saat

Özetle, nanofiberlerin, %25 (v/v)'lik GA sulu çözeltisi buharına maruz bırakıldığında ortamdaki su buharından dolayı şiştikleri ve bu nedenle fiber çaplarında artma görüldüğü ve GA işlem süresi arttıkça buna paralel olarak fiber kalınlıklarının arttığı ve 24 saat sonunda ise film haline geldiği sonucuna varılmıştır. Nanofiberlerin 0-24 saatleri arasındaki ortalama çapları Şekil 4.16' da verilmiştir.

Bu bilgiler ışığında kararlı biyonanotekstillere üretimi için GA buharı işlem süresi bundan sonraki çalışmalar için 3 saat olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.16 Glutaraldehit buharı işlem süresinin nanofiber çapına etkisi; A) Fibroin nanofiberler, B) Ag/Fibroin nanofiberler, C) PEI(20) / Fibroin nanofiberler

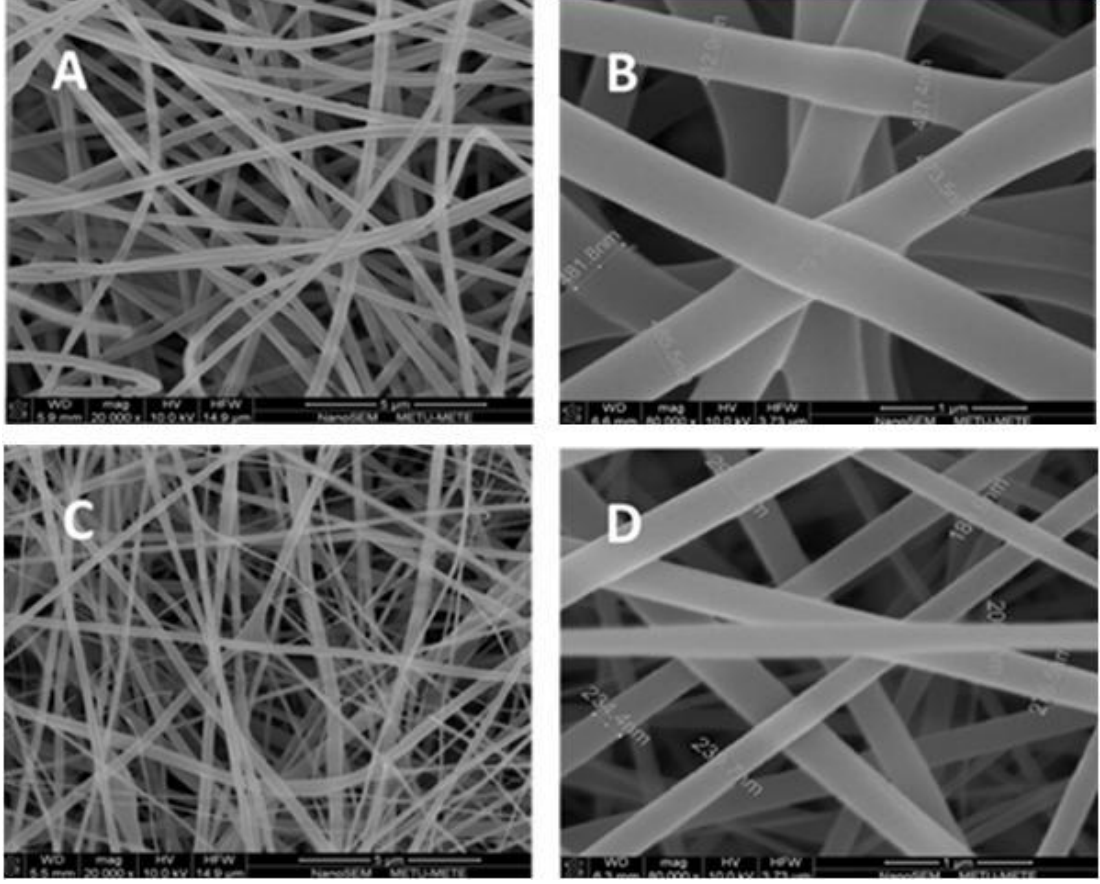
4.2.2. Metanol muamelesi

İpek fibroin, silk I yapısından kararlı hal olan silk II yapısına geçerken amino asit dizileri arasında H bağı oluşumu teşvik edilir ve amino asitlerin karbonil ve amin grupları arasında paralel veya antiparalel H bağları oluşmaktadır (Lu, Wang ve ark. 2009).

Yapılan çalışmalarda sülfatlanmış fibroin nanofiberleri sulu ortamda kararlı hale geçirmek için metanol muamelesi kullanılmıştır (Liu. H. 2011). Metanol muamelesi sonucu β -kristalin tabakaya geçirilen fibroin ve sülfatlanmış fibroin nanofiberlerin çaplarında kalınlaşma meydana gelmiştir.

Hazırlanan nanofiberlerin (Fibroin, Ag/Fibroin ve S/Fibroin) yapısal değişimini düzensiz sarmal halden, β -tabaka haline geçirmek için metanol muamelesi uygulanmış, morfolojileri ve silk I ve silk II yapıları incelenmiştir. Fibroinin konformasyonunun silk I'den silk II'ye geçmesi fiber çaplarında kalınlaşmaya neden olmuştur (Şekil 4.17). Fibroin nanofiberlerin ortalama çapı 150 nm'den 196 nm'ye yükselirken, sülfatlanmış fibroin nanofiberlerin ortalama çapları 160 nm'den

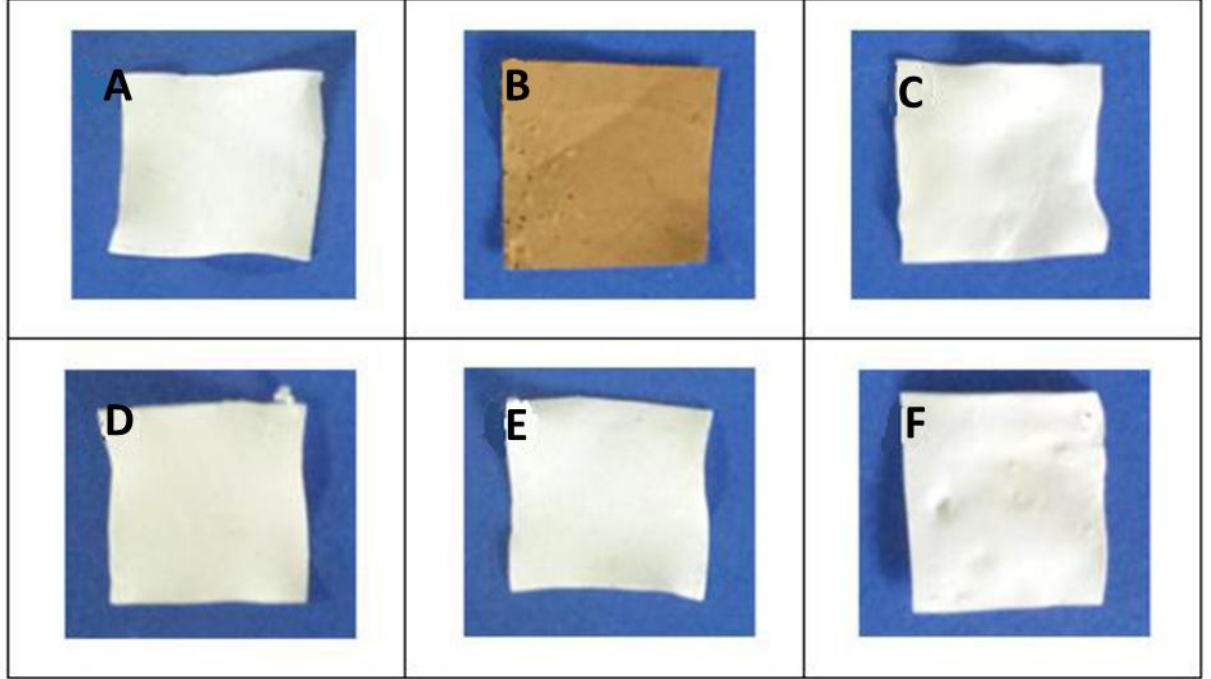
210 nm'ye yükselmiştir. Şekil 4.17' de görüleceği gibi metanol ile muamele uygulanmış biyonanotekstillerin morfolojilerinde herhangi bir bozulma olmazken çaplarında artış gözlenmiştir.



Şekil 4.17 Silik II morfolojiye sahip nanofiberler (skala bar 1µm); A ve B) Fibroin nanofiberler, C ve D) Sülfatlanmış Fibroin nanofiberler

Sonuç olarak, GA veya metanol muamelesi ile kararlı hale getirilen nanofiber membranlar, sulu çözeltide, mikrobiyolojik ortamda ve hücre kültüründe 1 hafta bekletildiklerinde her iki uygulama sonunda yapılarında herhangi bir degradasyon olmadıkları ve bütünlüklerini korudukları makroskopik olarak incelenmiştir. Daha detaylı sonuçlar için enzimatik ortamdaki degradasyon kinetiklerinin çalışılması planlanmıştır.

Biyonanotekstiller olarak adlandırabileceğimiz kararlı nanofiber membranların makroskopik görüntüleri Şekil 4.18’de verilmiştir. Ag/Fibroin hariç tüm nanofiber membranlar, beyaz bir tekstil görünümünde olup, elle yırtılmayacak kadar mukavemete sahiptir.



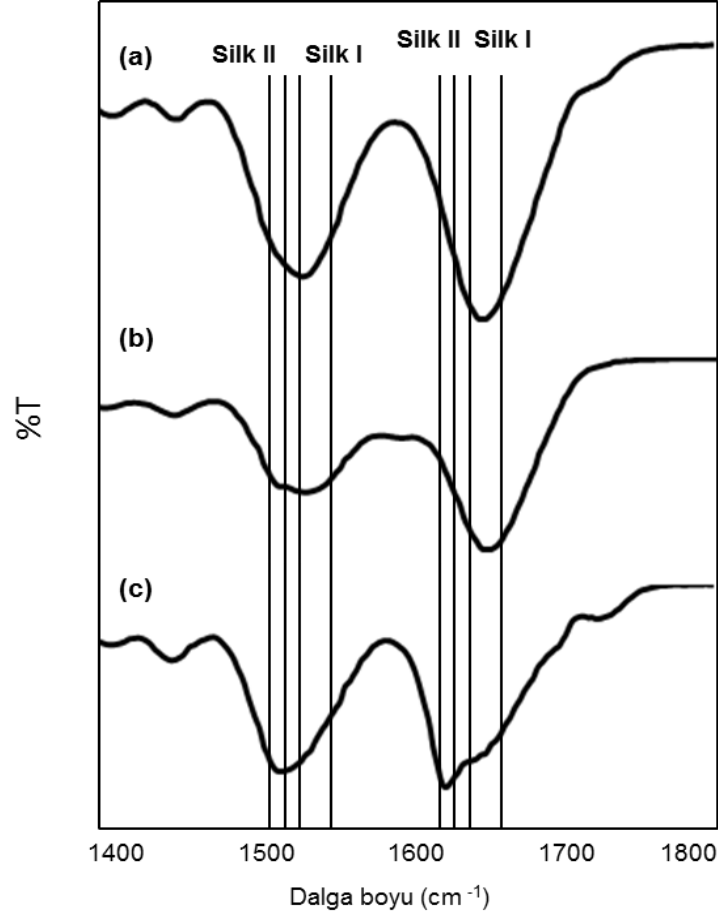
Şekil 4.18 Biyananotekstillerin makroskopik görüntüsü A) Fibroin-M, B) Ag/Fibroin-G, C) PEI(10)/Fibroin-G, D) PEI(20)/Fibroin-G, E) PEI (30)/Fibroin-G, F) S/Fibroin-M

4.3. Biyananotekstillerin Yapısal Özellikleri

Metanol ve glutaraldehit muamelesi ile kararlı hale getirilmiş ipek fibroin nanofiberlerin ve kompozitlerinin yapılarının aydınlatılması için FTIR spektrumları incelenmiştir (Şekil 4.19-23).

1700cm^{-1} - 1500cm^{-1} infrared absorpsiyon bandı amit I ve amit II peptit iskeletlerini içine alan banttır. Fibroin bazlı malzemelerin ikincil yapısı olan silk II yapısının analizi bu aralıkta incelenir. Amit I 1700cm^{-1} - 1600cm^{-1} , amit II ise 1600cm^{-1} - 1500cm^{-1} aralığını kapsar. 1610 - 1630 , 1695 - 1700 ve 1510 - 1520cm^{-1} pikleri ikincil yapı olan silk II konformasyonu için karakteristik olan absorpsiyon pikleridir. 1648 -

1654 ve 1535-1542 cm^{-1} absorpsiyon pikleri amorf yapı olan silk I konformasyonu için karakteristiktir (Lu, Zhang ve ark. 2011).

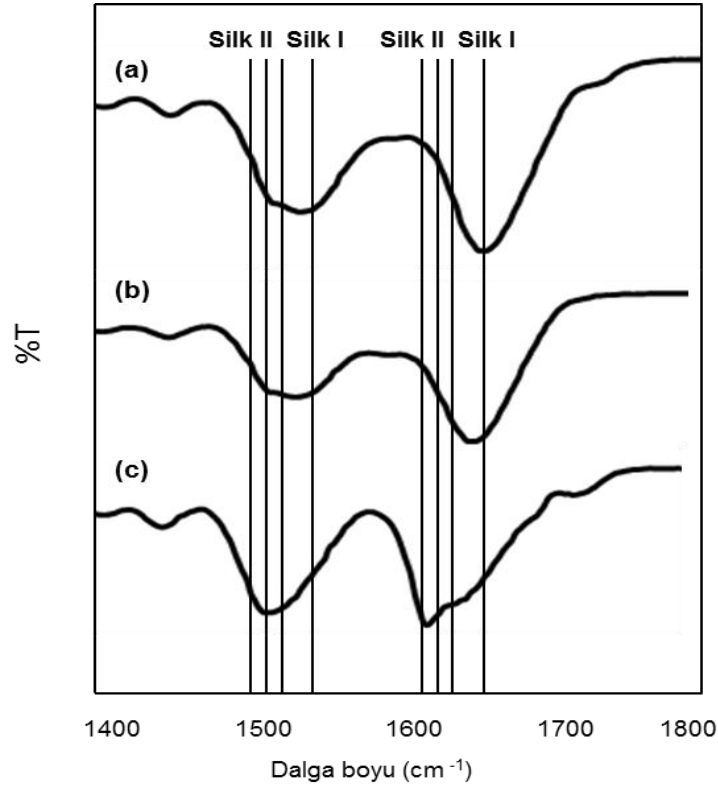


Şekil 4.19 Fibroin nanofiberlerin FTIR Spektrumları;

a) Fibroin, b) Fibroin-G, c) Fibroin-M

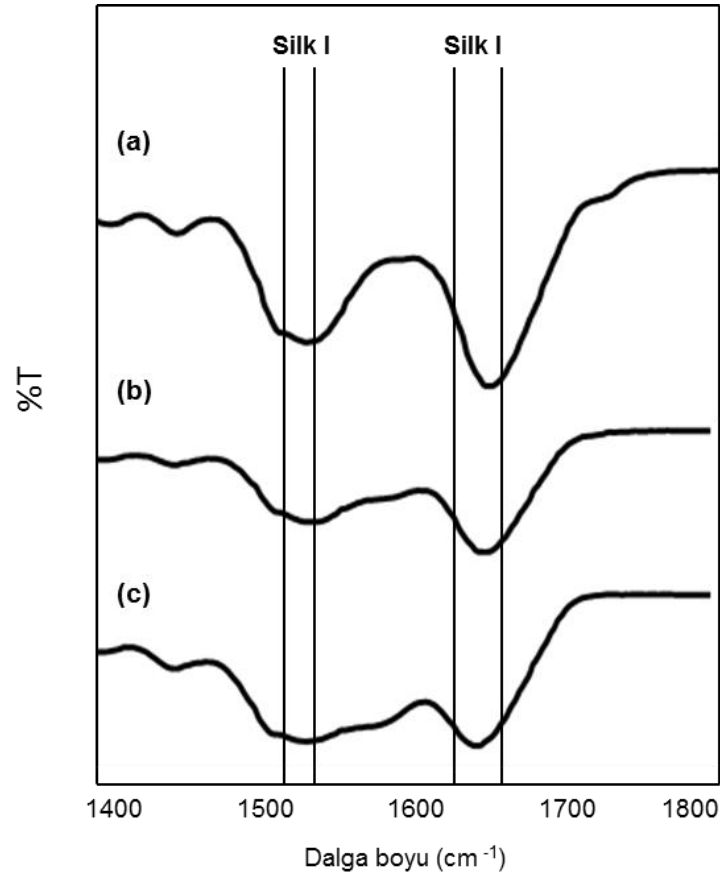
Fibroin örneğindeki amit I bandındaki 1651 cm^{-1} de kuvvetli pik ve amit II bandındaki 1534 cm^{-1} 'deki pik örneğin silk I amorf yapısında olduğunun göstergesidir. Fibroin-G örneğinde amit I bandında 1652 cm^{-1} de ve 1535 cm^{-1} 'deki pikler yine Fibroin-G örneğinin silk I yapısında olduğunun göstermektedir. Metanol muamelesi yapılmış Fibroin-M örneğinde; amit I bandındaki 1626 cm^{-1} ve 1518 cm^{-1} 'deki kuvvetli pikler nanofiber membranların silk II (β -kristalin) konformasyon yapısına geçtiğini göstermiştir (Lu, Zhang ve ark. 2011).

Ag/Fibroin örneğindeki amit I bandındaki 1653 cm^{-1} de kuvvetli pik ve amit II bandındaki 1535 cm^{-1} 'deki pik örneğin silk I amorf yapısında olduğunun göstergesidir. Ag/Fibroin-G örneğinde amit I bandında 1651 cm^{-1} de ve 1533 cm^{-1} deki pikler yine Ag/Fibroin-G örneğinin silk I yapısında olduğunun göstermektedir. Metanol muamelesi yapılmış Ag/Fibroin-M örneğinde; amit I bandındaki 1624 cm^{-1} ve 1516 cm^{-1} deki kuvvetli pikler nanofiber membranların silk II (β -kristalin) konformasyon yapısına geçtiğini göstermiştir.



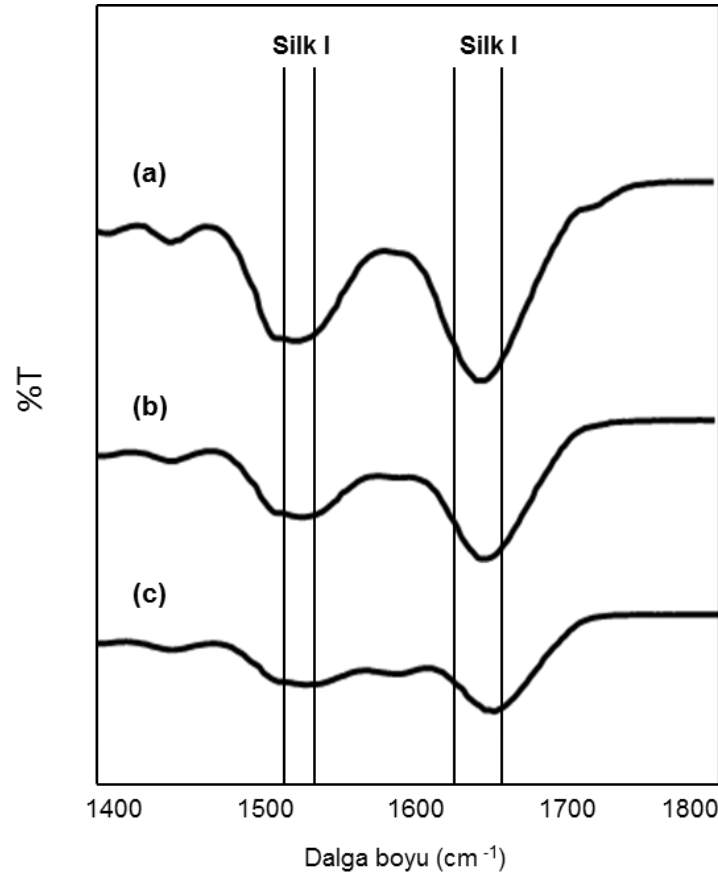
Şekil 4.20 Ag/Fibroin nanofiberlerin FTIR Spektrumları;
a) Ag/Fibroin, b) Ag/Fibroin-G, c) Ag/Fibroin-M

PEI(10)/Fibroin, örneği amit I bandında 1652 cm^{-1} amit II bandında 1535 cm^{-1} de absorpsiyon piki göstermiştir. PEI(20)/Fibroin, amit I bandında 1653 cm^{-1} de amit II bandında 1543 cm^{-1} de yayvan absorpsiyon piki göstermiştir. PEI(30)/Fibroin, amit I bandında 1649 cm^{-1} de amit II bandında 1538 cm^{-1} de yayvan absorpsiyon piki göstermiştir. Bu üç yapıda silk I konformasyonundadır.



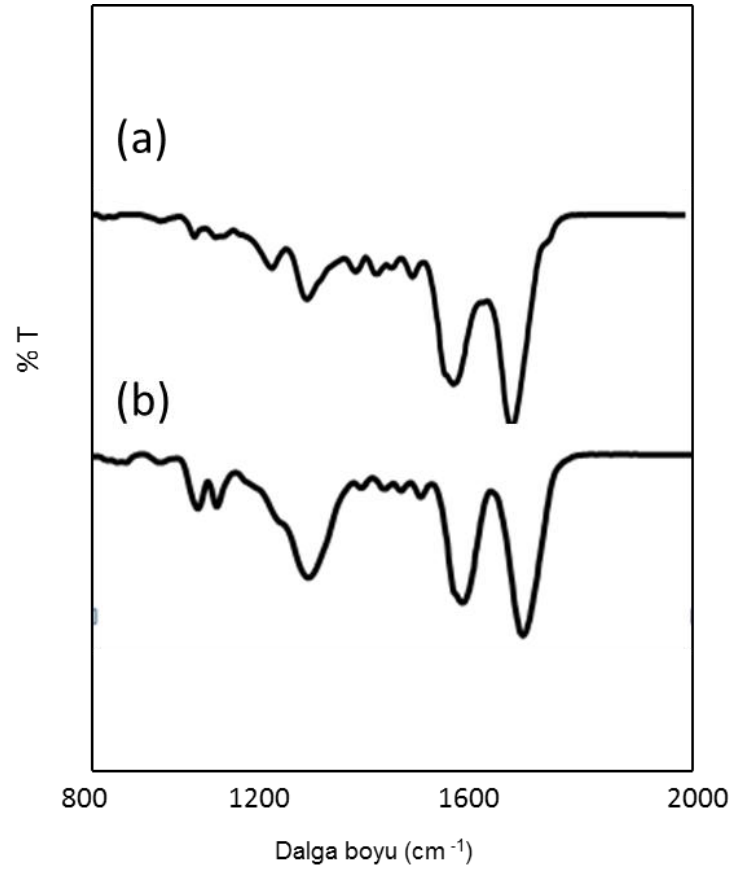
Şekil 4.21 PEI/Fibroin nanofiberlerin FTIR Spektrumları;
a) PEI(10)/Fibroin, b) PEI(20)/Fibroin, c) PEI(30)/Fibroin

PEI(10)/Fibroin-G, örneği amit I bandında 1648 cm^{-1} , amit II bandında 1532 cm^{-1} 'de absorpsiyon piki göstermiştir. PEI(20)/Fibroin-G, amit I bandında 1653 cm^{-1} 'de amit II bandında 1535 cm^{-1} 'de yayvan absorpsiyon piki göstermiştir. PEI(30)/Fibroin-G, amit I bandında 1654 cm^{-1} 'de amit II bandında 1535 cm^{-1} 'de yayvan absorpsiyon piki göstermiştir. Bu üç yapıda silk I konformasyonunda kalarak çapraz bağlanmış ve kararlı hale geçmiştir.



Şekil 4.22 Çapraz bağlı PEI/Fibroin nanofiberlerin FTIR Spektrumları;
a) PEI(10)/Fibroin-G, b) PEI(20)/Fibroin-G, c) PEI(30)/Fibroin-G

Sülfatlanmış fibroin SO_2 gruplarının esneme ve gerilmesi sonucu 1200cm^{-1} 'de fibroin molekülünün bandlarıyla üst üste çakışan kuvvetli ve geniş bir band piki verir (Tamada 2004). Bu sonuçlar altında kloronsülfonik asit ile fibroin molekülünün reaksiyonu sonucu sülfat grupları fibroin molekülüne bağlanmıştır.



Şekil 4.23 S/Fibroin nanofiberlerin FTIR Spektrumları;

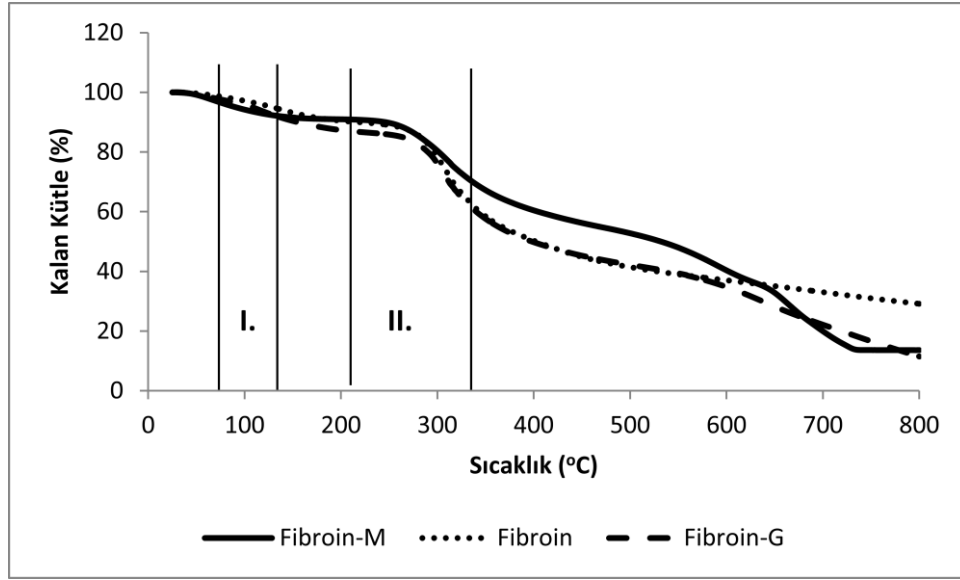
a) Fibroin, b) S/Fibroin

4.4. Biyonanotekstillerin Termal Davranışları

4.4.1. Termogravimetrik analiz (TGA)

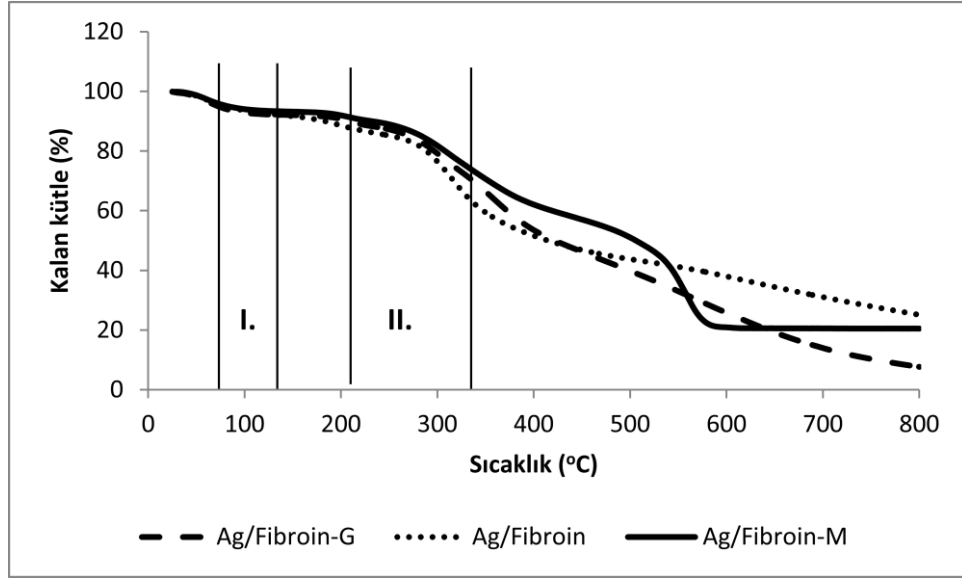
Nanofiberlerin termogravimetrik eğrileri iki farklı bölgede incelenmiştir. Fibroin bazlı nanofiberlerin ilk kütle kaybı yaklaşık 100 °C’ de olmaktadır. Bu bölge grafiklerde I. Bölge olarak tanımlanmıştır. İkinci kütle kaybı 270-370 °C sıcaklık aralığında değişen bölgede olmaktadır buradaki kütle kaybı protein zincirindeki peptit bağlarının bozulması sonucunda meydana gelmektedir. Bu bölge de II. Bölge olarak tanımlanmıştır (Um, Kweon ve ark. 2001) (Motta, Fambri ve ark. 2002). Fibroin, Fibroin-M ve Fibroin-G nanofiberlerinin TGA eğrileri incelendiğinde (Şekil 4.24) I. Bölgede ortamdaki suyun uzaklaşmasından kaynaklanan az miktarda kütle kaybı gerçekleşmiştir. Sıcaklık 270 °C civarına geldiğinde peptit bağları yavaş

yavaş parçalanmaya başlamıştır. Peptit bağlarının parçalanmasıyla 270-400 °C sıcaklık aralığında hızlı bir degradasyon eğrisi görülmüştür. Amorf yapıda olan Fibroin örneği ve glutaraldehit buharı ile çapraz bağlanmış Fibroin-G numunesi hemen hemen benzer degradasyon eğrileri göstermişlerdir ve Fibroin-M' ye göre hızlı degrede olmuşlardır. Bu iki örnek silk II (β -kristalinitesi) gösteren Fibroin-M örneğine göre daha düşük termal dayanıklılık göstermiştir.



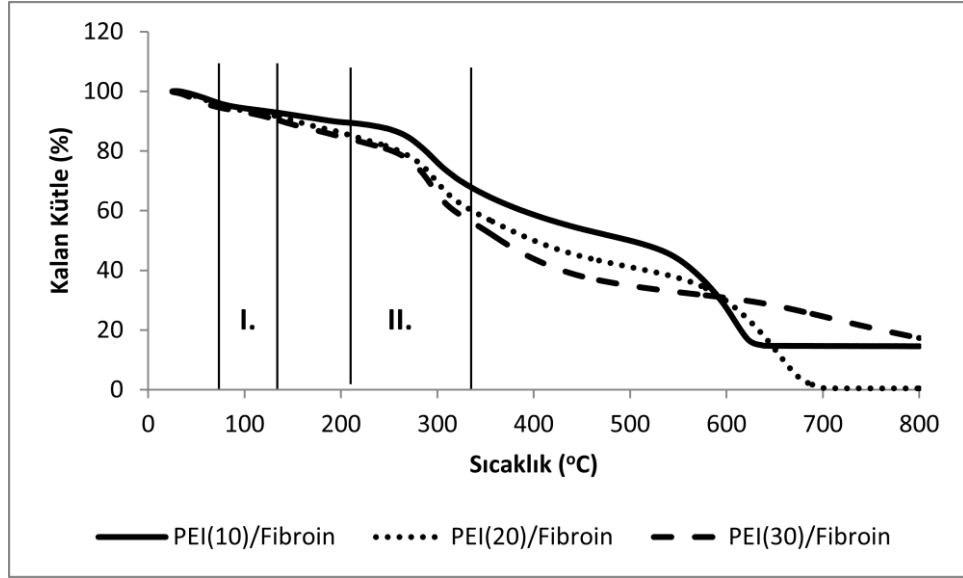
Şekil 4.24 Fibroin, Fibroin-M ve Fibroin-G'nin TGA termogramları

Ag/Fibroin nanofiberlerine ait termogramlarda (Şekil 4.25) yaklaşık 100 °C civarında (I. Bölge) ortamdaki suyun uzaklaşmasıyla az miktarda kütle kaybı gerçekleşmiştir. Sıcaklık arttırıldıkça protein zincirleri arasındaki peptit bağlarının parçalanmasıyla 230 °C'den itibaren hızlı bir kütle kaybı gözlenmiştir. Grafikte tanımlanan ikinci bölgede en düşük termal dayanımı amorf yapıda olan Ag/Fibroin örneği göstermiştir. Bu örnek diğer örneklerle oranla hızlı bir degradasyon eğrisi göstermiştir. Glutaraldehit buharıyla çapraz bağlanmış Ag/Fibroin-G, amorf Ag/Fibroin'e göre daha yüksek termal stabilite göstermiştir. Metanol muamelesi uygulanmış Ag/Fibroin-M, silk II (β -kristalinite) yapısı sayesinde diğer iki örneğe oranla en yüksek termal stabiliteyi göstermiştir ve degradasyonu diğer iki örneğe göre daha yavaştır.



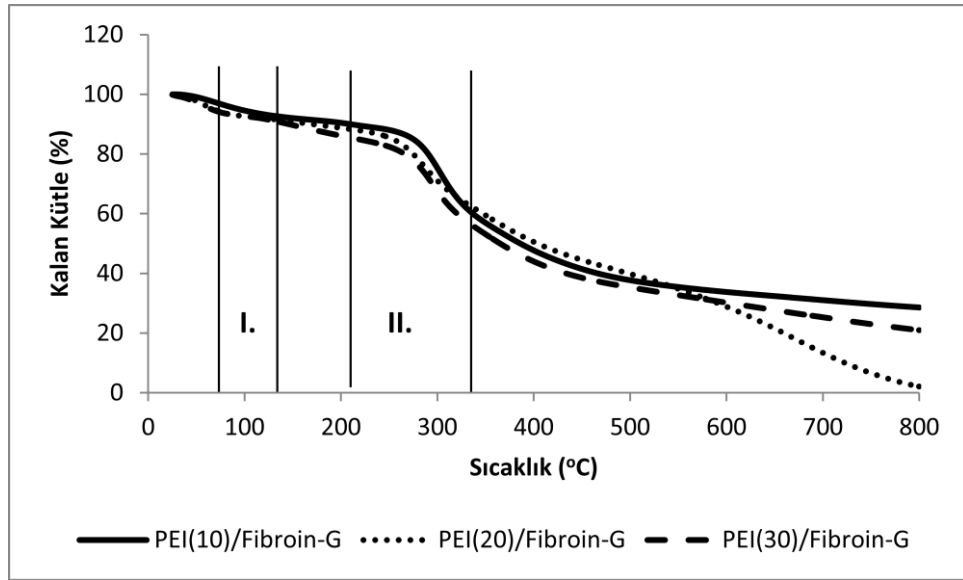
Şekil 4.25 Ag/Fibroin, Ag/Fibroin-M ve Ag/Fibroin-G'nin TGA termogramları

Glutaraldehit ile çapraz bağlanmamış PEI/Fibroin nanofiberler incelendiğinde (Şekil 4.26) yaklaşık 100 °C civarında (I. Bölge) ortamdaki suyun uzaklaşmasıyla az miktarda kütle kaybı gerçekleşmiştir. II. Bölgeye gelindiğinde, üç farklı derişim için hızlı bir degradasyon gözlenmiştir. Aşağıdaki sonuçlara göre çapraz bağlanmamış PEI/Fibroin nanofiberler için PEI derişimi arttıkça nanofiberlerin termal kararlılıklarının düştüğü söylenebilir. Buna göre en büyük termal kararlılığı PEI(10)/Fibroin nanofiberler göstermiştir. Bunu sırasıyla PEI(20)/Fibroin nanofiberler ve PEI(30)/Fibroin nanofiberler izlemiştir.



Şekil 4.26 PEI(10)/Fibroin, PEI(20)/Fibroin ve PEI(30)/Fibroin'in TGA termogramları

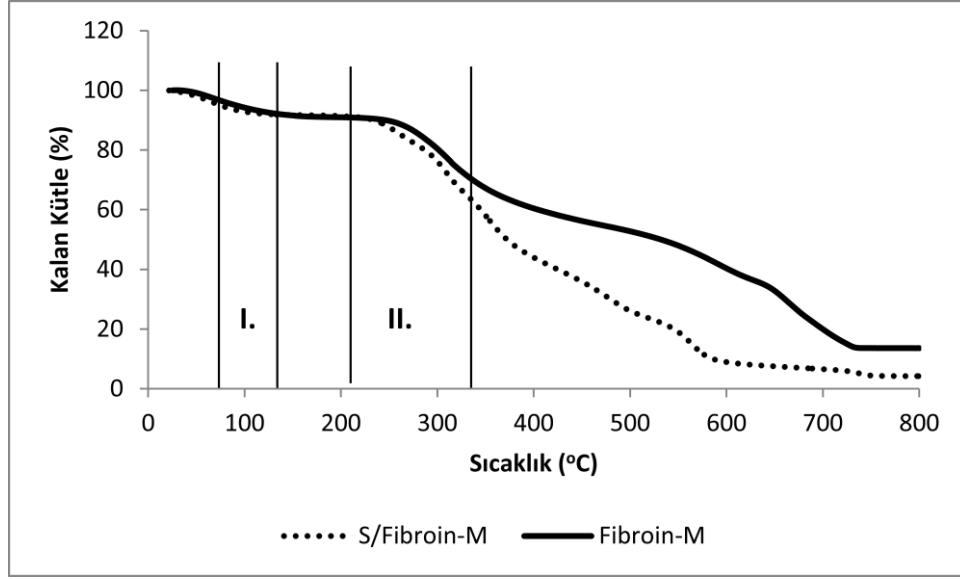
PEI içeren nanofiberler glutarladehit buharıyla çapraz bağlandıklarında, PEI polimeri, fibroin molekülüyle kararlı bir yapı oluşturmuştur. II. Bölgedeki TGA eğrileri (Şekil 4.27) incelendiğinde çapraz bağlanmadan önceki eğrilere oranla birbirlerine daha da yaklaştıkları gözlenmiştir.



Şekil 4.27 PEI(10)/Fibroin-G, PEI(20)/Fibroin-G ve PEI(30)/Fibroin-G'nin TGA termogramları

Metanol muamelesi görmüş S/Fibroin ile Fibroin nanofiberlerin TGA eğrileri karşılaştırıldığında (Şekil 4.28) I. Bölgede ortamdaki nem uzaklaşırken aynı

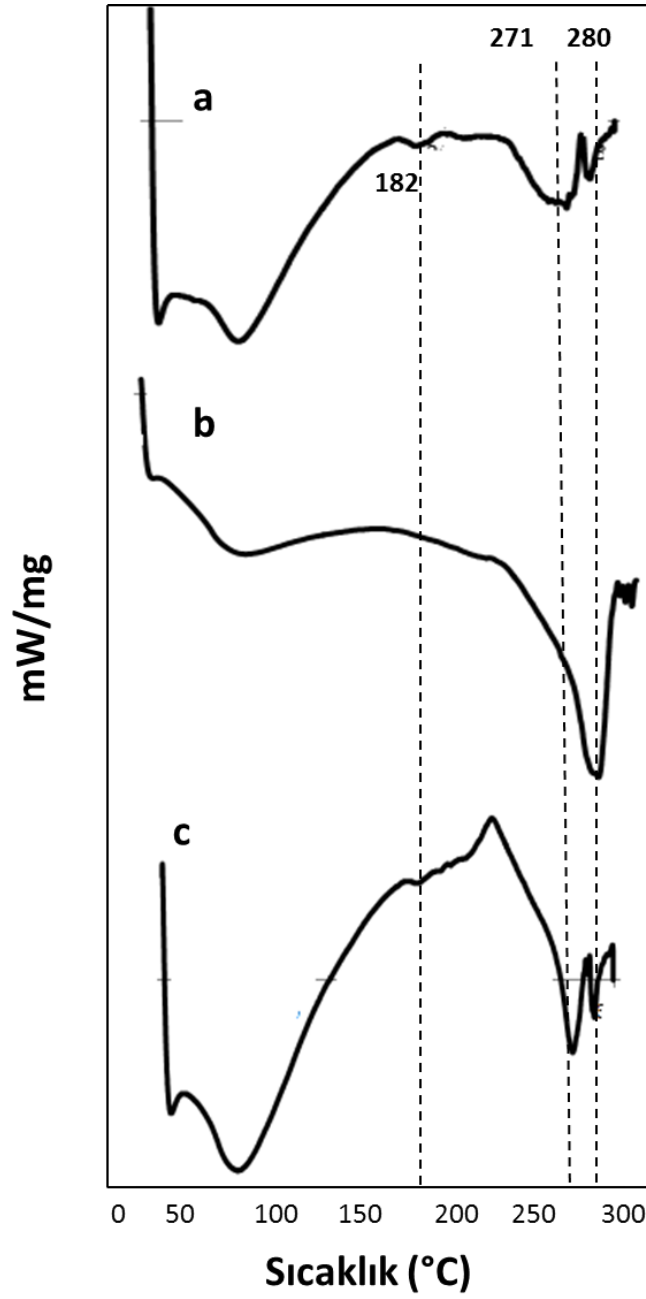
degradasyon eğrisini göstermişlerdir. Sıcaklık artıkça protein zincirleri arasındaki peptit bağları kırılmaya başlayınca (II. Bölge) degradasyon hızlarının ve termal stabilitelerinin oldukça farklı olduğu görülmüştür. S/Fibroin-M nanofiberler, Fibroin-M nanofiberlere oranla düşük termal stabilite göstermişlerdir. Burada gözlemlenen, S/Fibroin-M nanofiberlerinin sergilediği daha hızlı bozunma 200°C sonrasında sülfat gruplarının bozunmasıyla gerçekleşen kütle kaybına bağlıdır.



Şekil 4.28 S/Fibroin-M ve Fibroin-M'nin TGA termogramları

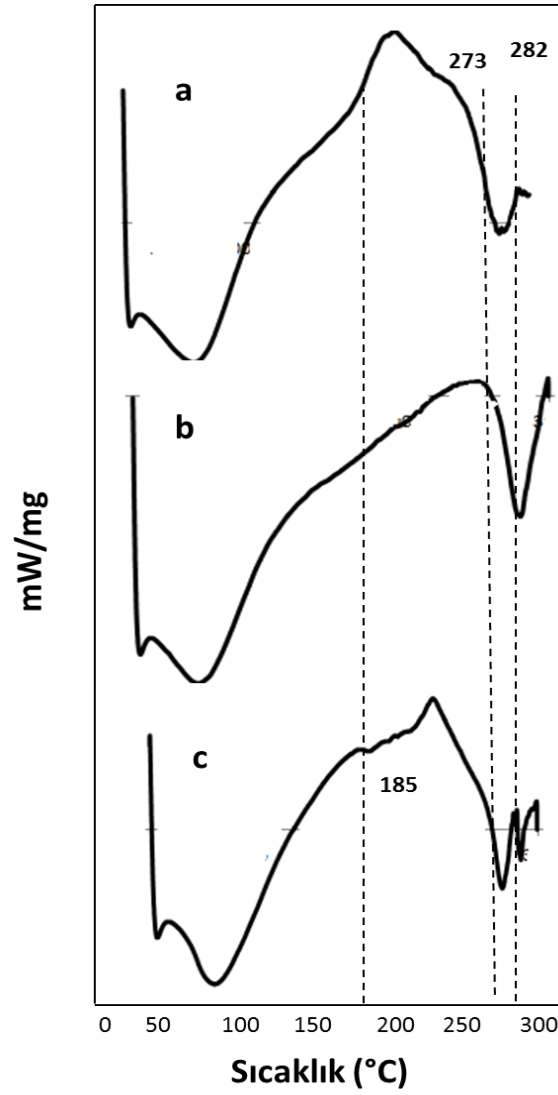
4.4.2. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) sonuçları

Elektroeğirilmiş Fibroin, Fibroin-M ve Fibroin-G nanofiberlere ait termogramlar (Şekil 4.29) yaklaşık 80 °C civarında ortamdaki suyun uzaklaşması kaynaklı bir endotermik pik göstermiştir. Diğer endotermik pik yaklaşık 270 °C civarında gözükümüştür. Bu sıcaklık amorf yapıdaki nanofiberlerin (Fibroin ve Fibroin-G) termal bozunma sıcaklığıdır. Amorf yapıdaki fiberlerin camsı geçiş sıcaklığı (Tg) 182 °C 'deki zayıf endotermik pik ile gözlemlenmiştir. 280 °C'deki kuvvetli endotermik pik silk II (β -kristalin) yapıdaki nanofiberler için termal bozunma sıcaklığıdır (Um, Kweon ve ark. 2001; Zhu, Shao ve ark. 2007).



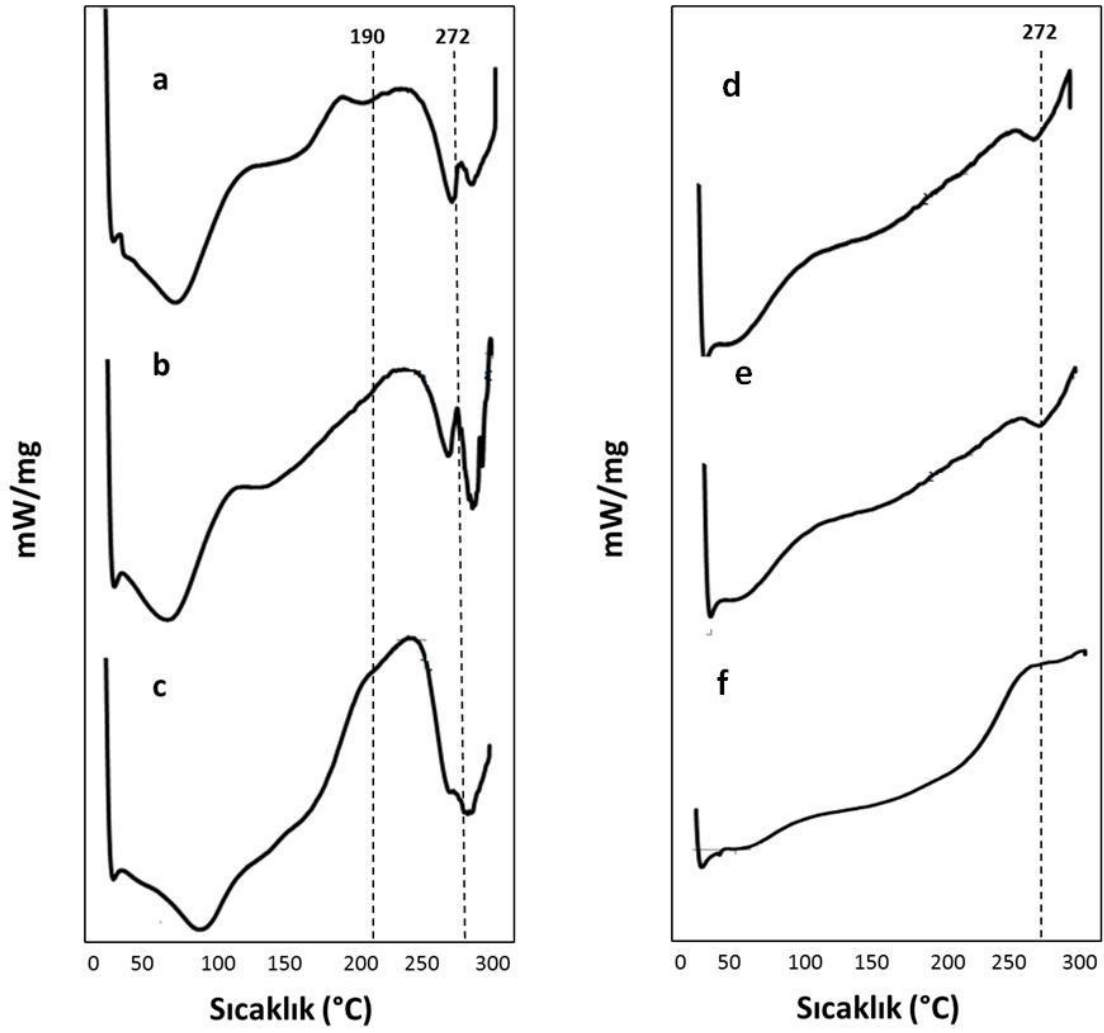
Şekil 4.29 Fibroin nanofiberlerin DSC termogramları;
a) Fibroin, b) Fibroin-M, c) Fibroin-G

Amorf yapıdaki Ag/Fibroin nanofiberlerin DSC analizlerinde (Şekil 4.30) camı geçiş sıcaklığı (T_g) 185 °C 'deki zayıf endotermik pik ile gözlemlenmiştir. 282 °C'deki kuvvetli endotermik pik, yukarıda da belirtildiği gibi silk II (β -kristalin) yapıdaki nanofiberler için termal bozunma sıcaklığıdır.



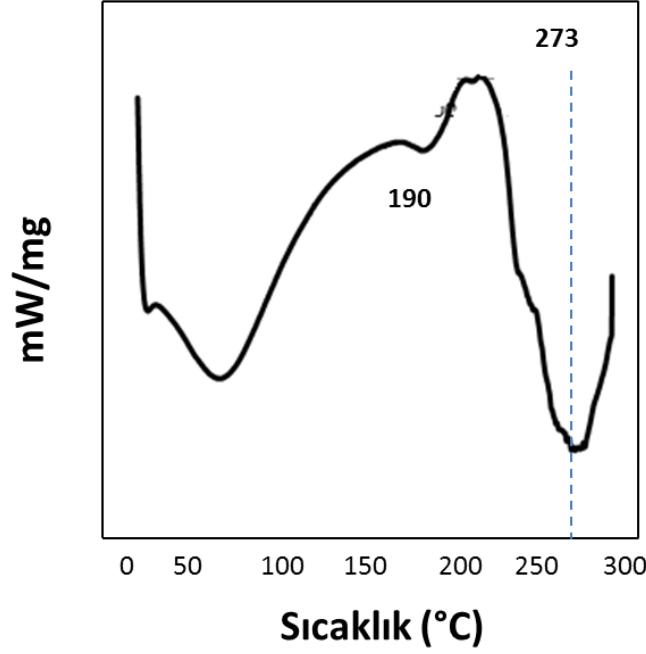
Şekil 4.30 Ag/Fibroin nanofiberlerin DSC termogramları;
a) Ag/Fibroin, b) Ag/Fibroin-M c) Ag/Fibroin-G

PEI/Fibroin ve PEI/Fibroin-G nanofiberlerinin DSC termogramları incelendiğinde (Şekil 4.31) termal bozunma sıcaklıkları yaklaşık 280 °C olarak belirlenmiştir. Ayrıca glutaraldehit buharı muamelesi ile çapraz bağlanan örnekler su kaybına bağlı endotermik piki göstermemişlerdir.



Şekil 4.31 PEI/Fibroin nanofiberlerin DSC termogramları; a) PEI(10)/Fibroin, b) PEI(20)/Fibroin, c) PEI(30)/Fibroin, d) PEI(10)/Fibroin-G, e) PEI(20)/Fibroin-G, f) PEI(30)/Fibroin-G

Sülfatlanmış nanofiberler (Şekil 4.32) yaklaşık 80 °C civarında ortamdaki suyun kaybolmasından dolayı bir endotermik pik göstermiştir. Diğer endotermik pik ise yaklaşık 270 °C civarında gözlemlenmiştir. Bu pik amorf yapıdaki sülfatlanmış nanofiberlerin termal bozunma sıcaklığıdır. Amorf yapıdaki sülfatlanmış nanofiberlerin camsı geçiş sıcaklığı (T_g) 190 °C 'deki zayıf endotermik pik ile gözlemlenmiştir.



Şekil 4.32 S/Fibroin-M nanofiberlerin DSC termogramı

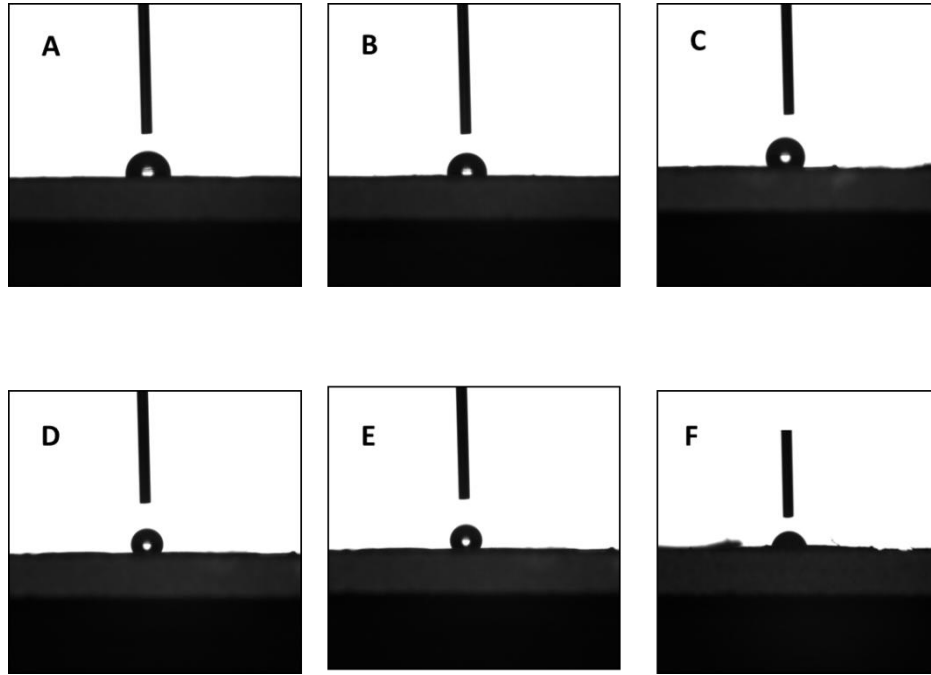
4.5. Biyonanotekstillerin Yüzey Özellikleri

Nanobiyotekstillerin temas açısı değerleri Tablo 4.2’de ve damla şekilleri Şekil 4.33’de verilmiştir. Metanol ile muamele edilmiş Fibroin örneklerinin temas açısı değeri 100° olarak bulunmuştur. Bu değer ipek fibroin örnek yüzeylerinin hidrofobik olduğunun ve yara yüzeyine yapışmayacağını bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Daha önceki çalışmalarda metanol muamelesi ile silk II konformasyonuna geçirilmiş fibroinin ham fibroine oranla daha yüksek temas açısı ve hidrofobikliğe sahip olduğunu gösterilmiştir. (Cai, Yao ve ark. 2002; Jin, Park ve ark. 2004; Hofmann, Wong Po Foo ve ark. 2006). Metanol muamelesi uygulanmış Fibroin-M ve Ag/Fibroin-M hemen hemen aynı temas açısı değerini göstermektedir. Bu sonuç Ag/Fibroin yüzeyindeki Ag nanopartiküllerin yüzey temas açısı değerini değiştirmedığını göstermektedir. PEI(10)/Fibroin-G, PEI(20)/Fibroin-G ve PEI(30)/Fibroin-G nanofiberler incelendiğinde sırasıyla temas açısı değerleri 109° , 142° ve 155° olarak bulunmuştur. PEI derişimi artıkça nanofiberlerin temas açısının arttığı dolayısı ile hidrofobikliğin arttığı görülmüştür. Glutaraldehit ile çapraz bağlanma reaksiyonu gösteren PEI normal PEI’e göre daha fazla hidrofobik karakter gösterir. Bunun nedeni serbest amin gruplarının

çapraz bağlanma reaksiyonuna girerek yüzey yükünü azaltmasıdır (Gölander ve Eriksson 1987). Artan PEI miktarı ile birlikte çapraz bağlanmanın arttığı ve bununla birlikte yüzey özelliklerinin (porozite, yüzey yükü) değişerek daha hidrofobik olduğu düşünülmektedir. Sülfatlanmış fibroin nanofiberler incelendiğinde, temas açısı değeri 54° bulunmuştur. Sülfat grupları fibroin yüzeylere oldukça hidrofilik özellik katmış olup ve bu sonuç Wenk ve ark. yapmış olduğu çalışma ile örtüşmektedir (Wenk, Murphy ve ark. 2010).

Çizelge 4.2 Biyonanotekstillerin temas açısı değerleri

Örnek	Fibroin -M	Ag/Fibroin -M	PEI(10)/Fibroin -G	PEI(20)/Fibroin -G	PEI(30)/Fibroin -G	S/Fibroin -M
Temas Açısı Değeri (°)	100±2	98±2	109±3	142±2	155±3	54±2



Şekil 4.33 Biyonanotekstillerin yüzeylerindeki su damlasının görüntüleri;
A) Fibroin-M, B) Ag/Fibroin-G, C) PEI(10)/Fibroin-G, D) PEI(20)/Fibroin-G,
E) PEI(30)/Fibroin-G, F) S/Fibroin-M

4.6. Biyonanotekstillerin Sitotoksosite Test Sonuçları

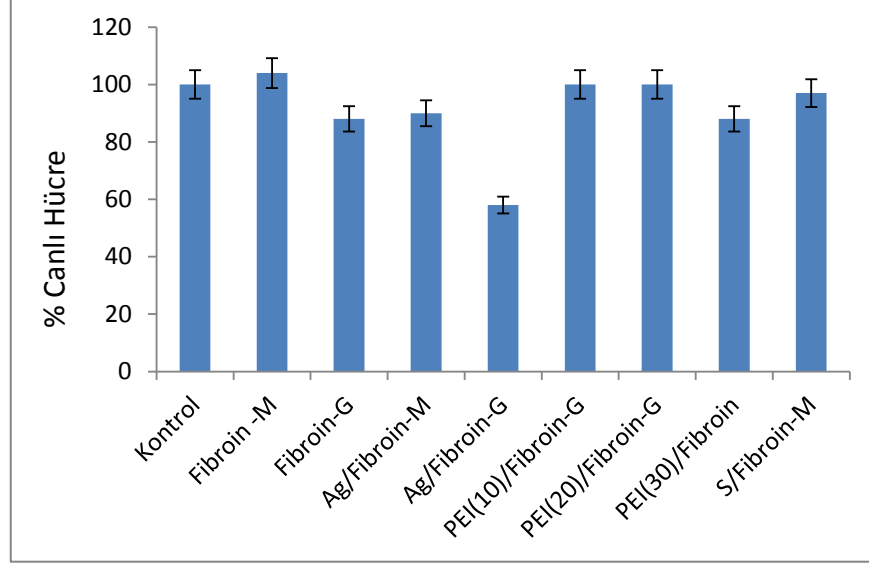
Nanofiberlerin sitotoksisitelerini belirlemek amacıyla ISO 10993-5:2009(E) standardına göre indirekt sitotoksosite testi uygulanmıştır. Metanol muamelesi ile kararlı hale getirilen örneklerde (Fibroin-M) hücre canlılığı % 104 olarak bulunmuş olup ve kontrol grubuna göre %4 artmıştır. Bu örneklerin oldukça biyouyumlu olduğu ispatlanmıştır. Fibroin nanofiberleri kararlı hale geçirmek için glutaraldehit kullanıldığında ise % hücre canlılığı 88'dir. Bu değer kontrol grubuna göre %12 oranında düşük olmasına rağmen biyouyumluluk sınırları içerisinde dir.

Glutaraldehit muamele edilmiş örneklerin metanol muamele edilmiş örneklere göre daha düşük biyouyumluluk göstermesinin sadece glutaraldehit etkisinden olmayıp, morfoloji farklılığından meydana geldiği düşünülmektedir.

Ag nanopartiküller ihtiva eden fibroin nanofiber membranlar incelendiğinde sitotoksosite sonuçları metanol ve glutaraldehit kullanılmasına göre değişkenlik göstermiştir. Silk II (β -kristalin) yapıdaki Ag/Fibroin-M örneklerin % hücre canlılık değeri 90 iken Silk I amorf yapıdaki Ag/Fibroin-G örneklerinde 58 olarak bulunmuştur. Bu değişikliğin nedeninin glutaraldehitin etkisinden değil fiberlerin morfolojilerinde saklı olduğu düşünülmektedir. Metanol muamelesi uygulanmış Ag/Fibroin nanofiberlerin termal ve yapısal analizleri nanofiberlerin silk I yapısından silk II yapısına geçtiğini göstermektedir. Böylece nanofiberlerin yapısında bulunan Ag nanopartiküller, nanofiberlerin silk II β kristalin tabakasına geçmesiyle kristalin tabakalar arasına hapsolmuş ve ortama salınmamıştır. Ortama salınmayan gümüş nanopartiküllerde ilk aşamada hücreler için toksik etki oluşturmamaktadır. Ancak glutaraldehit buharına maruz kalan Ag/Fibroin nanofiberler ise silk I yapısında konformasyonlarını koruyarak çapraz bağlanmışlardır. Bunun sonucunda da nanofiberler arasında bulunan Ag nanopartiküller ortama salınmış ve hücreler için toksik etki oluşturmuştur. Daha önce değinildiği gibi Ag nanopartiküllerin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin olduğu bilinmektedir (AshaRani, Low Kah Mun ve ark. 2008).

Diğer taraftan %10, 20 ve 30 PEI içeren örneklere bakıldığında % canlı hücre değerleri 100, 100 ve 88 olarak bulunmuştur. % 10 ve 20 PEI içeren örnekler fibroblast hücreler için oldukça biyouyumlu bulunurken, % 30 PEI içeren örnekler ise kabul edilebilir sınırlardadır.

Sülfatlanmış ipek fibroin ise kontrol grubuna göre % 3 düştüğü görülmüştür. Bu sonuçla birlikte sülfatlanmış fibroin nanofiberler de fibroblast hücreleri için toksik etki oluşturmadığı görülmüştür.



Şekil 4.34 Nanobiyotekstillerin hücre canlılığına etkisi

4.7. Biyonanotekstillerin Mikrobiyolojik Aktiviteleri

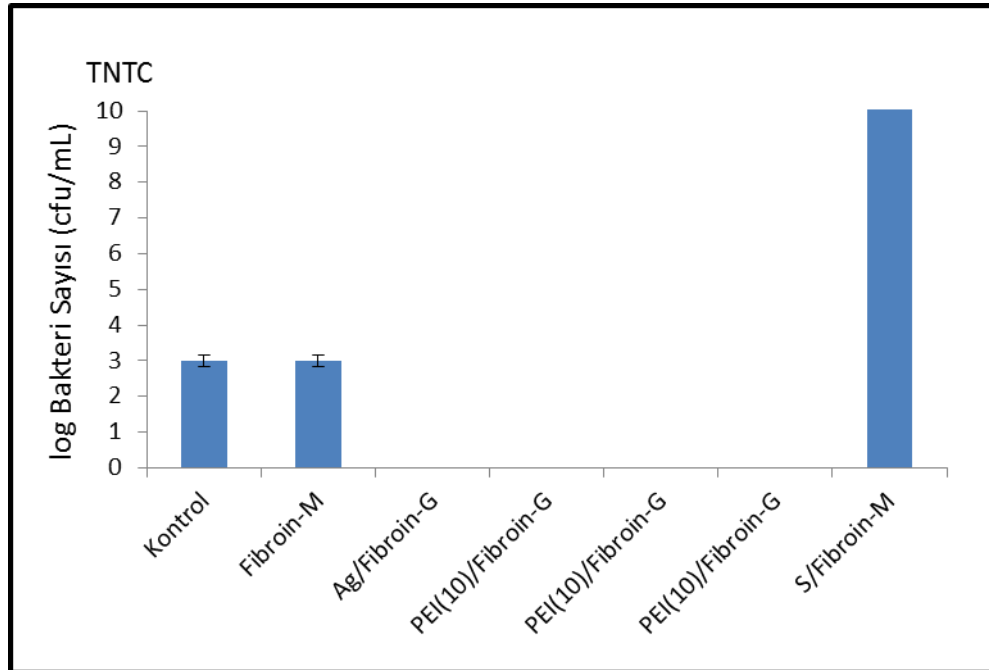
Üretilen biyonanotekstillerin antibakteriyel özellikleri yara bölgesinde enfeksiyon etkeni olarak sıklıkla izole edilen *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*' ya karşı incelenmiştir. Biyonanotekstillerin antibakteriyel aktiviteleri Fibroin-M nanofiberlere göre değerlendirilmiştir. Gümüş nanopartiküllerin antibakteriyel özellik gösterdiği birçok çalışmada kanıtlanmıştır. (Rai, Yadav ve ark. 2009; Lee, Lee ve ark. 2011) Antikoagulan ve antibakteriyel etki gösteren diğer bir malzeme de polikasyonik yapıdaki PEI polimeridir. PEI kaplamaların çok sayıda bakteriye karşı etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Tiller, Liao ve ark. 2001; Lin, Qiu ve ark. 2002; Milovi, Wang ve ark. 2005). Tüm bu malzemelerin yanında heparin benzeri sülfatlanmış fibroinin antikogulan özelliği üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur ancak antibakteriyel etkisine karşı herhangi bir çalışma yapılmamıştır (Tamada 2004; Liu. H. 2011).

Staphylococcus aureus için antibakteriyel aktivite sonuçları incelendiğinde, Fibroin-M nanofiberlerde canlı kalan bakteri sayısı $6,6 \times 10^3$ cfu/mL'dir. Bunun dışında Ag/Fibroin-G, PEI(10)/Fibroin-G, PEI(20)/Fibroin-G ve PEI(30)/Fibroin-G

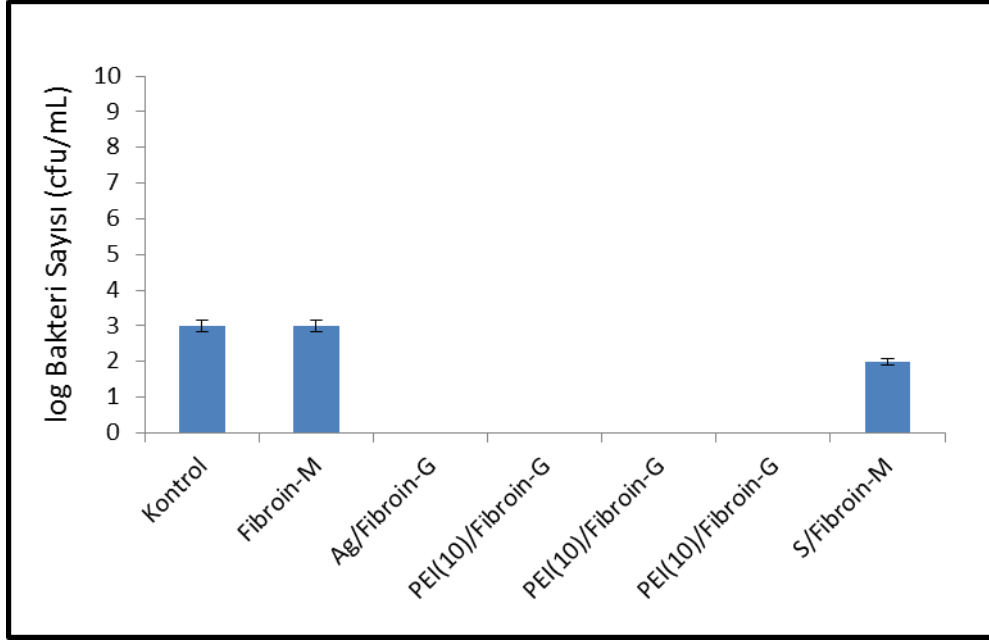
nanofiberlerde bakteriyel üremeye rastlanmamıştır. S/Fibroin-M nanofiberlerde ise sayılamayacak kadar çok bakteriyel üreme (Too Numerous To Count) (TNTC) olmuştur. *Staphylococcus aureus* için antibakteriyel aktivite test görüntüleri Şekil 4.37’de verilmiştir.

Pseudomonas aeruginosa için antibakteriyel aktivite sonuçları incelendiğinde Fibroin-M nanofiberlerde canlı kalan bakteri sayısı 3.94×10^3 cfu/mL’dir. Bunun dışında Ag/Fibroin-G, PEI(10)/Fibroin-G, PEI(20)/Fibroin-G ve PEI(30)/Fibroin-G nanofiberlerde bakteriyel üremeye rastlanmamıştır. S/Fibroin-M nanofiberlerde ise $1,1 \times 10^2$ cfu/mL kadar bakteriyel üreme gerçekleşmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* için antibakteriyel aktivite görüntüleri Şekil 4.38’de verilmiştir.

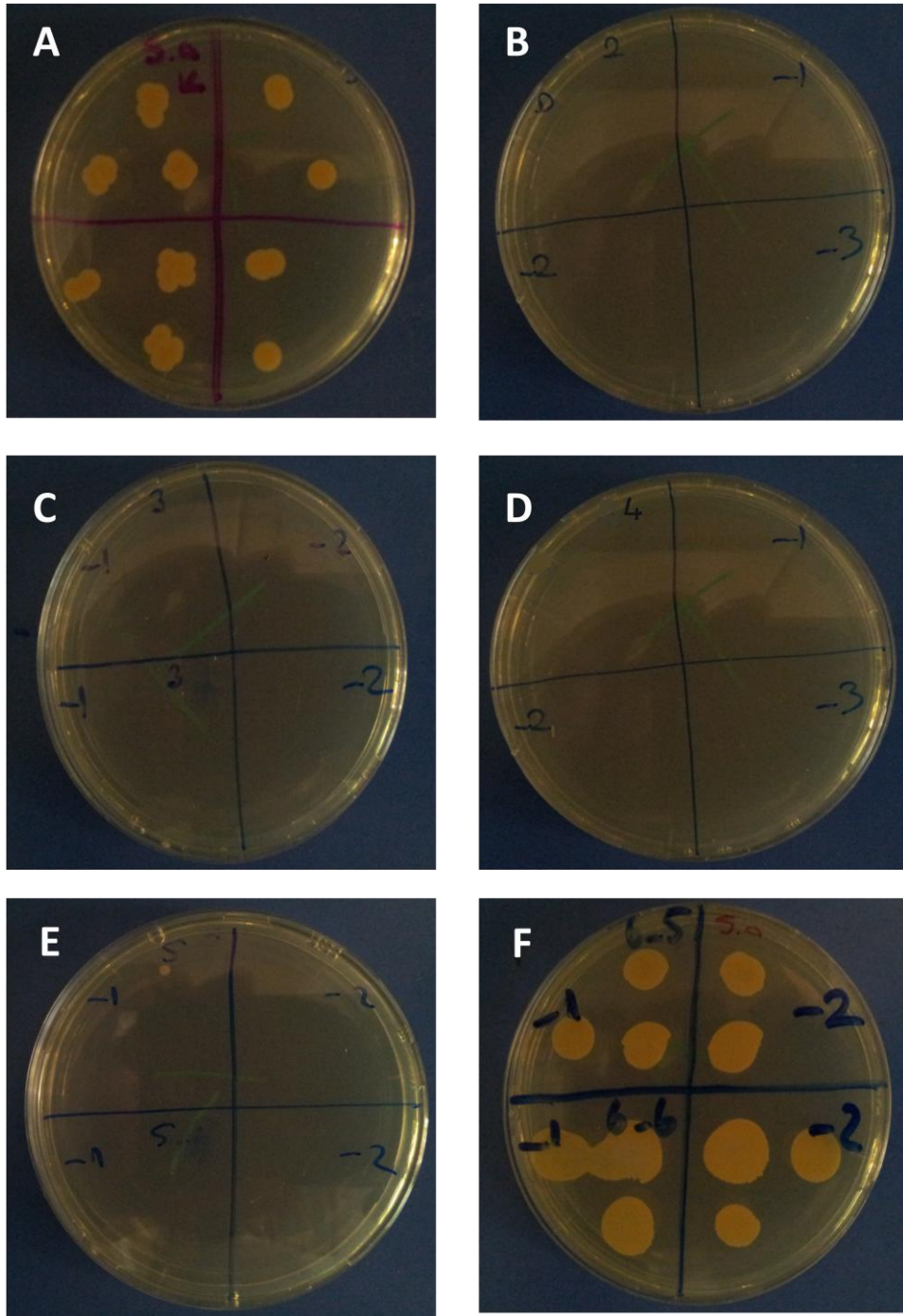
Özetle her iki bakteri içinde PEI(10)/Fibroin-G, PEI(20)/Fibroin-G ve PEI(30)/Fibroin-G nanofiberlerde görülen antibakteriyel aktivite Ag/Fibroin-G nanofiberlerde görülen aktivite kadardır. S/Fibroin nanofiberler ise *S. aureus*’a karşı herhangi bir antibakteriyel etki göstermezken *P. aeruginosa*’ya karşı bir mililitredeki bakteri sayısında, kontrol grubuna göre 1 logaritmik düşüş göstermiştir.



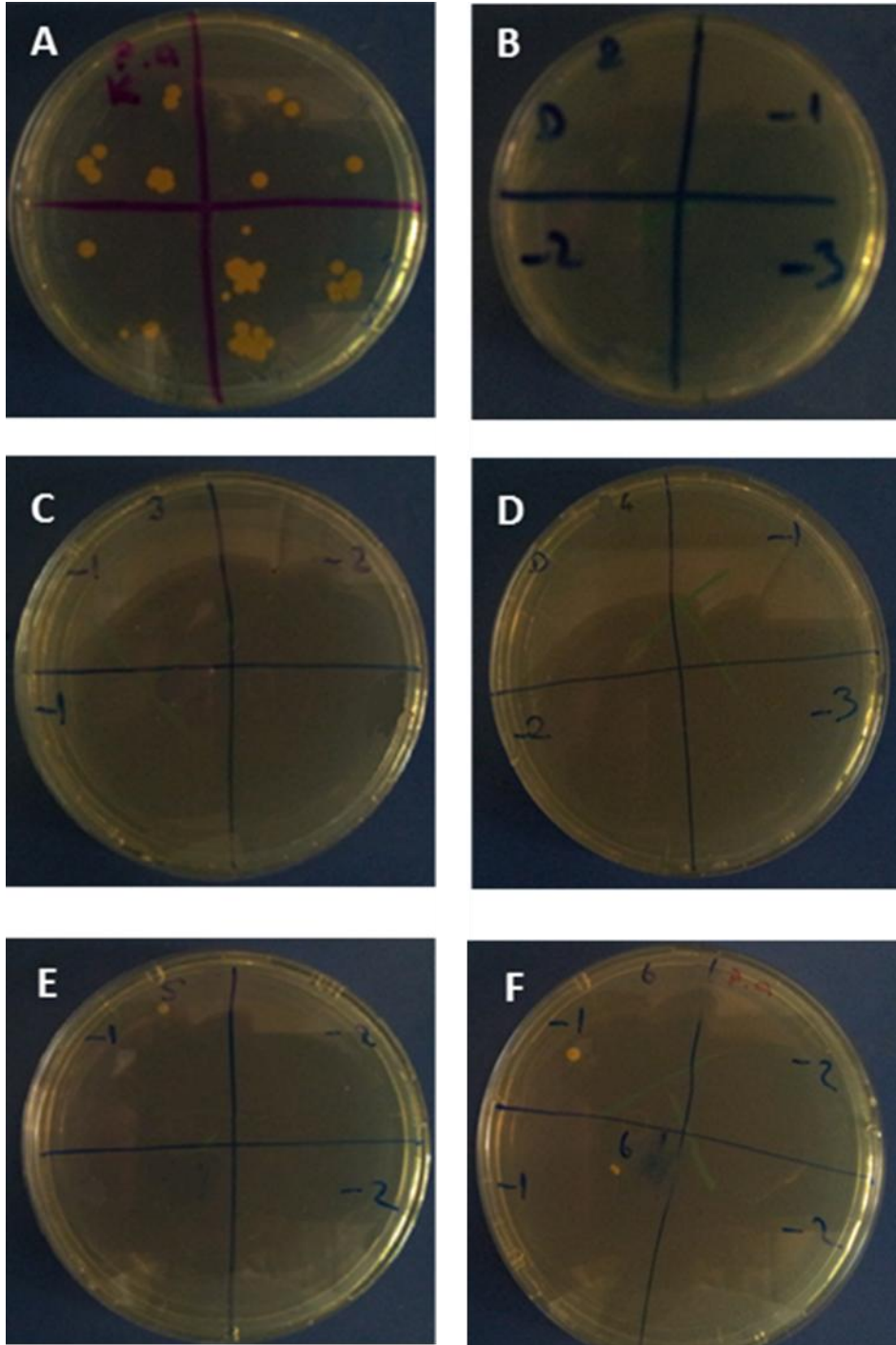
Şekil 4.35 *Staphylococcus aureus* için 5 saat sonunda bakteri sayısı (cfu/mL)



Şekil 4.36 *Pseudomonas aeruginosa* için 5 saat sonunda bakteri sayısı (cfu/mL)



Şekil 4.37 Biyonanotekstillerin *Staphylococcus aureus* için antibakteriyel aktivite test görüntüleri; A) Fibroin-M, B) Ag/Fibroin-G, C) PEI(10)/Fibroin-G, D) PEI(20)/Fibroin-G, E) PEI(30)/Fibroin-G, F) S/Fibroin-M



Şekil 4.38 Biyonanotekstillerin *Pseudomonas aeruginosa* için antibakteriyel aktivite test görüntüleri; A) Fibroin-M, B) Ag/Fibroin-G, C) PEI(10)/Fibroin-G, D) PEI(20)/Fibroin-G, E) PEI(30)/Fibroin-G, F) S/Fibroin-M

4.8. Biyonanotekstillerin Sitotoksosite ve Antibakteriyel Etkilerinin Karşılaştırılması

Bu tez kapsamında önerildiği gibi PEI içeren fibroin bazlı biyonanotekstiller antibakteriyel özelliğe sahiptir. Ag/Fibroin örneklerle karşılaştırıldığında PEI/Fibroin örneklerin daha avantajlı olduğu düşünülmektedir.

PEI/Fibroin örneklerin hücre üzerine toksik etkilerinin olmadığı bu çalışma ve literatürde yapılan çalışmalar ile ispatlanmıştır. Ancak hücrelerde başta DNA hasarı olmak üzere, gümüş nanopartiküllerden salınan Ag^+ iyonları protein ve enzimlerin tiyol gruplarına bağlanarak hücrelerin solunum ve taşıma sistemlerine zarar vermektedir. Ayrıca ortama salınan Ag^+ iyonları in-vivo' da reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşumunu artırarak hücreler üzerinde oksidatif strese neden olmaktadır. Diğer taraftan gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal aktiviteleri kısıtlıdır, sadece biyomalzemedan ortama salım yaptıkları sürece antimikrobiyal etki gösterirler. Diğer bir deyişle doza bağlı etki göstermektedirler.

Ancak PEI içeren örneklerde, polimerin kimyasal olarak kararlı olmasından dolayı antibakteriyel özelliği daha uzun süreli olacaktır. Tekstil malzemelerine bu şekilde kazandırılan antibakteriyel özellik hücresel ve çevresel zararı minimuma indirmesi açısından önem taşımaktadır (Kenawy, Worley ve ark. 2007).

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, antibakteriyel özellikte biyonanotekstillere geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaca yönelik ipek fibroin bazlı, Ag/Fibroin, PEI/Fibroin ve S/Fibroin nanofiber membranlar üretilmiş ve bunların morfolojik, termal, sitotoksik etki ve antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir.

Elektroeğirme sistemi ile üretilen ve daha sonra kararlı hale getirilen biyonanotekstillere örgüsüz yapıda düzgün fiberlerden oluştuğu SEM mikrofotografı ile gösterilmiştir.

Düşük polimer derişimlerinde (%1-10) nanofiber oluşumu gerçekleşmezken “boncuk” şeklinde yapıların oluştuğu gözlenmiştir. Polimer derişimi yükseltildiğinde (%10-20) ise daha düzgün yapıda nanofiber ağlarının oluştuğu gözlenmiştir. %13 (w/v) fibroin derişiminde 246 nm ortalama çapa sahip nanofiberler elde edilmiştir. Ag/Fibroin nanofiberlerin sonuçları incelendiğinde % 0.5 (w/v) AgNO₃ derişiminde 181 nm, %1 (w/v) AgNO₃ derişiminde ise 70 nm ortalama çapa sahip nanofiberler elde edilmiştir. PEI/Fibroin nanofiberler incelendiğinde %10 (w/v) PEI derişiminde 144 nm, %20 (w/v) PEI derişiminde 210 nm ve % 30 (w/v) PEI derişiminde 236 nm ortalama çapa sahip nanofiberler elde edilmiştir. PEI derişimleri arttıkça fiber çaplarında kalınlaşma meydana gelirken nanofiberlerin homojenliği ve kararlılığının bozulduğu görülmüştür. %13 (w/v) sülfatlanmış fibroin derişiminde 181 nm ortalama çapa sahip nanofiberler elde edilmiştir.

Sulu ortamda kararlı nanofiberler elde etmek için glutaraldehit buharı ve metanol muamelesi olmak üzere iki farklı yöntem uygulanmıştır. PEI/Fibroin nanofiberler ilk aşamada 24 saat glutaraldehit buharına maruz bırakılarak çapraz bağlanmışlardır. Ancak nanofiberlerin SEM analizleri incelendiğinde biyonanotekstillere nanofiber yapılarının bozularak film haline dönüştüğü izlenmiştir. Optimum GA buharına maruziyet süresinin ayarlanması için nanofiberler belirli saat aralıklarında GA buharına maruz bırakılmışlardır. Nanofiberlerin SEM analizleri incelendiğinde GA buharına maruziyet süresi arttıkça nanofiber çaplarında artış olduğu gözlenmiş ve yaklaşık 12. saatten sonra nanofiberler film haline dönüşmüştür. Yapılan deneyler sonucunda nanofiberler için optimum çapraz bağlanma süresinin 3 saat olduğuna karar verilmiştir.

Fibroin, Ag/Fibroin ve S/Fibroin nanofiberler metanol muamelesi ile kararlı hale geçirilmiştir. Metanol muamelesi ile ipek fibroin amorf silk I konformasyonundan silk II konformasyonuna geçirilmiştir. β -kristalin yapısına geçen nanofiberlerin çaplarında kalınlaşma meydana gelmiştir.

FTIR, DSC ve TGA analizleriyle nanobiyotekstillerin yapısal ve termal özellikleri aydınlatılmıştır. Metanol muamelesi görmüş biyonanotekstillerin; Fibroin, Ag/fibroin ve S/Fibroin nanofiberler silk II (β -kristalin) konformasyonunda olduğu izlenmiştir. Bununla birlikte PEI/Fibroin nanofiberler silk I yapısında kararlı fiberler oluşturdukları gözlenmiştir. Biyonanotekstillerin termal analizleri incelendiğinde Fibroin nanofiberler ve Ag/Fibroin nanofiberler arasında termal olarak en kararlı yapıyı silk II (β -kristalin) konformasyonuna geçen nanofiberler göstermiştir. Bunları çapraz bağlanmış nanofiberler ve hiçbir işleminden geçmemiş nanofiberler izlemiştir.

Biyonanotekstillerin sitotoksikite sonuçları incelendiğinde, metanol muamelesi ile kararlı hale geçirilmiş membranlarda % canlı hücre oranında kontrol grubuna göre %10 düşüş yaşanmıştır. Glutaraldehit buharıyla kararlı hale geçirilmiş Ag/Fibroin nanofiberlerin sitotoksikite sonuçları incelendiğinde, % canlı hücre oranında kontrol grubuna göre % 42 düşüş yaşanmıştır. Bu sonuç ışığında glutaraldehit buharıyla kararlı hale geçirilmiş Ag/Fibroin nanofiberlerin fibroblast hücreleri için oldukça toksik olduğu görülmüştür. Metanol muamelesi uygulanmış Ag/Fibroin nanofiberlerin termal ve yapısal analizleri, nanofiberlerin silk I yapısından silk II yapısına geçtiğini göstermektedir. Böylece nanofiberlerin yapısında bulunan Ag nanopartiküller, nanofiberlerin silk II β kristalin tabakasına geçmesiyle kristalin tabakalar arasına hapsolmuş ve ortama salınmamıştır. Ortama salınmayan gümüş nanopartiküllerde ilk aşamada hücreler için toksik etki oluşturmamaktadır. Glutaraldehit buharına maruz kalan Ag/Fibroin nanofiberler ise silk I yapısında konformasyonlarını koruyarak çapraz bağlanmışlardır. Bunun sonucunda da nanofiberler arasında bulunan Ag nanopartiküller ortama salınmış ve hücreler için toksik etki oluşturmuştur.

Biyonanotekstillerin antibakteriyel aktivite sonuçlarında, *Staphylococcus aureus* için antibakteriyel aktivite sonuçları incelendiğinde; Fibroin-M ve S/Fibroin-M nanofiberlerde antibakteriyel etki gözlenmezken, Ag nanopartikül içeren biyonanotekstiller ve PEI içeren biyonanotekstillerde bakteriyel üremeye

rastlanmamıştır. *Pseudomonas aeruginosa* için antibakteriyel aktivite sonuçları Fibroin-M antibakteriyel etki gözlenmezken, benzer şekilde Ag/Fibroin ve PEI/Fibroin örneklerinde bakteriyel üremeye rastlanmamıştır. S/Fibroin nanofiberler *S. aureus*'a karşı herhangi bir antibakteriyel etki göstermezken *P. aeruginosa*'ya karşı bir mililitredeki bakteri sayısında kontrol grubuna göre 1 logaritmik düşüş göstermiştir.

Sonuç olarak *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* için PEI/Fibroin biyonanotekstilllerinin gümüş nanopartiküller içeren örnekler kadar antibakteriyel etkiye sahip olduğu görülmüştür. Diğer taraftan, bu tez kapsamında önerilen PEI içeren fibroin bazlı biyonanotekstiller antibakteriyel özelliklerinin olması ve biyoyumlulukları nedeniyle Ag/Fibroin örneklerden daha avantajlı oldukları görülmüştür. Bu nedenle PEI/Fibroin biyonanotekstillerin yeni nesil yara örtüsü olarak yara iyileşmesini teşvik edeceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Ahamed, M., M. Karns, et al. (2008). "DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells." Toxicology and Applied Pharmacology **233**(3): 404-410.

Altman, G. H., F. Diaz, et al. (2003). "Silk-based biomaterials." Biomaterials **24**(3): 401-416.

Aoyagi, S., H. Onishi, et al. (2007). "Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds." International journal of pharmaceutics **330**(1): 138-145.

Arai, T., G. Freddi, et al. (2004). "Biodegradation of Bombyx mori silk fibroin fibers and films." Journal of applied polymer science **91**(4): 2383-2390.

Basal, G., D. Altýok, et al. (2010). "Antibacterial properties of silk fibroin/chitosan blend films loaded with plant extract." Fibers and Polymers **11**(1): 21-27.

Beyth, N., I. Yudovin-Farber, et al. (2006). "Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against Streptococcus mutans." Biomaterials **27**(21): 3995-4002.

Blaker, J., S. Nazhat, et al. (2004). "Development and characterisation of silver-doped bioactive glass-coated sutures for tissue engineering and wound healing applications." Biomaterials **25**(7-8): 1319-1329.

Cai, K., K. Yao, et al. (2002). "Poly(d,l-lactic acid) surfaces modified by silk fibroin: effects on the culture of osteoblast in vitro." Biomaterials **23**(4): 1153-1160.

Fang, X., S. Xiao, et al. (2011). "Fabrication and characterization of water-stable electrospun polyethyleneimine/polyvinyl alcohol nanofibers with super dye sorption capability." New Journal of Chemistry **35**(2): 360-368.

Fedorova, N. and B. Pourdeyhimi (2007). "High strength nylon micro and nanofiber based nonwovens via spunbonding." Journal of applied polymer science **104**(5): 3434-3442.

Fortune, J. A., T. I. Novobrantseva, et al. (2011). "Highly Effective Gene Transfection In Vivo by Alkylated Polyethylenimine." Journal of Drug Delivery **2011**.

Fuchs, S., A. Motta, et al. (2006). "Outgrowth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials." Biomaterials **27**(31): 5399-5408.

Gopal, R., S. Kaur, et al. (2006). "Electrospun nanofibrous filtration membrane." Journal of Membrane Science **281**(1–2): 581-586.

Gölander, C. G. and J. C. Eriksson (1987). "ESCA studies of the adsorption of polyethyleneimine and glutaraldehyde-reacted polyethyleneimine on polyethylene and mica surfaces." Journal of colloid and interface science **119**(1): 38-48.

Guan, G. P., L. Bai, et al. (2009). Neovascularization of Porous Silk Fibroin Films (PSFFs) as Dermis Substitutes Implanted in Rats, Trans Tech Publ.

Hardy, J. G. and T. R. Scheibel (2010). "Composite materials based on silk proteins." Progress in polymer science **35**(9): 1093-1115.

Hong, K. H., J. L. Park, et al. (2006). "Preparation of antimicrobial poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles." Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics **44**(17): 2468-2474.

Horan, R. L., K. Antle, et al. (2005). "In vitro degradation of silk fibroin." Biomaterials **26**(17): 3385-3393.

Jeon, O., H. S. Yang, et al. (2008). "Heparin-conjugated polyethylenimine for gene delivery." Journal of Controlled Release **132**(3): 236-242.

Jiang, X., Q. Chen, et al. (2010). "Surface modification of silk fibroin films with zwitterionic phosphobetaine to improve the hemocompatibility." Journal of Wuhan University of Technology--Materials Science Edition **25**(6): 969-974.

Jin, H.-J., J. Park, et al. (2004). "Biomaterial Films of Bombyx Mori Silk Fibroin with Poly(ethylene oxide)." Biomacromolecules **5**(3): 711-717.

Jin, H. J., J. Chen, et al. (2004). "Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats." Biomaterials **25**(6): 1039-1047.

Kenawy, E.-R., S. D. Worley, et al. (2007). "The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review." Biomacromolecules **8**(5): 1359-1384.

Khanam, N., C. Mikoryak, et al. (2007). "Electrospun linear polyethyleneimine scaffolds for cell growth." Acta Biomaterialia **3**(6): 1050-1059.

Kharlampieva, E., V. Kozlovskaya, et al. (2010). "Flexible Silk-Inorganic Nanocomposites: From Transparent to Highly Reflective." Advanced Functional Materials **20**(5): 840-846.

Kim, U.-J., J. Park, et al. (2005). "Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin." Biomaterials **26**(15): 2775-2785.

Kim, U.-J., J. Park, et al. (2004). "Structure and Properties of Silk Hydrogels." Biomacromolecules **5**(3): 786-792.

Kowalewski, T., S. NSKI, et al. (2005). "Experiments and modelling of electrospinning process." TECHNICAL SCIENCES **53**(4).

Kundu, J., R. Mohapatra, et al. (2011). "Silk Fibroin/Sodium Carboxymethylcellulose Blended Films for Biotechnological Applications." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, **22** **4**(6): 519-539.

Lawrence, B. D., S. Wharram, et al. (2010). "Effect of hydration on silk film material properties." Macromolecular bioscience **10**(4): 393-403.

Laurencin, C. T. and L. S. Nair (2008). Nanotechnology and Tissue Engineering: The Scaffold, CRC Press.

Lee, H. J., S. G. Lee, et al. (2011). "Antimicrobial polyethyleneimine-silver nanoparticles in a stable colloidal dispersion." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **88**(1): 505-511.

Li, C., C. Vepari, et al. (2006). "Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering." Biomaterials **27**(16): 3115-3124.

Li, D. and Y. Xia (2004). "Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?" Advanced Materials **16**(14): 1151-1170.

Lin, J., S. Qiu, et al. (2002). "Bactericidal properties of flat surfaces and nanoparticles derivatized with alkylated polyethylenimines." Biotechnology progress **18**(5): 1082-1086.

Liu. H., L. X., Zhou. G., Fan. H., Fan. Y., (2011). "Electrospun sulfated silk fibroin nanofibrous scaffolds for vascular tissue engineering." Biomaterials **32**: 3784-3793.

Lu, Q., B. Zhang, et al. (2011). "Degradation Mechanism and Control of Silk Fibroin." Biomacromolecules.

Lu, S., X. Wang, et al. (2009). "Insoluble and flexible silk films containing glycerol." Biomacromolecules **11**(1): 143-150.

Lu, Y., Y. Mei, et al. (2007). "In Situ Formation of Ag Nanoparticles in Spherical Polyacrylic Acid Brushes by UV Irradiation." The Journal of Physical Chemistry C **111**(21): 7676-7681.

Luo, M. Q., C. C. Zhang, et al. (2011). "Preparation of Transparent Water-Insoluble Silk Fibroin Films." Advanced Materials Research **175**: 79-84.

Maneerung, T., S. Tokura, et al. (2008). "Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing." Carbohydrate Polymers **72**(1): 43-51.

Meinel, L., R. Fajardo, et al. (2005). "Silk implants for the healing of critical size bone defects." Bone **37**(5): 688-698.

Meinel, L., V. Karageorgiou, et al. (2004). "Bone Tissue Engineering Using Human Mesenchymal Stem Cells: Effects of Scaffold Material and Medium Flow." Annals of Biomedical Engineering **32**(1): 112-122.

Metcalf, A. D. and M. W. J. Ferguson (2007). "Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair." Biomaterials **28**(34): 5100-5113.

Miles, A. A., S. S. Misra, et al. (1938). "The Estimation of the Bactericidal Power of the Blood." The Journal of Hygiene **38**(6): 732-749.

Milovi, N. M., J. Wang, et al. (2005). "Immobilized N alkylated polyethylenimine avidly kills bacteria by rupturing cell membranes with no resistance developed." Biotechnology and bioengineering **90**(6): 715-722.

Min, B. M., G. Lee, et al. (2004). "Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro." Biomaterials **25**(7-8): 1289-1297.

Minoura, N., M. Tsukada, et al. (1990). "Fine structure and oxygen permeability of silk fibroin membrane treated with methanol." Polymer **31**(2): 265-269.

Motta, A., L. Fambri, et al. (2002). "Regenerated silk fibroin films: Thermal and dynamic mechanical analysis." Macromolecular Chemistry and Physics **203**(10-11): 1658-1665.

Park, H.-S. and Y. Park (2005). "Filtration properties of electrospun ultrafine fiber webs." *Korean Journal of Chemical Engineering* 22(1): 165-172.

Park, M. V. D. Z., A. M. Neigh, et al. (2011). "The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles." *Biomaterials* 32(36): 9810-9817.

Rai, M., A. Yadav, et al. (2009). "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials." *Biotechnology Advances* 27(1): 76-83.

Rajendran, S. and S. C. Anand (2002). "DEVELOPMENTS IN MEDICAL TEXTILES." *Textile Progress* 32(4): 1-42.

Ramakrishna, S. (2005). *An introduction to electrospinning and nanofibers*, World Scientific Pub Co Inc.

Rao, C. N. R. and A. Govindaraj (2005). *Nanotubes and nanowires*, Royal Society of Chemistry.

Rho, K. S., L. Jeong, et al. (2006). "Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing." *Biomaterials* 27(8): 1452-1461.

Rigby, A. J., S. C. Anand, et al. (1997). "Textile Materials for Medical and Healthcare Applications." *Journal of The Textile Institute* 88(3): 83-93.

Rutten, H. and P. Nijhuis (1997). "Prevention of wound infection in elective colorectal surgery by local application of a gentamicin-containing collagen sponge." *The European journal of surgery. Supplement.:= Acta chirurgica. Supplement*(578): 31.

Sahoo, S., S. L. Toh, et al. (2010). "A bFGF-releasing silk/PLGA-based biohybrid scaffold for ligament/tendon tissue engineering using mesenchymal progenitor cells." *Biomaterials* 31(11): 2990-2998.

Sawada, Y., M. Ara, et al. (1990). "Treatment of dermal depth burn wounds with an antimicrobial agent-releasing silicone gel sheet." *Burns* 16(5): 347-352.

Sawada, Y., T. Ohkubo, et al. (1994). "An evaluation of a new lactic acid polymer drug delivery system: A preliminary report." *British journal of plastic surgery* 47(3): 158-161.

Schneider, A., X. Y. Wang, et al. (2009). "Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing." Acta Biomaterialia **5**(7): 2570-2578.

Shen, Y., J. Deng, et al. (2009). "Synthesis and Characterization of a Sterically Stabilized Polyelectrolyte Using Isophorone Diisocyanate as the Coupling Reagent." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition **20**(9): 1217-1233.

Sill, T. J. and H. A. von Recum (2008). "Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering." Biomaterials **29**(13): 1989-2006.

Tamada, Y. (2004). "Sulfation of silk fibroin by chlorosulfonic acid and the anticoagulant activity." Biomaterials **25**(3): 377-383.

Tao, H., S. M. Siebert, et al. (2010). "Gold nanoparticle-doped biocompatible silk films as a path to implantable thermo-electrically wireless powering devices." Applied Physics Letters **97**(12): 123702-123702-123703.

Tiller, J. C., C. J. Liao, et al. (2001). "Designing surfaces that kill bacteria on contact." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(11): 5981.

Ulubayram, K., E. Aksu, et al. (2002). "Cytotoxicity evaluation of gelatin sponges prepared with different cross-linking agents." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition **13**(11): 1203-1219.

Um, I. C., H. Kweon, et al. (2001). "Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid." International Journal of Biological Macromolecules **29**(2): 91-97.

Vepari, C. and D. L. Kaplan (2007). "Silk as a biomaterial." Progress in polymer science **32**(8-9): 991-1007.

Vepari, C., D. Matheson, et al. (2010). "Surface modification of silk fibroin with poly (ethylene glycol) for antiadhesion and antithrombotic applications." Journal of Biomedical Materials Research Part A **93**(2): 595-606.

Wang, Y., D. J. Blasioli, et al. (2006). "Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes." Biomaterials **27**(25): 4434-4442.

Wang, Y., U. J. Kim, et al. (2005). "In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells." Biomaterials **26**(34): 7082-7094.

Wenk, E., A. R. Murphy, et al. (2010). "The use of sulfonated silk fibroin derivatives to control binding, delivery and potency of FGF-2 in tissue regeneration." *Biomaterials* 31(6): 1403-1413.

Wharram, S. E., X. Zhang, et al. (2010). "Electrospun Silk Material Systems for Wound Healing." *Macromolecular bioscience* 10(3): 246-257.

Wong, S. Y., Q. Li, et al. (2010). "Bactericidal and virucidal ultrathin films assembled layer by layer from polycationic N-alkylated polyethylenimines and polyanions." *Biomaterials* 31(14): 4079-4087.

Yamada, H., H. Nakao, et al. (2001). "Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons." *Materials Science and Engineering: C* 14(1-2): 41-46.

Zahedi, P., I. Rezaeian, et al. (2010). "A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages." *Polymers for Advanced Technologies* 21(2): 77-95.

Zeng, J., X. Xu, et al. (2003). "Biodegradable electrospun fibers for drug delivery." *Journal of Controlled Release* 92(3): 227-231.

Zhang, S., C. Kucharski, et al. (2010). "Polyethylenimine-PEG coated albumin nanoparticles for BMP-2 delivery." *Biomaterials* 31(5): 952-963.

Zhang, X., C. B. Baughman, et al. (2008). "In vitro evaluation of electrospun silk fibroin scaffolds for vascular cell growth." *Biomaterials* 29(14): 2217-2227.

Zhang, X., M. R. Reagan, et al. (2009). "Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine." *Advanced drug delivery reviews* 61(12): 988-1006.

Zhang, Y.-Q. (2002). "Applications of natural silk protein sericin in biomaterials." *Biotechnology Advances* 20(2): 91-100.

Zhong, S. P., Y. Z. Zhang, et al. (2010). "Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2(5): 510-525.

Zhu, J., H. Shao, et al. (2007). "Morphology and structure of electrospun mats from regenerated silk fibroin aqueous solutions with adjusting pH." *International Journal of Biological Macromolecules* 41(4): 469-474.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Semih ÇALAMAK

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1988

Medeni Hali : Bekar

Elektronik Posta: semihcalamak@hacettepe.edu.tr

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise: Mimarşinan Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı) (2002-2006)

Lisans: Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü (2006-2010)

Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya
Bölümü (2007-2010) (Çift-Anadal)

Yabancı Dil: İngilizce

İş Tecrübesi:

2008- Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık
Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı.