

**ANTİBAKTERİYEL ALJİNAT MİKROBALONCUK
YAPILARIN MİKROAKIŞKAN SİSTEMLE
HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF ANTIBACTERIAL ALGINATE
MICROBUBBLE STRUCTURES BY MICROFLUIDIC
SYSTEM**

FATİH EROĞLU

PROF. DR KEZBAN ULUBAYRAM

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

ÖZET

ANTİBAKTERİYEL ALJİNAT MİKROBALONCUK YAPILARIN MİKROAKIŞKAN SİSTEMLE HAZIRLANMASI

Fatih EROĞLU

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

Eylül 2021, 65 sayfa

Mikroakışkan sistemler ile üretilen mikrobaloncuklar, kontrast ajanlar olarak ultrason radyografisinde yaklaşık 30 yıldır kullanılmaktadır. Son yıllarda ise basit, hızlı ve tekrarlanabilir üretim imkânı sağlaması nedeniyle birçok biyomedikal uygulamalarda başarıyla kullanılmaya başlanmıştır. Bu uygulamalar arasında ilaç taşıma sistemleri, gen tedavisi, intravenöz oksijen taşıma ajanları, kanser tedavisi, kan-beyin bariyeri hedefli ilaç taşıyıcılar, tromboliz ve odaklanmış ultrason görüntüleme v.b. gelmektedir. Mikrobaloncuklar aynı zamanda homojen gözenek yapısına sahip doku iskeleleri üretiminde de kullanılmaktadır. Gözenekli yapıların hazırlanmasında kullanılan geleneksel yöntemler (dondurarak kurutma, faz ayırma, gazla köpürtme, parçacık uzaklaştırma, porojen kullanımı) ile üretilen yapılarda gözenek boyutu, homojenlik ve mimari tam olarak kontrol edilememekte olup üretimden üretime varyasyonlar görülmektedir. Mikroakışkan sistemlerde ise sürekli akışlı bir üretim gerçekleştiğinden dolayı üretilen mikrobaloncuklar kararlı, homojen ve dar gözenek boyut aralığına sahiptirler.

Bu tez çalışmasında T-bağlantılı mikroakışkan sistemi kullanılarak aljinat/poli(vinil alkol)/polietilenimin (Alg-PVA-PEI) mikrobaloncukların üretilmesi, bu yapılara gümüş

nanopartiküllerin (AgNP) takviyesi ile antibakteriyel özellik gösteren, gözenekli yapıların hazırlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla Alg-PVA-PEI mikrobaloncuklar T-bağlantılı mikroakışkan sistemi ile üretilerek sistem parametreleri optimize edilmiştir. Sistemde akış hızı 200 µL/dk ve gaz basıncı 9L/dk sabit tutularak, PEI ve AgNP oranına bağlı olarak 90-175 µm boyut aralığında mikrobaloncuklar elde edilmiştir. Diğer taraftan bu yapılara antibakteriyel etki kazandırmak için AgNP'ler sentezlenmiştir. AgNP'lerin ortalama çapı 31.63±3.7 nm, PDI değeri 0.11 ve yüzey yükü zeta potansiyel değeri -21.7±9.1 mV olarak bulunmuştur. Sentezlenen AgNP'ler, Alg-PVA-PEI çözeltisine eklenerek antibakteriyel mikrobaloncuklar (Alg-PVA-PEI/AgNP) üretilmiştir.

Üretilen mikrobaloncuklar kalsiyum klorür (CaCl₂) ile çapraz bağlanarak; yüksek su tutma kapasitesine sahip, uzatılmış gümüş salımı sağlayan, toksik etki göstermeyen ve antibakteriyel özelliğe sahip mikrobaloncuk yapılar elde edilmiştir. Elde edilen mikrobaloncuk yapıların su tutma kapasiteleri %3685-4300 arasında bulunmuştur. AgNP'lerin aljinat mikrobaloncuk yapılarından salım profilleri incelenmiş ve AgNP'lerin mikrobaloncukların yüksek hidrofilik doğası nedeniyle ilk 24 saatte hızlı salım sergilediği ve daha sonra ise salımın 7 güne kadar uzadığı gözlemlenmiştir. % 0.05 oranında AgNP ve % 1 oranında PEI içeren mikrobaloncuk yapılar %105 hücre canlılığı gösterirken 72 saat sonunda 2605 ppb AgNP salımı tespit edilmiştir. Bu değer üzerindeki AgNP miktarının hücre canlılığını olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir. Disk difüzyon test sonuçlarına göre Alg-PVA içeren mikrobaloncuk yapılar antibakteriyel etki göstermez iken, PEI ve AgNP içeren mikrobaloncuk yapılar gram negatif *Escherichia coli* (*E. coli*-ATCC 25922) ve gram pozitif *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*-ATCC 29213), *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (*MRSA*) bakteri türlerine karşı yüksek oranda antibakteriyel özellik göstermiştir. Sonuç olarak, PEI ve AgNP içeren mikrobaloncuk yapıların uzun süreli antibakteriyel aktiviteleri, yüksek su tutma kapasitesi, hücre uyumluluğu göz önüne alındığında, enfekte ve yüksek eksudalı yaralar için iyi bir yara örtüsü adayı olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: T-bağlantılı mikroakışkan sistem, mikrobaloncuk, aljinat, gözenekli, antibakteriyel, gümüş nanopartikül.

ABSTRACT

PREPARATION OF ANTIBACTERIAL ALGINATE MICROBUBBLE STRUCTURES BY MICROFLUIDIC SYSTEM

Fatih EROGLU

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

September 2021, 65 pages

Microbubbles produced with microfluidic systems have been used as contrast agents in ultrasound radiography for approximately 30 years. In recent years, it has been successfully used in different biomedical applications due to its simple, fast and reproducible production possibilities. These applications include drug delivery systems, gene therapy, intravenous oxygen transport agents, cancer therapy, blood-brain barrier targeted drug carriers, thrombolysis and focused ultrasound imaging. Microbubbles are also used in the production of scaffolds with homogeneous pore distribution. Pore size, homogeneity and architecture can not be fully controlled in structures produced by traditional methods such as freeze drying, phase separation, gas foaming, particle removal or use of porogen. In microfluidic systems, on the other hand, since a continuous flow production takes place, the microbubbles are stable, homogeneous and have a narrow pore size range.

In this thesis, it was aimed to produce alginate/poly(vinyl alcohol)/polyethyleneimine (Alg-PVA-PEI) microbubbles using T-junction microfluidic system, and to prepare porous structures with antibacterial properties by supplementing these structures with

silver nanoparticles (AgNP). For this purpose, Alg-PVA-PEI microbubbles were produced with T-junction microfluidic system and system parameters were optimized. By keeping the constant flow rate of 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ and the gas pressure of 9L/min in the system, microbubbles in the size range of 90-175 μm were obtained depending on the ratio of PEI and AgNP in polymer solution. On the other hand, AgNPs were synthesized to give antibacterial properties to these structures. Average diameter of AgNPs was $31.63\pm 3.7\text{nm}$, PDI value was 0.11 and surface charge zeta potential value was $-21.7\pm 9.1\text{mV}$. Antibacterial microbubbles (Alg-PVA-PEI/AgNP) were produced by adding the synthesized AgNPs to the Alg-PVA-PEI solution.

Microbubble structures with high water retention capacity, extended silver nanoparticles release profile, non-toxic and antibacterial properties were obtained when microbubbles were cross-linked with calcium chloride (CaCl_2). The water retention capacity of the microbubble structures were found to be between 3685-4300 %. The release profiles of AgNPs from alginate microbubble structures were examined and it was observed that AgNPs exhibited a burst release in the first 24 hours due to the highly hydrophilic nature of the microbubble structure and then release was extended up to 7 days. While microbubble structures containing 0.05% AgNP and 1% PEI showed 105% cell viability and 2605 ppb AgNP release after 72 hours. It was observed that the amount of AgNP above this value adversely affected cell viability. According to the disk diffusion test results, microbubble structures containing Alg-PVA did not show antibacterial effect, whereas microbubble structures containing PEI and AgNP exhibited high antibacterial properties against gram-negative *Escherichia coli* (*E. coli*-ATCC 25922) and gram-positive *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*-ATCC 29213), ATCC Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacterial strains. As a result, it was concluded that PEI and AgNP containing microbubble structures could be a good wound dressing candidate for infected and highly exuding wounds, considering their long-term antibacterial activity, high water retention capacity, cellular compatibility.

Keywords: T-Junction microfluidic system, microbubble, alginate, porous, antibacterial, silver nanoparticle.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin başından sonuna kadar bilimsel ve manevi desteğini her zaman hissettiğim, bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan asla çekinmeyen, bana her türlü imkanı sağlayan ve gerekli yönlendirmeleri yapan, akademik hayatına onu tanıdığım günden beri hayranlıkla baktığım danışmanım çok kıymetli hocam Prof. Dr. Kezban Ulubayram'a,

Tez çalışmamın başlangıcından sonuna kadar her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle yol gösterip yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen ve tezimi okuyup incelediği için değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Merve Gültekinoglu Bayram'a,

Hücre kültürü deneylerindeki yardımları ve tezime yaptığı katkıları için, kendisiyle birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve bilgilerini paylaşmaktan çekinmeyen, işini zevk alarak yapan Öğr. Gör. Şükrü Öztürk'e,

Deneyisel çalışmalarım sırasında bana laboratuvarında her türlü imkanı sağlayan, yüzey gerilimi ve viskozite ölçüm çalışmalarındaki katkılarından dolayı ve değerli yönlendirmeleriyle tezime katkı sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Cem Bayram'a,

Tezin salım çalışmalarındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Nusret Ertaş ve Doç. Dr. Orkun Alp'e,

Mikrobiyoloji çalışmalarındaki katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Ceren Özkul Koçak'a,

Hayatım boyunca maddi ve manevi her desteğini hissettirdikleri gibi bu süreçte de her türlü desteği veren ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, her dakika düşünen canım annem Neslihan Eroğlu ve aslan babam Mehmet Eroğlu'na,

Bana her zaman güvenen ve her istediğimde yanımda olan ve tez çalışma sürecimde de her türlü desteği ve motivasyonu vermekten çekinmeyen canım kardeşim Nurhilal Eroğlu'na,

Hayatımda olduğu günden beri hayatımı güzelleştiren, yaşadığım tüm zorluklarda yanımda olan ve bu zorluklara karşı benimle mücadele eden, sevgisini her zaman hissettiğim biricik eşim, hayat arkadaşım Havva Sümeyye Eroğlu'na,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ ve TEZİN AMACI	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Mikropartiküller ve Mikrobaloncuklar	5
2.2. Mikroakışkan Sistemler	6
2.2.1. Mikroakışkan Sistemlerde Akış Modelleri	8
2.2.2. Mikroakışkan Sistemlerde Akış Düzenleri	9
2.2.3. Mikroakışkan Sistemlerde Partikül/Baloncuk Üretim Geometrileri ve Teknikleri.....	10
2.2.3.1. Tek Emülsiyon	10
2.2.3.2. Çift Emülsiyon	12
2.2.3.3. Janus Parçacıkları.....	12
2.3. Aljinat ve Biyomedikal Uygulamaları.....	13
2.4. Antibakteriyel Polimerler	15
2.5. Gümüş Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri	18
2.5.1. Gümüş Nanopartiküller	18
2.5.2. Gümüş Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri	19
2.5.2.1. Kimyasal ve Fotokimyasal Yöntem.....	22

2.5.2.2.	Fiziksel Yöntem.....	23
2.5.2.3.	Biyolojik Sentez	24
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	26
3.1.	Materyal	26
3.1.1.	Kullanılan Malzemeler ve Kimyasallar	26
3.2.	Yöntem.....	27
3.2.1.	Polimer Çözeltisinin Hazırlanması, Viskozite ve Yüzey Gerilimlerinin Analizi	27
3.2.2.	Gümüş Nanopartiküllerin Hazırlanması	28
3.2.3.	T-Bağlantılı Mikroakışkan Sistem ile Mikrobaloncuk Yapıların Üretimi	28
3.2.4.	Mikrobaloncukların Karakterizasyonu	29
3.2.4.1.	Mikrobaloncuk Yapıların Por Çaplarının Analizi	29
3.2.4.2.	Mikrobaloncuk Yapıların Su Tutma Kapasitesi	29
3.2.4.3.	Mikrobaloncuk Yapıların Hidrolitik Bozunma Profillerinin Belirlenmesi	29
3.2.4.4.	Mikrobaloncuk Yapıların Gümüş Salım Profillerinin Analizi	30
3.2.5.	AgNP İçeren Mikrobaloncuk Yapıların Sitotoksosite Testleri.....	30
3.2.6.	Mikrobaloncuk Yapıların Hücre Morfolojisi ve Canlılığı Üzerine Etkisi	31
3.2.7.	AgNP İçeren Mikrobaloncuk Yapıların Antibakteriyel Etkisi	31
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	33
4.1.	Gümüş Nanopartiküllerin Özellikleri.....	33
4.2.	Mikrobaloncuk Üretiminde Kullanılan Polimer Çözeltilerin Özellikleri	36
4.3.	Mikroakışkan Sistem ile Mikrobaloncuk Yapıların Üretimi	36
4.4.	Mikrobaloncuk Yapıların Boyut Dağılımları ve Morfolojileri	39
4.5.	Mikrobaloncuk Yapıların Su Tutma Kapasiteleri	43
4.6.	Mikrobaloncuk Yapıların Hidrolitik Bozunma Davranışları	44
4.7.	Mikrobaloncuk Yapıların Gümüş Salım Profilleri.....	45
4.8.	Mikrobaloncuk Yapıların Antibakteriyel Etkileri	46

4.9. Mikrobaloncuk Yapıların Sitotoksiteleri	50
4.10. Mikrobaloncuk Yapıların Hücre Canlılığına Etkisi	52
5. YORUM.....	56
6. KAYNAKLAR	57
EKLER	64
EK 1- Tez Çalışması Orjinallik Raporu	64
ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Mikrobaloncuğun şematik gösterimi.	1
Şekil 1.2. T-Bağlantılı mikroakışkan sistemi ile mikrobaloncuk üretimi.....	4
Şekil 2.1. Mikroakışkan sistemlerde akış modelleri A) Laminar akış, B) Türbülans akış.	9
Şekil 2.2. Mikroakışkan sistemlerde akış düzenleri A) Damla düzeni, B) Püskürtme düzeni.....	10
Şekil 2.3. Tek emülsiyon sistem geometrileri A) Akış odaklama, B) Ortak akış, C) T- Bağlantı.....	11
Şekil 2.4. Çift emülsiyon sistem geometrileri: A) Ortak akış ile akış odaklama kombini, B) Ortak akış ile ortak akış kombini, C) İki iç akışlı çift emülsiyon, D) T-bağlantısında ortak akışı birleştiren ortak akış.....	12
Şekil 2.5. Janus parçacığı üretiminde kullanılan geometri.	13
Şekil 2.6. Sodyum aljinatın kimyasal yapısı.....	15
Şekil 2.7. Kitin ve Kitosanın kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.8. Polietileniminin kimyasal yapısı.	18
Şekil 2.9. Gümüş nanopartikül üretim tepkimeleri.....	20
Şekil 2.10. Kimyasal sentez yöntemi.....	22
Şekil 2.11. Biyolojik sentez mekanizması.....	25
Şekil 4.1. Gümüş nanopartikül boyut dağılım grafiği.	34
Şekil 4.2. Gümüş nanopartiküllerin zeta potansiyel grafiği.....	35
Şekil 4.3 Gümüş nanopartiküllerin STEM görüntüleri. a) Gümüş nanopartiküllerin mikroskop görüntüsü, b) Gümüş nanopartiküllerin boyut ölçümleri.	35
Şekil 4.4. T-Bağlantılı mikroakışkan sistem ile mikrobaloncuk üretim düzeneğinin şematik gösterimi.....	38
Şekil 4.5. Alg-PVA Mikrobaloncuklar: A) Mikrobaloncukların oluşumu, B) Mikrobaloncukların ışık mikroskobu görüntüleri (1000x), C) Mikrobaloncukların por çap dağılımının histogram grafiği, D) 3-boyutlu gözenekli yapı.	40
Şekil 4.6. Alg-PVA-PEI0.1 Mikrobaloncuklar: A) Mikrobaloncukların oluşumu, B) Mikrobaloncukların ışık mikroskobu görüntüleri (1000x), C) Mikrobaloncukların por çap dağılımının histogram grafiği, D) 3-boyutlu gözenekli yapı.	40

Şekil 4.7. Alg-PVA-PEI1 Mikrobaloncuklar: A) Mikrobaloncukların oluşumu, B) Mikrobaloncukların ışık mikroskobu görüntüleri (1000x), C) Mikrobaloncukların por çap dağılımının histogram grafiği, D) 3-boyutlu gözenekli yapı.....	41
Şekil 4.8. Alg-PVA-PEI/0.1AgNP0.05 Mikrobaloncuklar: A) Mikrobaloncukların oluşumu, B) Mikrobaloncukların ışık mikroskobu görüntüleri (1000x), C) Mikrobaloncukların por çap dağılımının histogram grafiği, D) 3-boyutlu gözenekli yapı.	41
Şekil 4.9. Alg-PVA-PEI/0.1AgNP0.1 Mikrobaloncuklar: A) Mikrobaloncukların oluşumu, B) Mikrobaloncukların ışık mikroskobu görüntüleri (1000x), C) Mikrobaloncukların por çap dağılımının histogram grafiği, D) 3-boyutlu gözenekli yapı.	42
Şekil 4.10. Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05 Mikrobaloncuklar: A) Mikrobaloncukların oluşumu, B) Mikrobaloncukların ışık mikroskobu görüntüleri (1000x), C) Mikrobaloncukların por çap dağılımının histogram grafiği, D) 3-boyutlu gözenekli yapı.	42
Şekil 4.11. Alg-PVA/AgNP0.05 Mikrobaloncuklar: A) Mikrobaloncukların oluşumu, B) Mikrobaloncukların ışık mikroskobu görüntüleri (1000x), C) Mikrobaloncukların por çap dağılımının histogram grafiği, D) 3-boyutlu gözenekli yapı.....	43
Şekil 4.12. Mikrobaloncuk yapıların sulu ortamda kararlılıkları.	44
Şekil 4.13. 3-Boyutlu gözenekli mikrobaloncuk yapılardan gümüş nanopartikül salımı.	46
Şekil 4.14. Kontrol gruplarının antibakteriyel disk difüzyon testi inhibisyon çapları: Disk çapı 7 mm'den %0.1 PEI ile <i>E. Coli</i> bakterisine karşı 10 mm (1), %1 PEI ile <i>S. Aureus</i> 'a karşı 10.5 mm (2) ve <i>MRSA</i> bakterisine karşı 10 mm, %0.05 AgNP grubunda ise <i>E. Coli</i> 'ye karşı 10 mm (3) ve %0.1 AgNP grubunda yine <i>E. Coli</i> bakterisine karşı 10 mm'dir (4).	49
Şekil 4.15. Mikroakışkan temelli 3-Boyutlu gözenekli mikrobaloncuk yapıların antibakteriyel disk difüzyon testi-inhibisyon çapları: Başlangıç çapları 6 mm olan örnek grupları: (1) Alg-PVA grubu üç bakteri türüne karşı aktivite göstermemiştir, (2) Alg-PVA-PEI0.1 <i>S. Aureus</i> bakterisine karşı 7.3 mm, (3) Alg-PVA-PEI1 <i>S. Aureus</i> ve <i>MRSA</i> bakterilerine karşı 7 mm, (4) Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05 <i>S. Aureus</i> bakterisine karşı 10 mm, <i>E. Coli</i> 'ye karşı 11 mm ve <i>MRSA</i> 'ya karşı 10 mm, (5) Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1 <i>S. Aureus</i> bakterisine karşı 9 mm, <i>E. Coli</i> 'ye karşı 11.7 mm ve <i>MRSA</i> 'ya karşı 10 mm, (6) Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05 <i>S. Aureus</i> bakterisine karşı 10 mm, <i>E. Coli</i> 'ye karşı 9.7	

mm ve <i>MRSA</i> 'ya karşı 10.7 mm, (7) Alg-PVA/AgNP0.05 grubu ise <i>E. Coli</i> 'ye karşı 7 mm olarak ölçülmüştür (ölçek = 5 mm).	50
Şekil 4.16. MTT indirekt sitotoksosite testi: % hücre canlılığı. * $p < 0,05$ ve **** $p < 0,0001$	52
Şekil 4.17. Alg-PVA 3-boyutlu gözenekli mikrobaloncuk yapıların L929 hücre hattı ile yapılan canlı/ölü hücre kültürü testi floresans mikroskop görüntüleri: A) 24 saat, B) 72 saat (ölçek=100 μm).	53
Şekil 4.18. Alg-PVA-PEI0.1 3-boyutlu gözenekli mikrobaloncuk yapıların L929 hücre ile yapılan canlı/ölü hücre kültürü testi floresans mikroskop görüntüleri: A) 24 saat, B) 72 saat (ölçek=100 μm).	53
Şekil 4.19. Alg-PVA-PEI1 3-boyutlu gözenekli mikrobaloncuk yapıların L929 hücre hattı kullanılarak yapılan canlı/ölü hücre kültürü testi floresans mikroskop görüntüleri: A) 24 saat, B) 72 saat (ölçek=100 μm).	54
Şekil 4.20. Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05 mikrobaloncuk yapıların L929 hücre hattı kullanılarak yapılan canlı/ölü hücre kültürü testi floresans mikroskop görüntüleri: A) 24 saat, B) 72 saat (ölçek=100 μm).	54
Şekil 4.21. Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1 mikrobaloncuk yapıların L929 hücre hattı kullanılarak yapılan canlı/ölü hücre kültürü testi floresans mikroskop görüntüleri: A) 24 saat, B) 72 saat (ölçek=100 μm).	54
Şekil 4.22. Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05 mikrobaloncuk yapıların L929 hücre hattı kullanılarak yapılan canlı/ölü hücre kültürü testi floresans mikroskop görüntüleri: A) 24 saat, B) 72 saat (ölçek=100 μm).	55
Şekil 4.23. Alg-PVA/AgNP0.05 mikroakışkan temelli mikrobaloncuk yapıların L929 hücre hattı kullanılarak yapılan canlı/ölü hücre kültürü testi floresans mikroskop görüntüleri a) 24 saat, b) 72 saat (ölçek=100 μm).	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1. Mikroakışkan sistemler için kullanılan ana malzemelerin avantajları ve dezavantajları.	7
Tablo 2. Mikroakışkan sistemlerin avantajları ve dezavantajları.....	7
Tablo 3. Öncü molekülleri AgNO ₃ olan AgNP üretim yöntemleri ve özellikleri.....	21
Tablo 4. Mikrobaloncuk üretiminde kullanılan polimer kompozisyonu.....	27
Tablo 5. Mikrobaloncuk üretiminde kullanılan polimer çözeltilerinin özellikleri.....	37
Tablo 6. Mikrobaloncuk yapıların por çapı ve su tutma kapasitesi.	44
Tablo 7. Kontrol gruplarının antibakteriyel inhibisyon zon çapları.....	48
Tablo 8. Mikrobaloncuk yapıların inhibisyon zon çapları.	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

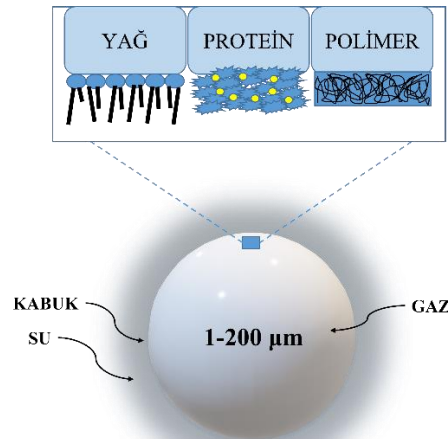
Re	Reynold sayısı
Pe	Péclet sayısı
U_a	Ortalama akış hızı
H	Sistemin karakteristik uzunluğu
D	Parçacığın/molekülün kütle difüzyon katsayısı

Kısaltmalar

Alg	Sodyum Aljinat
PVA	Poli (vinil alkol)
PEI	Polietilenimin
AgNP	Gümüş Nanopartikül
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
UV	Ultraviyole
ECM	Hücre Dışı Matriks
PDMS	Polidimetilsiloksan
PMA	Poli (metakrilik asit)
PVP	Polivinilprolidon
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
FEP	Florlanmış Etilen Polipropilen
ICP-MS	İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektroskopisi

1. GİRİŞ ve TEZİN AMACI

Mikro/nanopartiküler sistemlerin teşhis ve tedavideki kullanımı yaygınlaşmakla birlikte hızlı üretim teknolojilerine olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Son yıllarda mikroakışkan teknolojilerle üretilen mikrobaloncuklar, kontrast ajan, ilaç hedefleme, gen tedavisi, tromboliz ve odaklanmış ultrason cerrahisi, intravenöz oksijen dağıtım ajanları, kanser tedavisi, doku iskelesi ve kan-beyin bariyerinden ilaç taşınması olmak üzere birçok biyomedikal uygulamada büyük umut vaat etmektedir [1-4]. Mikrobaloncuklar; lipidler, proteinler veya polimerler gibi biyouyumlu malzemelerden meydana gelen bir kabuk içerisinde kapsüllenmiş gaz halindeki bir çekirdekten oluşur ve genellikle 1-200 μm çapındadır (Şekil 1.1) [5]. Mikrobaloncukların ilk kullanım alanı yüzey aktif bir madde ya da polimer kaplama ile stabilize edilen kontrast ajanlar olarak ultrason radyografisinde son 20-30 yılda sıklıkla kullanılmaktadır [6]. Tıbbi teşhis için kullanılan ultrason, en hızlı ve en ucuz tarama yöntemidir. Fakat manyetik rezonans görüntüleme gibi teknikler ile kıyaslandığında görüntü kalitesi genellikle daha düşüktür. Mikrobaloncuklar yüksek sıkıştırılabilirlik özellikleri sayesinde, ultrasonu kırmızı kan hücrelerinden çok daha verimli bir şekilde dağıtabilmektedirler. Ayrıca orta düzeyde uyarma basınçlarında, dağınık sinyallerinin dokuya bağlı olandan açıkça ayırt edilmesini sağlayan doğrusal olmayan bir yanıt sergilerler [7]. Bu sayede, özellikle kardiyovasküler uygulamalar ve kanser teşhisi için mükemmel bir doku perfüzyonu görüntüleme aracı sağlarlar.



Şekil 1.1. Mikrobaloncuğun şematik gösterimi.

İlaç hedefleme/salın çalışmalarında; mikrobaloncuk sistemler homojen boyut dağılımı, tek tip ilaç içeriği ve doğru dozajlamayı sağlamak açısından kritik avantajlar sağlamaktadır. Benzer şekilde, mikrobaloncuk sinyalinin karmaşık doğrusal olmayan özelliklerinden yararlanan ve/veya doku perfüzyonunun ölçülmesini sağlayan daha gelişmiş görüntüleme teknikleri geliştirildikçe, mikrobaloncuk süspansiyonunun akustik yanıtını önceden belirleme yeteneği giderek daha önemli hale gelmektedir [8].

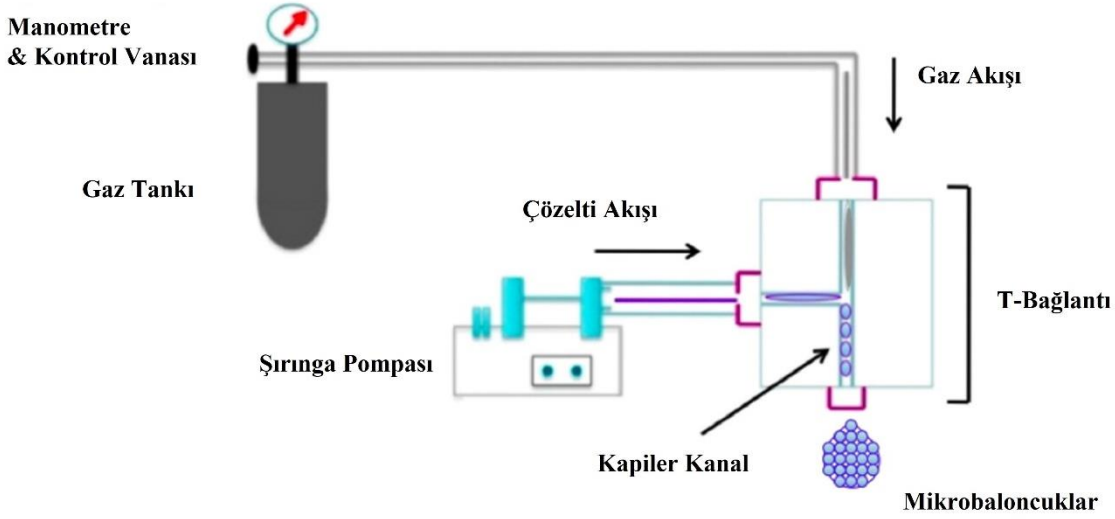
Chow ve ark., yaptıkları çalışmada beyin ve karaciğer MR görüntülerinde kontrastı arttırmak için SonoVue® tarafından sonikasyon ile üretilmiş mikrobaloncuklara demir oksit nanopartiküllerinin eklenebileceği ilk kez gösterilmiştir ve ürettikleri bu malzemenin MR görüntülerinde kontrastı arttırdığını gözlemişlerdir [2]. Mullick ve ark., ileri evre pankreas kanseri olan hastalarda yapılan ilk pilot klinik çalışmada ultrason ve mikrobaloncuk aracılı ilaç taşımının klinik uygulanabilirliğini ve güvenilirliğini göstermişlerdir [3]. Sun ve ark., hipoksik yumurtalık kanseri hücrelerinde ultrason aracılı kombinasyon tedavisi için oksijen ve paklitaksel yüklü lipit mikrobaloncukları sentezleyerek oksijen ve ilaç yüklü mikrobaloncukların ultrason aracılığı ile hipoksik yumurtalık kanseri hücrelerinde kemo direncinin üstesinden gelmek için yararlı bir yöntem olabileceğini görmüşlerdir [9]. Kim ve ark., trombolitik hızı iyileştirmek ve böylece gerekli trombolitik ilaç dozunu en aza indirmek için intravasküler mikrobaloncuk aracılı bir sonotromboliz cihazı geliştirmişlerdir ve bu cihazların lipit kabuklu mikrobaloncuk kontrast maddelerinin kavitasyonunu indüklemek için yeterli basınç oluşturabildiğini gözlemişlerdir. Bu kolloidal partiküllerin gaz halindeki çekirdekleri sıkıştırılabilir, dolayısıyla kan kılcal damarlarından geçerken veya ultrasona maruz kaldıklarında şekilleri deforme olmaktadır. Ultrasona tabi tutulduğunda, mikrobaloncuk kabuk büzülür ve genişler, bu da gelen ultrasonik radyasyonun geri saçılmasına veya kavitasyona hatta mikrobaloncuk kabuğun patlamasına neden olur. Bu özellikleri nedeniyle mikrobaloncuklar ultrasonik görüntüleme sırasında kontrast artırıcı ajanlar ve hedeflenmiş ilaç/gen taşıma sistemleri olarak kullanılmaktadır [8].

Diğer taraftan yüksek gözenekli yapılar biyomedikal alanda sıklıkla kullanılan yapılardır. Örneğin; doku mühendisliği alanında kullanılan doku iskelelerinde gözenek büyüklüğü ve morfolojisi, hücre tutunması ve proliferasyonu için önemli bir özelliktir. Genel olarak ideal gözenegin 100 ile 400 µm arasında olduğu ve maksimum ara bağlantı ile yüksek gözeneklilik (>%50) gerektiği kabul edilir [10]. Bununla birlikte, gözenek boyutunun homojen olmayan dağılımı mekanik özelliklerin zayıflaması ile sonuçlanır. Ayrıca

gözenekli biyomalzeme hazırlamak için kullanılan; faz ayırma, gazla köpürtme, parçacık uzaklaştırma, porojen kullanımı, dondurarak kurutma teknikleri gözeneklilik ve mimarinin tam olarak kontrol edilemediği geleneksel üretim yöntemleridir [10]. Diğer taraftan seçici lazer sinterleme [11], stereolitografi [12] veya kaynaştırılmış biriktirme modelleme [13] gibi 3B hızlı prototipleme teknikleri, homojen gözenek konumlandırmasını kontrol etme yeteneğine sahiptir [10]. Ancak bu tekniklerin her biri geleneksel tekniklerle karşılaştırıldığında karmaşık ve maliyetlidir. Ayrıca, fotopolimerize edilebilirlik, psödoplastiklik ve sinterleme yeteneği gibi en hızlı prototipleme tekniklerinde, her yöntemi sınırlı uyumlu malzemelerle kısıtlayan başka bazı özel yeteneklere sahip olması gerekir.

T-bağlantılı mikroakışkan sistemler ile geliştirilen mikrobaloncuk üretimi teknikleriyle hem geleneksel hem de hızlı prototipleme yöntemlerinin dezavantajlarının üstesinden gelmek mümkündür. Bu teknik basit ve hızlı üretim imkanı sağlamakla birlikte, bir şablon veya karmaşık bir kurulum gerektirmez. Sıvı fazın (polimer çözeltisi) gaz fazı yüklenmesi sonucu üretilen mikrobaloncuklar, tek bir adımda mikroakışkan düzeneğinde elde edilerek homojen ve yüksek gözeneğe sahip mikrobaloncuk yapılar elde edilebilir. Bu teknikte, mikroakışkan türevi polimerik mikro damlacıkların en önemli avantajı homojen boyut dağılımı ve bu homojen damlacıkların boyutu da sıvı fazın derişimi, viskozitesi ve akış hızları parametreleri ile hassas bir şekilde ayarlanabilir olmasıdır. T-bağlantılı mikroakışkan sisteminde mikrobaloncuk oluşum süreci üç aşamada gerçekleşir: büyüme aşaması, boyun verme aşaması ve son olarak kıştırma aşaması. Gaz ve sıvı fazları bağlantı noktasında buluşur ve bir gaz sütunu oluşmaya başlar ve baloncuk sonunda ayrılana kadar genişler.

T-bağlantılı mikroakışkan sisteminde polimer çözelti derişimi, gaz basıncı ve akış hızı değişkenlerine bağlı olarak mikrobaloncuk üretimi gerçekleşir (Şekil 1.2) [14]. Son zamanlarda, homojen ve ölçeklenebilir gözenekli aljinat yapıların tek aşamalı bir üretim yöntemi, nitrojenle hapsedilmiş monodispers aljinat mikrobaloncuk T-bağlantılı mikroakışkanlar yoluyla elde edildiği ve bu baloncukların kontrollü patlamasının yapıldığı çalışmalarda bildirilmiştir [14, 15]. Xu ve ark., gaz-sıvı faz akış modellerini ve çapraz akışlı kesme-kırma tekniğini kullanan bir T-bağlantılı mikroakışkan sisteminde partikül boyutu 100-500 µm arasında değişen mikrobaloncuklar üretmişlerdir [16].



Şekil 1.2. T-Bağlantılı mikroakışkan sistemi ile mikrobaloncuk üretimi [17].

Bu tez kapsamında ise T-bağlantılı mikroakışkan sistemleri kullanarak gümüş nanopartiküller içeren aljinat-poli(vinil alkol)-polietilenimin (Alg-PVA-PEI) gözenekli antibakteriyel mikrobaloncuk yapıların üretilmesi ve enfekte ve eksudalı yaralar için yara örtüsü potansiyeli değerlendirilmiştir.

Deniz yosunundan elde edilen doğal bir biyopolimer olan aljinat, herhangi bir organik çözücü içermeden elde edilebilen hızlı iyonik indüklü jel oluşum süreci, yüksek biyoyoumluluğu ve su tutma kapasitesi nedeniyle hidrojel yara örtüsü, doku mühendisliği ve ilaç salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca makrofajları aktive edebilir ve kronik yara iyileşmesini hızlandırmak için interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü α (TNF- α) üretmek için monositleri uyarabilen özellikleri belirgin avantajları olarak öne çıkmaktadır [18]. Diğer taraftan, sentetik bir polimer olan polietilenimin (PEI), katyonik özelliğe özelliği nedeni ile gen transfeksiyonu, antibakteriyel malzeme hazırlanmasında ve doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [19]. Poli(vinil alkol) ise yaygın olarak yara örtüleri, ilaç taşıma sistemleri, yapay organlar ve kontak lensler gibi sistemlerde kullanılan ve bilinen en eski sentetik polimerlerden biridir [20].

Sunulan tez çalışmasında aljinat ve PEI yukardaki bahsi geçen özelliklerinden dolayı, PVA ise mikroakışkan sistemde mikrobaloncuk üretimi için stabilizatör olarak ve gümüş nanopartiküller ise bilinen antibakteriyel aktivitelerinden dolayı kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikropartiküller ve Mikrobaloncuklar

Mikropartiküller, boyutları 1 µm ile 1000 µm arasında tanımlanabilen ancak ideal kullanımları 200 µm'ye kadar olan malzemelerdir. Mikropartikül sistemler ilaç taşıma, doku mühendisliği, biyoalgılama ve hücre kapsülleme gibi birçok farklı biyomedikal uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Mikropartiküllerin boyutu ve dağılımı, kimyasal yapısı, morfolojileri kullanım alanına göre farklılıklar gösterir. Bu nedenle uygulamaya yönelik bu özellikleri geliştirmek için kontrollü üretim sistemleri gerekmektedir [21].

Son zamanlarda hayvanlar, bitkiler ve bakteriler de dahil olmak üzere canlı organizmalardan türetilen biyomoleküllerin mükemmel biyoyumlulukları ve biyolojik olarak parçalanabilmeleri sayesinde mikropartikül üretiminde kullanımları artmaktadır. Bazı biyopolimerler, hücre dışı matris (ECM) benzer yapılarından dolayı fizyolojik ortamda tanınmakta ve metabolize edilebilmektedir. Bu yüzden bu tür biyopolimerlerin mikropartikül üretiminde kullanımı, genelde kronik enflamatuvar veya immünolojik reaksiyonlar ve *in vivo* toksisite gibi sentetik polimerlerle ilişkili endişelerini en aza indirmek için dikkat çekmektedir. Ek olarak, biyopolimerlerdeki hidroksil, amino ve karboksilik asit grupları dahil olmak üzere fonksiyonel grupların fazlaca varlığı, mikropartiküllere istenilen biyoaktiviteleri kazandırmak için kolaylıkla modifiye imkanı vermektedir [22].

Son yıllarda mikropartikül sistemler arasında mikrobaloncukların çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanımı giderek artmaktadır. Mikrobaloncuk, lipid ya da protein gibi biyoyumlu malzemelerden oluşan bir kabuk içerisinde kapsüllenmiş gaz halindeki bir çekirdekten oluşur ve genellikle 0,1 µm ile 200 µm çapındadır. Bu kolloidal mikrobaloncuklar 20. yüzyılın sonlarında birçok araştırmacı tarafından görüntüleme kontrast artırıcı ajan olarak kullanılmıştır [5]. Daha sonra kullanım alanları yaygınlaşarak ilaç ve gen taşıyıcı, intravenöz O₂ dağıtım ajanları, trombolitik ajanlar ve kan-beyin bariyerinden ilaç taşıma araçları olarak kullanılmıştır. Mikrobaloncukların gaz halindeki çekirdekleri sıkıştırılabilmekte ve bundan dolayı kılcal kan damarlarından geçerken ultrasona maruz kaldıklarında şekilleri deforme olmaktadır. Ultrasona tabi tutulduğunda kabukları büzülür ve genişler, bu da gelen ultrasonik radyasyonun geri saçılmasına veya

kavitasyona veya mikrobaloncuk kabuğunun patlamasına neden olur. Bu fenomenler, mikrobaloncukların ultrasonik görüntüleme sırasında kontrast artırıcı ajanlar olarak ve hedeflenmiş ilaç/gen taşıma için kullanılmasını sağlar.

2.2. Mikroakışkan Sistemler

Mikro/nanopartiküller geleneksel kesikli üretim sistemlerinde genellikle nanopresipitasyon, sol-jel, mekanik öğütme, mikro emülsiyon ve indirgeme yöntemi ile sentezlenmektedir [23]. Bu tür yöntemler “yukarıdan-aşağı” büyük boyutlu malzemelerin parçalanması ya da “aşağıdan-yukarı” olarak adlandırılan genelde çözelti formundan partikül haline getirip çöktürme ya da dondurarak kurutma gibi işlemlere dayanmakta veya çözücü ortamında çözünmüş altın gümüş gibi iyonlardan ya da molekül formundan partikül haline getirme işlemleri ile gerçekleştirilmektedir. Partiküllerin büyüklükleri ve morfolojileri gibi özellikleri üretim yöntemine bağlı olup üretimden üretime varyasyonlar göstermektedir. Aynı malzemeler ve sistem parametreleri ile üretim yapılmasına rağmen aynı sonuçların elde edilememesinden dolayı zayıf tekrarlanabilirlik, sınırlı işlevsellik ve daha az ayarlanabilir morfoloji literatürde farklı yöntemlerin araştırılmasına neden olmuştur. Bahsedilen tüm bu sorunlar mikroakışkan sistemlerin tasarlanması ve üretimde aktif bir şekilde kullanılmasını sağlamıştır.

Yaklaşık olarak 1990’lı yıllardan beri mikrobaloncuk ve nanopartikül üretimi için mikroakışkan sistemler geliştirilmektedir. Bu sistemler sürekli akışlı mikro ölçekli akışkan kanallarda sıklıkla nanopresipitasyon işlemine dayanmaktadır. Sürekli akış sistemi sayesinde çözünürlük dengesi daha stabil, homojen, hızlı ve tekrarlanabilirliği yüksek parçacıklar elde edilebilmektedir. Mikroakışkan sistemler genellikle polidimetilsiloksan (PDMS) veya camdan oluşan çeşitli malzemelerden üretilmektedir. Mikroakışkan sistemlerin üretildiği malzemelerin avantaj ve dezavantajları Tablo 1’de ve mikroakışkan sistemlerin avantaj ve dezavantajları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 1. Mikroakışkan sistemler için kullanılan ana malzemelerin avantajları ve dezavantajları [24].

Materyal	Avantajlar	Dezavantajlar
PDMS	Optik olarak şeffaf Kullanımı kolay Ucuz	Farklı organik çözücüler, asitler veya bazlarla temas halinde şişme ve bozunma Hidrofobiklik Küçük moleküllerin yüzeyinde emilmesi Temiz odalarda hazırlık ihtiyacı
Cam	Ucuz Optik olarak şeffaf Kimyasal olarak etkisiz Sert Yüksek sıcaklıklara dayanıklı Modifiye edilmesi kolay	Mikrofabrikasyon zorlukları Bazen temiz odalarda hazırlık yapılması gerekir

Tablo 2. Mikroakışkan sistemlerin avantajları ve dezavantajları.

Avantajlar	Dezavantajlar
Geniş yüzey-hacim oranları	Birçok cihaz alt tabakasının çözücü uyumluluğu zayıftır ve yüksek sıcaklığa dayanıklı değildir.
Düşük numune / çözelti tüketimi	Kanal tıkanmasına karşı hassastır.
Homojen reaksiyon ortamları sağlama	Bazı yüzeyler (cam, silika gibi) veya kalıplar pahalıdır ve temiz oda şartları gerektirir.
İstenilen boyuta ve daha dar boyut dağılımına sahip nanopartiküller	
Yüksek tekrarlanabilirliğe sahip sentez	
Reaktifleri hızlı bir şekilde karıştırabilme	

2.2.1. Mikroakışkan Sistemlerde Akış Modelleri

Mikroakışkan sistemlerde, mikrometre uzunluk ölçeği son derece belirgin ve önemli bir özelliktir. Bu sayede küçük numune hacimleri ile düşük maliyette ve hızlı analiz yapılabilirken aynı zamanda yüksek çözünürlük ve hassasiyet mevcuttur. Birbiri içerisinde çözünebilen sıvıların tam ve hızlı bir şekilde karıştırılabilmesi için mikro kanalların kullanılması yüzey-hacim oranını artırmakla birlikte yüzey geriliminin ve akışkan viskoz kuvvetlerinin etkisini de artırmaktadır.

Kapiler boru içerisindeki sıvı akışkan modelleri Reynolds sayısı (Re) ve Péclet sayısı (Pe)'na göre belirlenmektedir. Re , farklı akışkan durumları altındaki akış modelini tanımlar ve Eşitlik 1 ile hesaplanabilir.

$$Re = \frac{\rho v L}{\mu} \quad \text{Eşitlik 1}$$

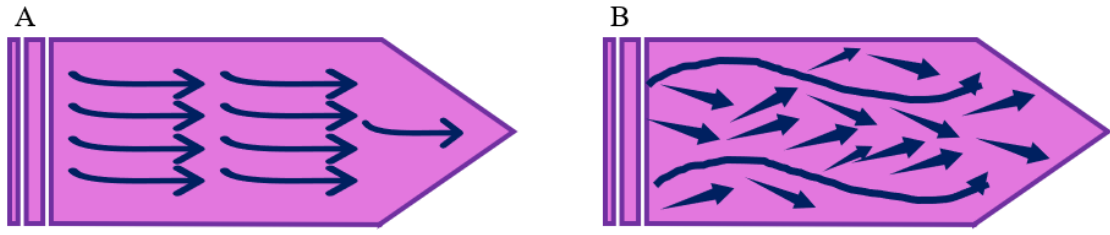
Burada, ρ sıvının yoğunluğunu, v sıvının hızını, L borunun çapı ve μ sıvının viskozitesidir. Genellikle $Re < 1800$ ise daha belirgin ve akışkan yönüne paralel olan laminar akış (Şekil 2.1 A), $Re > 2300$ ise belirgin çizgileri olmayan karışık bir akış olarak bilinen türbülans akış (Şekil 2.1 B) oluşmaktadır. Re sayısının 1800 ile 2300 arası olduğu durumlar ise laminar akıştan türbülans akışa geçiş başlangıcıdır. Laminar akış sabit akış çizgileriyle karakterize edildiği için, bu sistemlerde ilaç kapsülleme ve tek dağılımlı partiküller elde etmek için daha kullanışlı ve kontrol edilebilirdir [24-26].

Diğer yandan Péclet sayısı, sıvılarda moleküllerin difüzyonunu veya konveksiyonunu yansıtan mikro akışkanlarda bir başka önemli parametredir ve Eşitlik 2 ile hesaplanmaktadır.

$$Pe = \frac{U_a H}{D} \quad \text{Eşitlik 2}$$

Bu denklemde, U_a ortalama akış hızını, H sistemin karakteristik uzunluğu ve D ise ilgili parçacığın/molekülün kütle difüzyon katsayısıdır. Damlacık mikro akışkanlarında genellikle moleküllerin transferi yavaş bir şekilde gerçekleşmektedir ve bu küçük hacimler ve laminar akış modellerinden kaynaklanmaktadır. Esasen, konveksiyon yoluyla değil difüzyon yoluyla meydana gelmektedir. Bundan dolayı moleküllerin

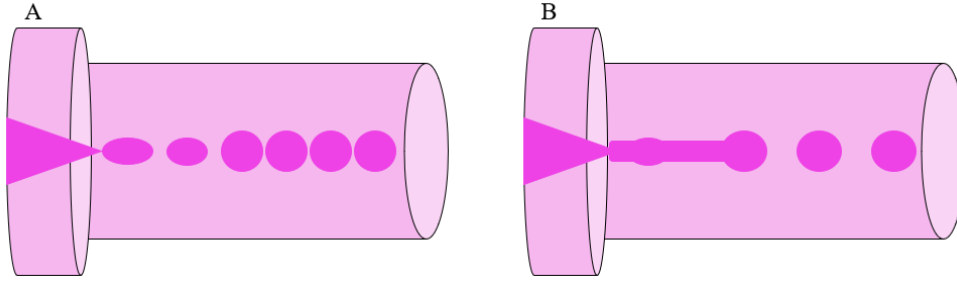
dağılmış halden sürekli faza transferi en aza indirilmekte ve ardından damlacıklara ilaç kapsüllemesi daha olanaklıdır.



Şekil 2.1. Mikroakışkan sistemlerde akış modelleri A) Laminar akış, B) Türbülans akış.

2.2.2. Mikroakışkan Sistemlerde Akış Düzenleri

Mikroakışkan sistemlerin, monodispers damlacık üretiminde kontrollü ortam sunan ve geleneksel yağın yöntemlerine karşı güvenilir bir alternatif olarak ortaya çıktığı bilinmektedir. Damlacık oluşumu sıvı dengesizliklerinin sonucudur ve akışkan viskozitesinin kuvvetinden daha yüksek bir sürüklenme kuvvetinin oluşması üzerine gerçekleşmektedir. O noktada damlacık oluşmakta ve dağılmış fazdan kopmaktadır. Sürekli fazın yüksek hacmi, partikül stabilizasyonunu sağlamayı ve ardından birbirleri ile birleşmelerini engellemeyi belirlemektedir. Birbirine karışmayan sıvının diğerine katılması genellikle iki ana olay ile sonuçlanır: sürekli damlacık düzeni (Şekil 2.2 A) ve püskürtme düzeni (Şekil 2.2 B). Damlacık düzeninde, yüzey gerilimi kuvveti ve çekme viskoz sürüklenme arasındaki denge damla oluşumuyla sonuçlanmaktadır [24]. Diğer yandan püskürtme düzeni, Rayleigh-Plateau dengesizliği ile açıklanmaktadır. Bir sıvı akışı daha az yüzey alanına sahip ancak aynı hacme sahip daha küçük kısımlara ayrılmaktadır.



Şekil 2.2. Mikroakışkan sistemlerde akış düzenleri A) Damla düzeni, B) Püskürtme düzeni.

2.2.3. Mikroakışkan Sistemlerde Partikül/Baloncuk Üretim Geometrileri ve Teknikleri

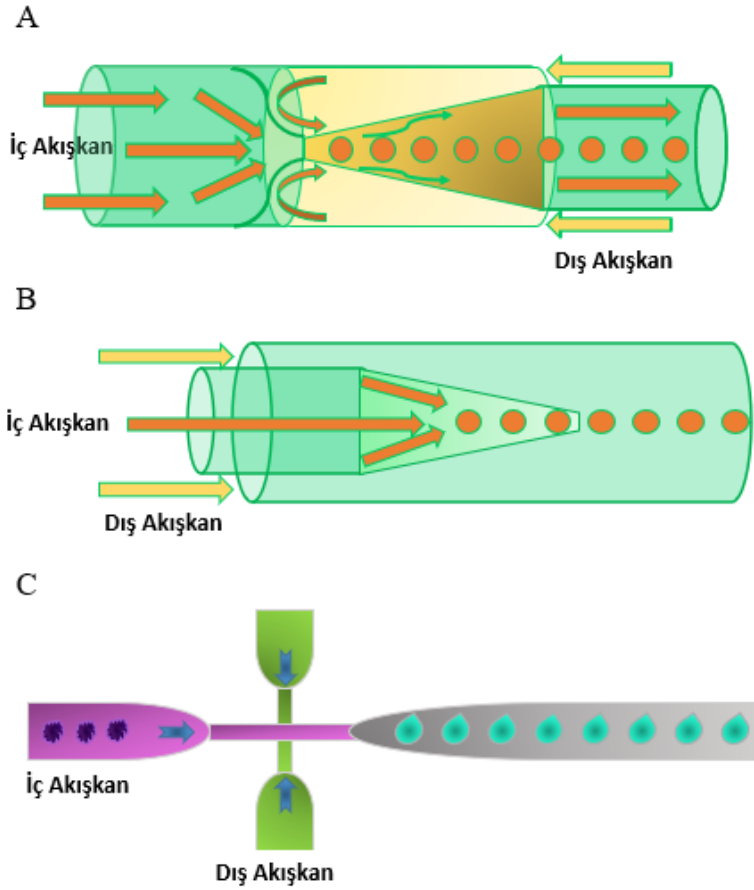
Mikroakışkan sistemler ile partikül ve baloncuk üretiminde farklı geometriler kullanılmaktadır. Bunlar tek emülsiyon ve çift emülsiyon olarak bilinmekte ve ayrıca janus parçacıkları üretimi yapmak için daha farklı bir geometri kullanılmaktadır. Tek emülsiyonlu sistemler, akış odaklama (Şekil 2.3 A), ortak akış (Şekil 2.3 B) ve T-bağlantısı (Şekil 2.3 C) geometrisi ile adlandırılmakta iken çift emülsiyon sistemler ise bu sistemlerin birbiri ile bağlanmasıyla meydana getirilir ve çift emülsiyon sistemlerde genellikle çekirdek-kabuk yapıda (core-shell) partiküller üretilmektedir. Her sistemde de dağıtılacak faz bir mikro kanala sürülür ve burada bağımsız olarak hareket ettirilen dağıtılacak faza karışmayan bir sıvı ile taşınır [15]. Bunun haricinde dağıtılacak fazın kararlı bir gaz ile taşınıp mikrobaloncuk üretimi yapılan çalışmalar da mevcuttur [10, 14, 17]. Bu yöntemler kullanılarak üretilen partikül boyutları sürekli faz çözeltinin özellikleri (yoğunluk ve viskozite), çözeltinin akış hızı, nozülün çapı ve bunlar arasındaki ara yüzey gerilimleri gibi parametrelere bağlıdır ve üretilen partiküller bu parametreler değiştirilerek istenilen boyutlarda monodispers bir şekilde ayarlanabilmektedir. Bu sistemler aşağıda açıklanmıştır.

2.2.3.1. Tek Emülsiyon

Tek emülsiyon sistemlerde iki farklı birbirine karışmayan sıvının (ya da bir sıvı bir gaz olarak) birinin diğerine dağıtılması ile oluşan bir karışımdan meydana gelmektedir. Tek emülsiyonlar yağ farklı sürekli bir su fazında dağıldığında O/W (oil in water) ve suyun bir yağ fazında dağılmış faz olarak olduğunda ise W/O (water in oil) olarak

adlandırılmaktadır. Bu sistemlerde akış odaklama, ortak akış ve T-bağlantı olmak üzere üç farklı ana geometri kullanılmaktadır.

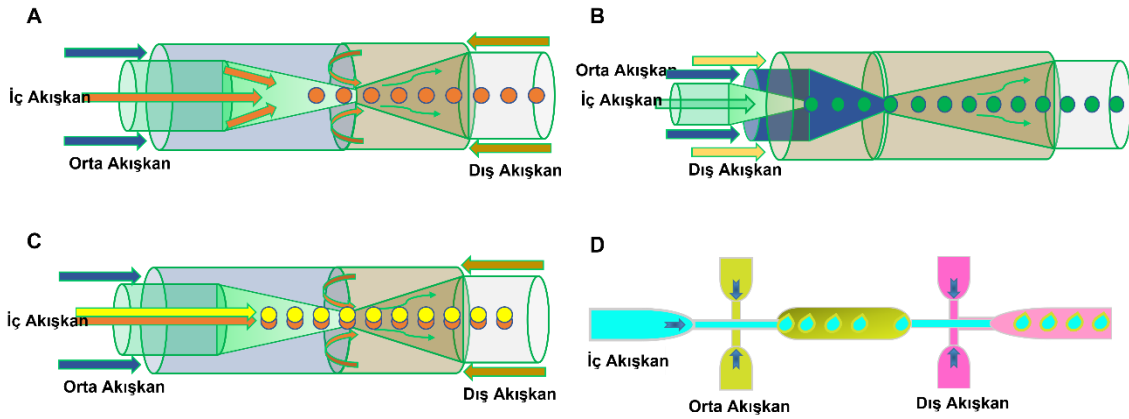
Akış odaklı mikroakışkan cihazlarda, birbirine karışmayan iki sıvı, damlacıkların oluştuğu iç kılcalın ağzında buluşarak sistemin zıt taraflarından akmaktadır. Bu geometride hem damlatma hem de püskürtme rejimleri kullanılabilir. Ortak akış geometrisinde, dağınık ve sürekli fazların akışkanları paralel akımlarda akar. Ortak akış geometrisi nanopartikül üretimi için en fazla kullanılan yöntemdir [24]. T-bağlantılı mikroakışkan sistem ise basitliğinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tür sistemlerde, iki farklı kanal, sürekli fazı taşıyan ana kanal ve dağınık fazı taşıyan besleyen ortogonal kanal ile dik bir açıda buluşmaktadır ve diğer kanaldan oluşan parçacıklar toplanmaktadır.



Şekil 2.3. Tek emülsiyon sistem geometrileri A) Akış odaklama, B) Ortak akış, C) T-Bağlantı.

2.2.3.2. Çift Emülsiyon

Çift emülsiyon sistemler genellikle farklı akış geometrilerinin birleştirilmesiyle oluşturulmaktadır. Genel olarak, bir çift emülsiyonlu mikroakışkan sistem, kare bir kapiler borunun içerisine zıt yönlerde yerleştirilmiş ve delikler birbirine bakacak şekilde iki farklı yuvarlak kapiler boru içermektedir. Burada iç faz, iç kapiler boru boyunca akarken, orta ve dış fazlar, dış kılcal boyunca iç fazın aynı ve zıt yönlerinde akmaktadır. Çift emülsiyonlarda hem suda yağda su (W/O/W) hem de yağda suda yağ (O/W/O) üretilebilir ve bu amaçla kullanılan en popüler geometriler ortak akış ve akış odaklama birleşimi (Şekil 2.4 A), iki ortak akış geometrisinin bir kombinasyonu (Şekil 2.4 B), iki iç akışa sahip bir çift emülsiyon (Şekil 2.4 C) ve T-bağlantısında ortak akışı birleştiren ortak akış (Şekil 2.4 D) içermektedir.

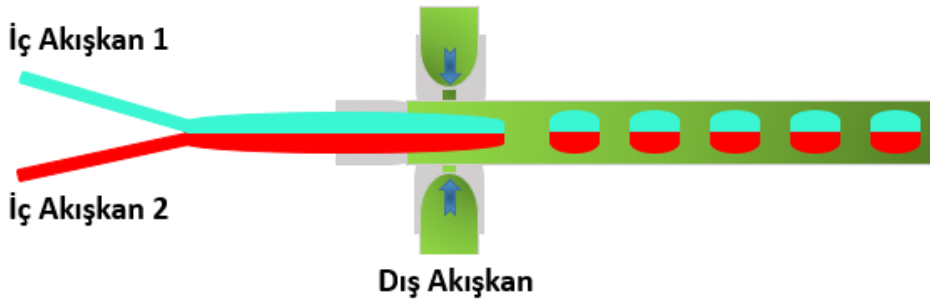


Şekil 2.4. Çift emülsiyon sistem geometrileri: A) Ortak akış ile akış odaklama kombini, B) Ortak akış ile ortak akış kombini, C) İki iç akışlı çift emülsiyon, D) T-bağlantısında ortak akışı birleştiren ortak akış.

2.2.3.3. Janus Parçacıkları

Son yıllarda mikroakışkan sistem geometrisi Janus parçacıkları üretiminde kullanılmıştır. Bu tür bir konformasyonda, silindirik bir cam tüp, kare veya dikdörtgen bir dış kapiler içine yerleştirilir ve hizalanır, burada akışlar paralel olarak izler ve iki sıvının eş eksenli akışıyla sonuçlanır (Şekil 2.5). Bu parçacıklar, yüzeylerde iki veya daha fazla farklı malzemeyi birleştiren özel parçacık türleridir. Janus parçacıklarının bu eşsiz yüzeyi, aynı parçacık üzerinde iki farklı kimyasal yapının oluşmasına izin verir. Bu parçacıkların hazırlanması, Y şeklindeki kanaldan birlikte akan iki ayrı akışa dayanmaktadır. Diğer

yöntemlerde çift katmanlı kabuklu partiküller üretilirken, bu parçacıklar aynı partikülün içerisinde birbirine karışmayan malzemelerden üretilmektedir.



Şekil 2.5. Janus parçacığı üretiminde kullanılan geometri.

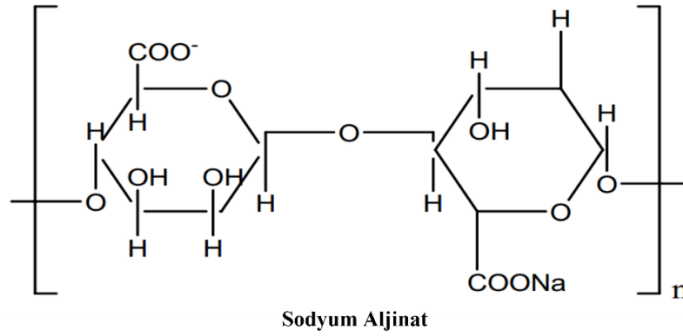
2.3. Aljinat ve Biyomedikal Uygulamaları

Sodyum aljinat, tipik olarak kahverengi deniz yosunun hücre duvarlarında yaygın olarak bulunan, doğal olarak oluşan anyonik bir biyopolimerdir. Ayrıca, bakteriyel biyosentez ile de üretilmektedir. Bakteriyel biyosentez, aljinata deniz yosunundan türetilen aljinattan elde edilenden daha farklı kimyasal yapılar ve fiziksel özellikler sağlayabilir. Bakteriyel aljinat, *Azotobacter* ve *Pseudomonas*'tan üretilir. Ticari olarak temin edilebilen sodyum aljinatların moleküler ağırlıkları 32.000 ile 400.000 g/mol arasında değişmektedir [27]. Tipik olarak sodyum aljinatın kimyasal yapısı Şekil 2.6'da görülmektedir. Biyoyumluluğu, mukoadheziv özelliği, düşük maliyeti, düşük toksisitesi ve Ca^{+2} gibi iki değerlikli katyonlar ile hafif jelleşmesi ile biyomühendislik uygulamalarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Aljinat hidrojeller, farklı çapraz bağlayıcılar ve farklı yöntemler ile çapraz bağlanarak hazırlanabilir ve canlı dokuların hücre dışı matrikslerine (ECM) yapısal benzerlikleri sayesinde yara örtülerinde, küçük kimyasal ilaçlar ve proteinler gibi biyoaktif maddelerin verilmesinde ve dahası, hücre transplantasyonunda geniş uygulamalara izin verir. Sodyum aljinatın jelleşme hızı Ca^{+2} gibi katyonlar ile iyonik olarak bağlandığında homojenliği ve yapının gücünü kontrol edebilmek için kritik bir faktördür ve daha yavaş bir jelleşme gerçekleştiğinde daha stabil yapılar ve daha yüksek mekanik bütünlük üretmektedir [28]. Ayrıca jelleşme sıcaklığı da önemli bir faktör olarak tanımlanmıştır ve jelleşme hızını ve elde edilen jellerin mekanik özelliklerini de etkilemektedir. Daha düşük sıcaklıklarda iyonik çapraz bağlayıcıların reaktivitesi azaldığından dolayı çapraz bağlama daha yavaş gerçekleşmektedir [29].

İyonik olarak çapraz bağlanan aljinat jellerin önemli bir dezavantajı ise, fizyolojik olarak sınırlı uzun vadeli kararlılığıdır. Çünkü bu jeller, monovalent katyonlarla değişim reaksiyonları nedeniyle iki değerleri iyonların çevreleyen ortama salınmasından dolayı çözülebilir. Ayrıca, jelden salınan kalsiyum iyonları ise hemostazı sağlayabilirken, jel kısmı trombosit ve eritrositlerin agregasyonu için bir matris görevi görmektedir [30]. Diğer yandan kovalent çapraz bağlama, doku mühendisliği de dahil olmak üzere birçok uygulama için jellerin fiziksel özelliklerini iyileştirme çabasıyla geniş çapta araştırılmıştır. İyonik çapraz bağlanan bir aljinat jeli uygulanan gerilim kuvvetiyle, çapraz bağlar ayrışıp yeniden şekillendiğinde gevşer ve jelden su kaybı yaşanır, dolayısıyla da bu plastik deformasyona yol açmaktadır. Su kaybı aynı zamanda kovalent çapraz bağlanan jellerde de meydana gelir ve gerilim kuvvetiyle birlikte gevşeme olurken, bağların ayrışmaması ve yeniden oluşturulamaması önemli elastik deformasyona yol açmaktadır [31]. Aljinatın bozunma davranışı incelendiğinde, memelilerde polimerik zincirleri parçalayabilen enzim (aljinaz) bulunmadığından dolayı memelilerde doğal olarak bozunmazlar. Ancak iyonik olarak çapraz bağlı aljinat jeller, jeli çevreleyen ortama çapraz bağlayan iki değerlikli iyonların salınmasıyla çözülebilir. Aljinatı fizyolojik koşullarda bozunabilir hale getirmek için aljinat zincirlerinin kısmi oksidasyonu gerekmektedir. Hafifçe oksitlenmiş aljinat, sulu ortamda bozunabilir ve bu malzemeler, çeşitli uygulamalar için ilaçların ve hücrelerin bir dağıtım aracı olarak potansiyel göstermiştir. Aljinat tipik olarak sodyum periyodat ile oksitlenir.

Diğer yandan aljinatın biyomedikal uygulamalarına bakıldığında, akut ve kronik yaraların tedavisi gibi birçok alanda acil bir ihtiyaç olduğu söylenmiş ve aljinat bazlı yara örtüleri birçok avantajlı özellik sunmaktadır. Geleneksel yara örtüleri (örneğin gazlı bez) esas olarak bir bariyer işlevi sağlar, patojenin yaraya girmesini önlerken yara eksüdalarının buharlaşmasına izin vererek yarayı kuru tutar [32]. Buna karşılık aljinat gibi malzemeler içeren modern yara örtüleri ise nemli bir yara ortamı oluşturur ve yara iyileştirmesini kolaylaştırmaktadır [33]. Ayrıca aljinat ile üretilen yara örtüleri fizyolojik olarak nemli ortamı korumakla birlikte yara bölgesinde bakteriyel enfeksiyonu en aza indirmektedir. Ticari olarak bazı aljinat yara örtüleri de mevcuttur. Bunlardan bazıları arasında AlgiSite MTM (Smith & Nephew), KaltostatTM (ConvaTec), SorbsanTM (UDL Laboratories), Comfeel PlusTM (Coloplast), TegagenTM (3M Healthcare) ve AlgicellTM (Derma Sciences) gösterilebilir [27].

Ek olarak, küçük ya da makro boyutlu proteinlere kadar ilaç molekülleri, çapraz bağlama türü ve yöntemine bağlı olarak kontrollü bir şekilde “aljinat jeller” ile salım yapabilirler. Ek olarak, aljinat jeller oral yoldan alınabilmeleri ya da vücut içerisine minimal invaziv olarak enjekte edilebilmeleri sayesinde farmasötik alanda kapsamlı bir şekilde kullanılmalarına izin vermektedir.



Şekil 2.6. Sodyum aljinatın kimyasal yapısı [34].

Farklı boyut, şekil ve kompozisyonlara sahip aljinat bazlı nanomateryaller sentezlenmiştir [35]. Aljinat nanomateryallerinin üretiminde Ca⁺² iyonları ile jelleştirme, pozitif yüklü polimerlerle iyonotropik jelleşme, elektrospınleme, termal olarak indüklenen faz ayrımı ve mikroakışkan sistemler kullanılmaktadır [36]. Özellikle son zamanlarda aljinat bazlı mikrobaloncuk ve nanopartikül üretimlerinde farklı geometrilere mikroakışkan sistemler araştırılmakta ve hali hazırda mikroakışkan sistemler ile biyomedikal uygulamalarda daha kontrollü ve ayarlanabilir boyutta mikrobaloncuklar üretilmektedir. Sunulan tez çalışmasında deniz yosunundan elde edilen doğal bir biyopolimer olan aljinat, herhangi bir organik çözücü içermeden elde edilebilen hızlı iyonik indüklü jel oluşum süreci ve yüksek biyoyoumluluk özelliklerinden dolayı tercih edilmiştir.

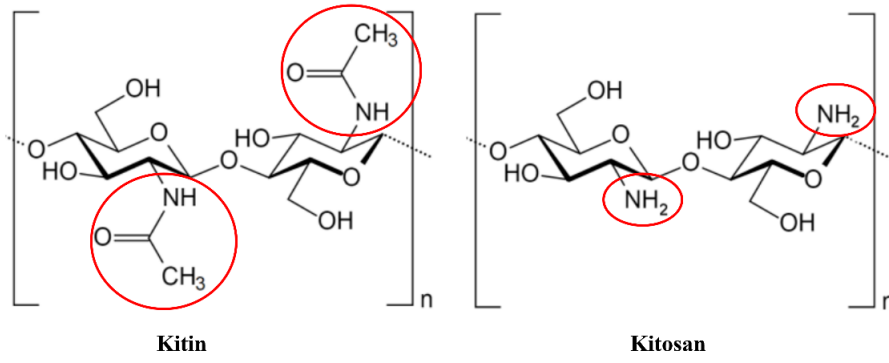
2.4. Antibakteriyel Polimerler

Patojenik bakteriler gün geçtikçe insan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır. Yaklaşık 100 yıldır antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonların etkili tedavisi sayesinde sıklıkla kullanılmaktadır [37]. Bununla beraber geleneksel antibiyotiklere dirençli patojenik bakterilerin evrimi, üretilen antibiyotiklerin sürekli değişmesine ve modifiye edilerek yeni nesil antibiyotiklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Diğer yandan antibakteriyel polimerlerin kullanımı, antibakteriyel ajanların etkinliğini arttırdığı

bilinmektedir. Antibakteriyel polimerik materyaller patojenik bakterilerin büyümesini engelleyerek ya da hücre zarını yok ederek geleneksel antibakteriyel ajanlarla yarışabilir antibakteriyel aktivite göstermektedir ve patojenlerle savaşmak için umut verici bir antimikrobiyal strateji sunarak gerek akademide gerekse endüstriyel çalışmalarda büyük ilgi görmektedir [38].

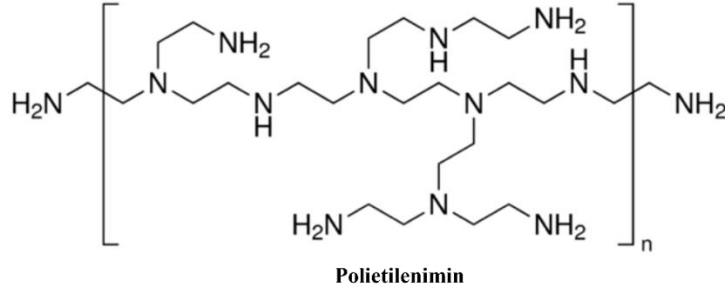
Antibakteriyel özelliğe sahip doğal ve sentetik polimerler hidrojel, film ve sünger yapıda birçok biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Tarihsel olarak biyomedikal uygulamalarına bakıldığında kitosan, polietilenimin gibi katyonik polimerler antibakteriyel uygulamalarda sıklıkla kullanılan polimerlerdir. Bununla beraber, yüksek verimli, biyomimetik ve ayarlanabilir özelliklerde olan akıllı sistemler fazlasıyla ilgi görmektedir. Hatta birden fazla polimerin kombinasyonu ile üretilen malzemeler daha fazla arzu edilen özelliklere sahip olmaktadır [39]. Bu sayede farklı polimerlerin kombinasyonu kullanılarak polimerik malzemelerin özellikleri geliştirilmektedir. Örneğin, sentetik polimerik malzemeler ile doğal polimerlerin kombinasyonu sayesinde yüksek mekanik özelliklere sahip ve aynı zamanda biyouyumluluğu, biyobozunabilirliği ve hidrofilitesi yüksek malzemeler elde edilebilmektedir.

Antibakteriyel polimerler arasında en yaygın kullanılanı kitosandır. Kitosan bilinen biyouyumluluk ve biyobozunurluk özelliği sayesinde farmasötik alanda sıklıkla kullanılan işlevsel doğal biyopolimerlerdendir. Kitosan, kitinin *N*-asetil formundan oluşur, kitindeki asetil grubunun yerini amin grubu almaktadır. Yani *N*-glikozamin β (1-4) bağlanması sonucunda oluşmaktadır. Asetilasyon işlemi %50 ve üzeri NaOH ile muamelesi sonrasında elde edilmektedir. Kitin ve kitosan kopolimer yapıdadırlar ve saf olarak bulunmazlar. Eğer *N*-asetil-glikozamin birimleri %50 üzerinde ise kitin *N*-glikozamin birimleri %50'nin üzerindeyse kitosan olarak adlandırılmaktadır. Kitosanda temel olarak birincil aminlerin varlığı sayesinde biyouyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilir özelliklere sahiptir. Bu polisakkarit bu özelliklerinin sayesinde biyomalzemeler alanında özellikle doku mühendisliği için uygun bir malzemedir. Kitosanın, 3 boyutlu yapı iskelelerinde hidrojel ve sünger olarak, 2 boyutlu yapı iskelelerinde film ve lif olarak kullanımı özellikle yara iyileşme uygulamalarına odaklanarak tartışılmaktadır [40]. Diğer yandan son 20 yılda yapılan araştırmalarda ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmaktadır [41]. Şekil 2.7'de kitin ve kitosanın kimyasal yapıları ve farklılıkları görülmektedir.



Şekil 2.7. Kitin ve Kitosanın kimyasal yapısı [42].

Diğer taraftan polietileniminler (PEI), birincil, ikincil ve üçüncül amino gruplarını içeren polikationik polimerlerdir. Fonksiyonel kompozitlerin özelleştirilmesini kolaylaştırmakla birlikte tekrarlanan yapısal birimlere, geniş moleküler ağırlık dağılımına sahip ve esnek polimerik zincirlere sahip oldukları için değerli bir polikationik sınıf oluşturmaktadırlar [43]. PEI'nin kimyasal yapısı Şekil 2.8'de görülmektedir. Çözünür proteinlerin saflaştırılmasını kolaylaştırmak için hücrel homojenatlardan lipitler ve nükleik asitler gibi hücrel atıkları topaklaştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadırlar [44]. Ayrıca, spesifik olarak üretilebilme, farklı geometri, uzun raf ömrü ve biyoyumluluk gibi avantajlı özelliklere sahiplerdir. Bu nedenle, PEI biyotıp, biyoteknoloji ve biyomateryal alanlarında gen ve ilaç taşıyıcı, biyo-inhibitörler, biyo-ayırma, biyo-görüntüleme, hücre kültürü gibi birçok araştırmada tercih edilmektedir. Diğer yandan, biyoproseslerdeki enzimatik reaksiyonlar, PEI'nin biyokatalizörler için bir immobilize edici ajan olarak, çözünür bir enzim taşıyıcısı olarak kullanıldığı başka bir alan oluşturmaktadır. Patentli verilen incelendiği bir ankette, PEI'nin yıkama maddelerinden paketlenme malzemelerine kadar çok farklı sistemlerde ortak olarak kullanıldığını ve mikrobisidal bileşimlerde de ayrıca kullanıldığını göstermektedir. Fakat, mikrobisidal aktivite ve bakteriler ile olan etkileşimleriyle ilgili az sayıda veri bulunmaktadır. Ancak yüksek kationik yükler sayesinde yüksek transfeksiyon aktivitesi ve yüksek yükleme kapasitesine sahiptir [43].



Şekil 2.8. Polietileniminin kimyasal yapısı.

2.5. Gümüş Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri

2.5.1. Gümüş Nanopartiküller

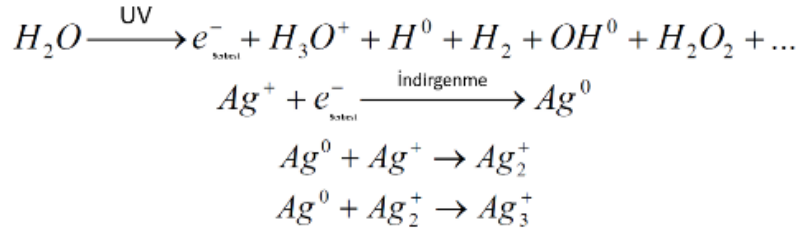
Gümüş nanopartiküller doğal sitotoksiteleri sayesinde, antikanser ve antibakteriyel ajanlar olarak ve biyosensör malzemelere, kompozit fiberlere ve kozmetik ürünlere dahil edilebilen sağlık alanında ve biyomühendislik uygulamalarında geniş çapta kullanılan metalik biyomalzemelerdir. Diğer yandan gümüş nanopartiküller, filmler, yapı iskeleleri, hidrojeller ve yara iyileşme örtüleri gibi biyomalzemelerde antibakteriyel özelliği nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır [45, 46]. Literatürde gümüş nanopartiküllerin kullanımı ve uygulama alanları ile ilgili çok miktarda yayın bulunmaktadır. Örneğin, Shankar ve ark. tarafından çözücü döküm yöntemi kullanarak aljinat/gümüş nanopartikül kompozit filmler üretilmiştir. Çalışmada, 50-200 nanometre arasındaki gümüş partiküllerin aljinat polimerine eklenmesi, üretilen filmin termal kararlılığını artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca, bu filmlerin, *E. coli* ve *L.monocytogenes* bakterilerine karşı antibakteriyel etki gösterdiği görülmüştür. Diğer yandan bunların antimikrobiyal aktivite derecesinin, kullanılan gümüş nanopartikül çeşidine ve test mikroorganizmalarına önemli ölçüde bağlı olduğu gözlenmiştir [47]. Shilpa ve ark., boyutları ortalama 10-20 nanometre arasında gümüş nanopartikül içeren sodyum aljinat ve kitosan kompozit film üretmişlerdir. Üretilen bu filmlerin, sadece aljinat kullanılarak üretilen filmlere göre daha istikrarlı olduğu ve gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel özellik gösterdiği gözlenmiştir. Gümüş nanopartikül içermeyen aljinat ve kitosan filmlerin ise antibakteriyel özellik göstermediği bildirilmiştir [48]. Ying ve ark. aljinat/gümüş nanopartiküllerin üretmiş ve 50 nanometreden daha küçük boyutlarda üretilen partiküllerin gram pozitif bakteri suşlarına [*Staphylococcus aureus* (KCTC1928)] ve gram negatif bakteri suşlarına [*Escherichia coli* O157: H7 (ATCC25922)] karşı güçlü

antibakteriyel özellik gösterdiğini gözlemlemişlerdir [49]. Bir diğer çalışmada, Spadaro ve ark. tarafından poli (metakrilik asit) (PMA) sulu çözeltisinde gümüş nanopartikülleri UV'ye maruz bırakılarak üretilmiştir. Üretilen koloidal çözelti 5 saat boyunca ışıladıktan sonra 20 nanometreden küçük çaplara sahip gümüş nanopartiküllerin oluştuğu gözlenmiştir [50]. Zeljka ve ark. elektrokimyasal ve elektrostatik ekstrüzyona dayalı bir yöntem kullanarak gümüş nanopartikül (10-30 nm) içeren aljinat hidrojel mikrobaloncuklar üretmişler ve bu hidrojel mikrobaloncukların *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel etki gösterdiği yapılan testlerde gözlenmiştir [51].

2.5.2. Gümüş Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri

Gümüş nanopartikülleri sentezlemek ve stabilize etmek için çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Literatürde, kullanılan farklı yöntemler ve üretilen partikül çeşit ve boyutları bulunmaktadır (Tablo 3). Çeşitli organik ve inorganik indirgeme maddeleri kullanarak kimyasal indirgeme, elektrokimyasal teknikler, fizikokimyasal indirgeme ve radyoliz dahil en popüler kimyasal yaklaşımlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunların yanısıra, çevre dostu olan biyolojik sentez yaklaşımları ile de gümüş nanopartikülleri üretilmektedir. Biyolojik sentez yaklaşımları, çevresel toksisite ile ilgili kimyasal ajanları içeren geleneksel yöntemlere göre avantajları olan karışık değerlikli polioksometalatlar, polisakkaritler, biyolojik ve ışınlama yöntemini içermektedir [46]. Gümüş nanopartiküllerin, düşük derişimlerde antibakteriyel özelliklerinin partikül yüzey alanına bağlı olduğu ve partikülün daha küçük olması yüzey alanını artırmakla birlikte daha yüksek antibakteriyel özelliğe sahip olduğu ve antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir [52]. Bazı çalışmalarda, gümüş iyonlarının -SH protein grupları ile tepkime gerçekleştirdiği ve bu şekilde bakteriyel inaktivasyonda ciddi rol aldığı görülmüştür [53]. Sonuçta, gümüş nanopartiküller hızla popülerlik kazanmakta ve çeşitli araştırma grupları, bu metal nanopartiküllerin beklenmedik optik özelliklerine dayalı olarak optik sensörlerin ve görüntüleme etiketlerinin geliştirilmesi için alternatif stratejiler keşfetmeye başlamıştır. Geleneksel olarak, nanomateryaller, sol jel işlemi, misel, kimyasal çökeltme, hidrotermal yöntem, piroliz ve kimyasal buhar biriktirmeyi içeren kimyasal veya fiziksel yöntemler kullanılarak sentezlenmektedir. Bu yöntemler sistemsel olarak basittir ve reaksiyon ortamı eski haline getirilerek kristalit boyutu üzerinde kontrol sağlanmaktadır. Fakat ürünlerin kararlılığında ve bu yöntemler kullanılarak tek dağılımlı nano boyuta ulaşılmasında sorunlar vardır [46, 54]. Ek olarak indirgeme yöntemi kullanılarak da gümüş nanopartikülleri oluşturulmaktadır. Bu

yöntemde, geçiş metallerinin metalik iyonlarını azaltmak için etkili bir yol olarak sulu çözeltilerinin radyolizi gerçekleştirir. Bu yöntem ile UV ışınlama altında solvatlı elektronlar üretilebilir ve üretilen bu elektronlar, metalik katyonları metalik atomlara indirgemekte ve aşağıdaki reaksiyonlarda (Şekil 2.9) görüldüğü gibi aglomeratlar oluşturmak için birleşmektedir [55].



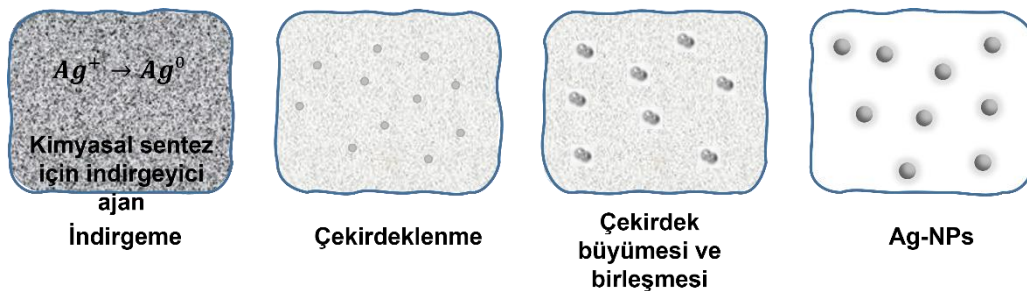
Şekil 2.9. Gümüş nanopartikül üretim tepkimeleri.

Tablo 3. Öncü molekülleri AgNO₃ olan AgNP üretim yöntemleri ve özellikleri [56].

Metodlar	İndirgeyici ajan veya çözücü	Sabitleyici veya yüzey aktif madde	Parçacık morfolojisi ve boyutu	Etkileyen faktörler veya özellikler	Ref.
Kimyasal Sentez	Trisodyum Sitrat	Trisodyum Sitrat	Nanosferler 30-60 nm	Gümüş iyonu derişimi	38
	Etilen Glikol	Poli (vinil piroolidon) (PVP)	Nanoküpler ~ 50–115 nm	Sıcaklık, AgNO ₃ ve PVP derişimi	14
	NaBH ₄	Dodekanoik asit (DDA)	Nanosferler ~ 7 nm	Yüksek konsantre gümüş	39
	Etilen Glikol	Poli (vinil piroolidon) (PVP)	Nanosferler 17 ± 2 nm	Isıtma hızı, reaksiyon sıcaklığı ve enjeksiyon hızı	15
Fotokimyasal Sentez	TX-100, UV	TX-100	Nanosferler 30 nm	TX-100 ve Ag iyonu derişimi	27
	Karboksimetillenmiş kitosan (CMCTS), UV	CMCTS	Nanoküpler 2–8 nm	pH, CMCTS derişimi	28
	Sodyum sitrat, ışık kaynakları	Sodyum sitrat	Ag kolloidler	Işınlama süresi, ışık kaynağı	26
Fiziksel Sentez	Termal bozunma	Sodyum oleat	Nano gümüş tozu 9,5 ± 0,7 nm	Ayrışma sıcaklığı	20
	Elektrik ark deşarjı	Sodyum sitrat	Nanosferler 14–27 nm	Ark akımı, yay süresi	41
Biyolojik sentez	<i>Bacillus sp</i>	<i>Bacillus sp</i>	Nanosferler 5–15 nm	Aerobik koşullar	32
	<i>Lactobcillus</i>	<i>Lactobcillus</i>	Nanosferler 6–15,7 nm	pH, lactobacillus türleri	33
	<i>Cassia angustifolia</i> <i>D. carota</i>	<i>Cassia angustifolia</i> <i>D. carota</i>	Nanosferler, çubuk 9–31 nm Nanosferler, 20 nm	pH, sıcaklık, Ag iyon derişimi İndirgeyici ajan, emici türler	36 37

2.5.2.1. Kimyasal ve Fotokimyasal Yöntem

Kimyasal yöntemler (Şekil 2.10), mevcut yöntemler arasında çözelti içerisinde partikül hazırlamaya elverişli olduğu için gümüş nanopartikül hazırlamada sıklıkla tercih edilen yöntemlerdir [57]. Bu yöntemlerde organik ve inorganik indirgeme ajanları kullanılarak kimyasal indirgeme tepkimeleri gerçekleşir. Genel olarak, sulu ya da susuz çözeltilerde gümüş iyonlarının (Ag^+) indirgenmesi için sodyum sitrat, askorbat, sodyum borohidrit ($NaBH_4$), elementel hidrojen, poliol işlemi, Tollens reaktifi, N, N-dimetilformamid (DMF) ve poli (etilen glikol) -blok kopolimerler gibi farklı indirgeme ajanları kullanılmaktadır. Bu ajanlar tarafından, gümüş iyonlarının azalması ve metalik gümüş (Ag^0) oluşumu sağlanır ve bunu oligomerik kümeler halinde aglomerasyon izler ve sonuç olarak metalik koloidal gümüş parçacıkları oluşur. Gümüş nanopartikül üretimi sırasında partiküllerin stabilize edilebilmesi için koruyucu ajanlar kullanılması ve nanopartikül yüzeylerinde absorbe edilebilen ya da bağlanabilen Nanopartiküllerin, aglomerasyonlarından kaçınarak korunması bu süreçte önemlidir [46]. Nanopartiküllerin yüzeyleri ile etkileşimleri için işlevsellikleri (tiyoller, asitler alkoller ve aminler) içeren yüzey aktif maddelerin varlığı parçacık büyümesini stabilize edebilir ve parçacıkları topaklaşmadan ya da yüzey özelliklerini kaybetmeden koruyabilir. Valizadeh ve ark. tarafından poli (vinil alkol), poli (vinilpirolidon), poli (etilen glikol), poli (metakrilik asit) ve polimetilmetakrilat gibi polimerik bileşiklerin nanopartikülleri stabilize etmek için etkili koruyucu maddeler olduğu bildirilmiştir [58]. Yapılan bir çalışmada, güçlü bir indirgeyici (borohidrit) kullanılarak küçük monodispers kolloidlerin sentezi gösterilmiştir fakat burada büyük boyutlu gümüş nanopartikül oluşumunun kontrol edilmesi zor olduğu görülmüştür. Diğer yandan sitrat gibi daha zayıf bir indirgeyici ajan kullanmanın oluşacak nanopartiküllerinin şekil ve boyut dağılımının kontrolünün daha kolay olduğu görülmüştür [45, 59].



Şekil 2.10. Kimyasal sentez yöntemi.

Diğer bir çalışmada agregasyonu önlemek amacıyla polivinilpirolidon (PVP) polimeri ile birlikte $AgNO_3$ etilen glikol ile indirgenerek poliol yöntemi ile monodispers gümüş nanopartikülleri üretilmiştir [60]. Yapılan bu çalışmada, etilen glikolün çözücü ve aynı zamanda indirgeme ajanı olarak kullanıldığı ve oluşan nanopartiküllerin boyutu ve şekli $AgNO_3$ ve PVP derişimine bağılı olarak değıştığı gözlenmiştir. Kimyasal yöntemlerde nanopartikül sentezi, gümüş öncüsü, indirgeme ajanları ve stabilize edici ajanlara dayanmaktadır [61]. Bundan dolayı, deneysel parametreler kontrol edilerek gümüş nanopartiküllerin boyut ve şekilleri özelleştirilebilmektedir. Yapılan bir diğer çalışmada, Mukherji ve ark. tarafından gümüş nanopartikül öncüleri olarak $AgNO_3$ ve indirgeme ve stabilize edici ajan olarak sodyum borohidrür ve trisodyum sitrat kullanılmıştır. Elde edilen partiküllerin boyutu deneysel parametreler optimize edilerek kontrol edilmiş ve 5-100 nanometre arasında parçacıklar elde edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada sentezlenen parçacıkların boyut ve doza bağılı özelliklerinin etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlardan, küçük boyutlu parçacıkların diğerlerine göre daha yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğu gözlenmiştir [61, 62].

2.5.2.2. Fiziksel Yöntem

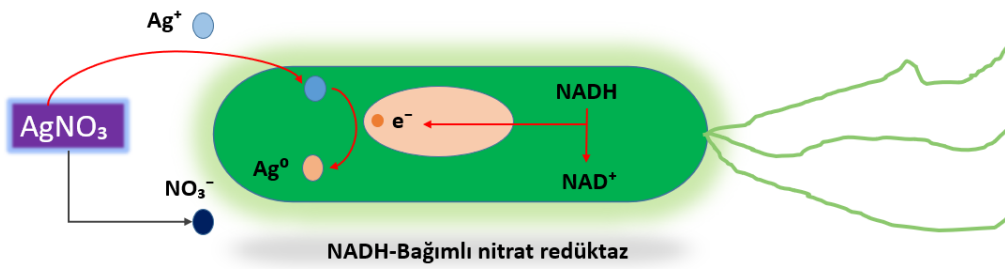
AgNP sentezi için kullanılmakta olan kimyasal yöntemlerin yanı sıra çeşitli fiziksel yöntemler de geliştirilmiştir. Bu metotlar genellikle buharlaşma yoğunlaşma işlemleri ve lazer ablasyon tekniğini içermektedir. Her iki yaklaşımda da toksik madde salgılayan ve insan sağlığı için ve çevresel olarak tehlikeli kimyasallar kullanılmadan yüksek saflıkta fazla miktarda gümüş nanopartikül sentezlenebilmektedir. Fakat bu yöntemlerin de kimyasal yönteme benzer bir şekilde avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Bilinen en yaygın dezavantajlarından bazıları daha fazla enerji harcanması, nispeten daha uzun sentez süresi ve karmaşık ekipman gerektirmesidir. Bütün bunlardan dolayı ise işletme maliyetlerini artırmaktadır. Ayrıca bunlara ek olarak, aglomerasyon genellikle büyük bir zorluktur çünkü bu yöntemlerde kapama ajanı kullanılmamaktadır. Kapama ajanı, nanopartikülleri kaplamak için sisteme eklenen yüzey aktif bir cisim ya da polimer malzemedir. Sentezlenen nanoparçacıklar yüksek yüzey enerjisi içerdiği için kümeleşme söz konusu olabilir. Bu aglomerasyonun önlenmesi için sentez sırasında bu malzemenin kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun gibi dezavantajlar araştırmacıları geleneksel yoğunlaştırma ve buharlaştırma yöntemlerinden ziyade alternatif fiziksel yöntemler geliştirmeye yöneltmiştir [45, 61]. Örnek olarak, AgNP'lerin katı formda sentezlenebilmesi için termal ayrışma yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde Ag ile oleat

arasında yüksek sıcaklıktra kompleksleşme reaksiyonu sonucundan 10 nm'den daha küçük partikül boyutuna sahip gümüş nanopartikülleri üretilmiştir [63]. Tien ve ark. tarafından gümüş nanopartiküllerin distile suda sentezi için yüzey aktif madde kullanmadan ark deşarj biriktirme tekniği kullanılarak 10 nm'den küçük nanoparçacıkların üretildiği gösterilmiştir [64]. Diğer bir çalışmada Kuo ve ark. deneysel parametrelerin optimize edilmesiyle birlikte AgNP sentezlemek için elektrik deşarjlı işleme sistemi kullanmışlardır [65]. Bu tür geliştirilmiş fiziksel tekniklerin benimsenmesiyle birlikte AgNP üretiminde geleneksel fiziksel yöntemlerdeki zaman probleminin ortadan kalkacağı ve saf partiküllerin tek bir işlemde toplu miktarda üretilbileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte bu yöntemin sıklıkla kullanılmamasının sebebi yüksek maliyeti olduğu düşünülmektedir [56].

2.5.2.3. Biyolojik Sentez

Son çalışmalarda, bitki özleri ya da mikroorganizmalar gibi biyolojik varlıkların kullanıldığı biyolojik (yeşil kimya) metalik nanopartikül sentez yöntemi, Şekil 2.11'de de gösterildiği gibi diğer üretim yöntemlerine değerli bir alternatif olarak önerilmiştir [45]. Biyolojik yöntemlerde AgNP'ler, indirgeyici ve stabilize edici ajanlar olarak bitkiler (yosun, maya, mantar ve bakteri gibi) kullanılarak sentezlenir [61]. Mantarlar ve bakteriler gibi mikroorganizmaların, metalik iyonları azaltarak toksik malzemelerin iyileştirilmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir [66, 67]. Az sayıda bakteride AgNP'lerin hücre içinde sentezlenebileceği gözlenmiş ve hücre içi bileşenlerin hem indirgeyici hem de stabilize edici ajan olarak işlev gördüğü görülmüştür [68]. Partiküllerin yeşil sentez ile üretimi daha karmaşık kimyasal sentezlerin yerini almak için ümit verici bir yöntemdir. Çünkü bu yöntem ile toksik kimyasallar ve tehlikeli yan ürünler bulunmamakta bunların yerine partiküllerin stabilizasyonu için doğal kapama ajanları içermektedir. Bir çalışmada *Vertisilyum* bakterisinde yeşil sentez yolu ile AgNP üretimi araştırılmıştır [69, 70]. Bu çalışmada ana hipotez, gümüş Nanopartiküllerin sulu bir çözeltide değil bakterinin hücre duvarının yüzeyinin altında oluşmasıydı. Bakteriler genel olarak nitratı ana nitrojen kaynağı olarak kullanırlar, burada nitrat, indirgenmiş bir nikotinamid adenin dinükleotid formunun (NADH) indirgeme gücünden yararlanılarak nitrat redüktaz tarafından nitrite dönüştürülür. Diğer bir bakteri türü olan *Bacillus licheniformis* bakterisinde, NADH'den salınan elektronların Ag^+ iyonlarının Ag^0 'a indirgenmesinin sağlandığı ve gümüş nanopartikül üretildiği gözlenmiştir. Li ve ark. benzer bir NADH aracılı mekanizmaya dayalı olarak *Aspergillus terreus* mantarından

salgılanan redüktaz enzimleriyle AgNP sentezlendiğini göstermiştir [71]. Sentezlenen parçacıklar 1-20 nm arasında olup çeşitli patojenik bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Başka bir örnekte, bir gümüş madeninden izole edilen *Pseudomonas stutzeri*, sulu AgNO_3 'te AgNP sentezi için kullanılmıştır. Sentezlenen AgNP'lerin, bakterinin periplazmik alanı içinde iyi tanımlanmış bir boyut ve farklı bir morfoloji sergilemiştir [72].



Şekil 2.11. Biyolojik sentez mekanizması.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Kimyasallar

Kimyasal	Marka
Sodyum Aljinat (Alg)	Sigma Aldrich (Almanya)
Poliyetenimin, dallanmış (PEI) Moleküler Ağırlığı 2000	Sigma Aldrich (Almanya)
L-Askorbik Asit, %99	Sigma Aldrich (Almanya)
Trisodyum Sitrat	Sigma Aldrich (Almanya)
Kalsiyum Klorür \geq %93	Sigma Aldrich (Almanya)
Gümüş Nitrat	Sigma Aldrich (Almanya)
Poli (vinil alkol) Molekül Ağırlığı 89,000-98,000 hidrolize (%99)	Sigma Aldrich (Almanya)
FBS	Biochrom (ABD)
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma Aldrich (Almanya)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Cegrogen (Almanya)
Fibroblast hücre hattı - L929 (Fare)	ATCC (ABD)
L-glutamin	Cegrogen (Almanya)
Penisilin-streptomisin	Cegrogen (Almanya)
Kültür Kabı	Greiner (Almanya)
Fosfatlı Tuz Tamponu (PBS)	Gibco (ABD)
MTT	Sigma Aldrich (Almanya)
Steril fosfat tamponu	Biochrom (Almanya)
Canlı/Ölü Canlılık/Sitotoksisite Kiti	Invitrogen (ABD)
Mueller-Hinton agar	Merck (Almanya)

3.2.Yöntem

3.2.1. Polimer Çözeltisinin Hazırlanması, Viskozite ve Yüzey Gerilimlerinin Analizi

Mikrobaloncuk üretimi için aljinat, PVA ve PEI çözeltileri distile su içerisinde hazırlanmıştır. Mikrobaloncuk hazırlamak için %0.1 (w/v) PVA çözeltisine %0.5, 1 ve 1.5 (w/v) aljinat eklenerek farklı derişimlerde Alg/PVA çözeltileri hazırlanmıştır [73]. Daha sonra hazırlanan Alg-PVA çözeltisine farklı derişimlerde (%0,1, 1 ve 5 w/v) PEI eklenmiştir. Mikrobaloncuk üretiminde kullanılan farklı derişimlerde hazırlanan polimer çözeltileri derişim oranları ile Tablo 4'te sunulmuştur. Elde edilen formülasyonlar kullanılmadan önce 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edilerek hava kabarcıklarından arındırılmıştır. Mikrobaloncuk üretiminde kullanılmak üzere hazırlanan tüm polimer grupları ~45-50 °C'de sabit sıcaklıkta hazırlanarak mikrobaloncuk üretimi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4. Mikrobaloncuk üretiminde kullanılan polimer kompozisyonu.

Grup No	Örnek Grubu	Polimer Çözeltisi (% w/v)			
		Alg	PVA	PEI	AgNP
1	Alg-PVA	1	0.1	-	-
2	Alg-PVA-PEI0.1	1	0.1	0.1	-
3	Alg-PVA-PEI1	1	0.1	1	-
4	Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05	1	0.1	0.1	0.05
5	Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1	1	0.1	0.1	0.1
6	Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05	1	0.1	1	0.05
7	Alg-PVA/AgNP0.05	1	0.1	-	0.05

Farklı oranlarda hazırlanmış örnek gruplarının yüzey gerilim değerleri gonyometre cihazı (Attension Theta Topography) ile belirlenmiştir. Hazırlanan çözelti grupları gonyometre yardımıyla pendant damla yöntemi kullanılarak ölçülmüştür (n=3). Çözelti gruplarının viskozite değerleri ise reometre cihazı (Malvern Kinexus Pro+) kullanılarak 1-100 s⁻¹ kayma gerilimi altında ölçülmüştür (n=3).

3.2.2. Gümüş Nanopartiküllerin Hazırlanması

Gümüş nanopartikül üretimi için başlangıç materyali olarak gümüş nitrat (AgNO_3) kullanılmış olup, indirgeyici ve stabilize edici madde olarak trisodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7\text{Na}_3$) ve sürfaktan olarak ise askorbik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) kullanılmıştır [74]. Çözelti derişimi ve sıcaklığının gümüş nanopartikül üretimi üzerine etkisi açısından parametre değerlendirmeleri yapılmıştır. Elde edilen veriler ışığında, reaksiyon sıcaklığı $60\text{ }^\circ\text{C}$ olarak belirlenmiştir. 80 mL AgNO_3 , 20 mL trisodyum sitrat ve askorbik asit içeren çözeltiliye damla damla eklenerek gümüş nanopartikül üretimi gerçekleştirilmiştir. Nanopartikül üretimi sırasında karıştırma hızı 1000 rpm olarak sabit tutulmuştur [75]. 20 dakika, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 'de karıştırıldıktan sonra ısıtma işlemi durdurulup oda sıcaklığına gelene kadar karıştırma işlemine devam edilmiştir. Oda sıcaklığına gelen çözeltili formundaki gümüş nanopartiküller, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 20 dakika santrifüj yöntemi ile çöktürülmüştür. Çöktürülen gümüş nanopartiküllerin hidrodinamik çapı ve zeta potansiyel-yüzey yükü ölçümleri yapılmıştır. Diğer yandan üretilen gümüş nanopartiküllerin yüzey morfolojisi kontrolü ve boyut ölçümleri için STEM dedektörleri içeren cihaz (GAIA3 FIB-SEM) kullanılmıştır. Daha sonra stabil olarak elde edilen gümüş nanopartiküller (AgNP) liyolifizatörde kurutma işleminden sonra kuru formda ağırlıkça farklı derişimlerde (%0.05 ve 0.1 w/v) Alg/PVA//PEI polimer çözeltilisine eklenerek mikroakışkan sistem ile gözenekli antimikrobiyal üç boyutlu-gözenekli mikrobaloncuk yapıların üretiminde kullanılmıştır.

3.2.3. T-Bağlantılı Mikroakışkan Sistem ile Mikrobaloncuk Yapıların Üretimi

T bağlantılı (T-junction) mikroakışkan düzeneği polidimetilsiloksan (PDMS) blok içerisinde iki giriş noktası ve bir çıkış noktası Teflon FEP (florlanmış etilen polipropilen) kılcal boru yerleştirilerek hazırlanmıştır. Kullanılan Teflon FEP kılcal boruların iç çapı $200\text{ }\mu\text{m}$ 'dir. Giriş bağlantılarının birinden kararlı bir gaz (argon) yardımıyla basınç oluşturulmuş, eş zamanlı olarak diğer giriş bağlantısından ise polimer çözeltilisi beslenerek T-bağlantı noktasında mikrobaloncukların oluşması sağlanmıştır. Sistem düzeneğinde polimer çözeltilisi şırınga pompası yardımıyla sisteme beslenmiştir [5, 76]. Mikroakışkan sistem içerisinde kullanılan gaz basıncı, polimer çözeltili derişimi ve polimer çözeltilisinin akış hızı değiştirilerek sistem optimize edilerek stabil mikrobaloncukların üretimi sağlanmıştır [77]. Polimer akış hızı 150, 200 ve $250\text{ }\mu\text{L/dk}$ parametreleri kullanılarak optimize edilmiş ve $200\text{ }\mu\text{L/dk}$ akış hızında ve gaz basıncı 9 L/dk olarak optimize edilerek

mikrobaloncuk üretimine devam edilmiştir. Polimer çözeltisi içeriği farklı derişim parametrelerinde çalışılmış olup, sırasıyla %0.1 PVA, %1 Alg, %0.1 ve %1 PEI, %0.05 ve 0.1 AgNP kullanılmıştır. Üretilen mikrobaloncuk yapıları 0.5, 1 ve 1.5 M CaCl₂ çözeltisi içerisinde toplanarak çapraz bağlayıcı derişimi optimize edilmiştir ve 1.5 M CaCl₂ çapraz bağlayıcı derişiminde stabil olarak çapraz bağlanmanın sağlandığı belirlenmiştir. Çapraz bağlama işleminden sonra örnekler distile su ve PBS ile seri yıkama işlemine tabi tutularak fazla CaCl₂ yapıdan uzaklaştırılmıştır.

3.2.4. Mikrobaloncukların Karakterizasyonu

3.2.4.1. Mikrobaloncuk Yapıların Por Çaplarının Analizi

Elde edilen mikrobaloncuk yapılar, 1000x dijital mikroskop yardımıyla morfolojik olarak incelenerek çap büyüklükleri ve dağılımları değerlendirilmiştir (n=4). ImageJ programı kullanılarak çap büyüklükleri kıyaslanmıştır (n=100).

3.2.4.2. Mikrobaloncuk Yapıların Su Tutma Kapasitesi

Farklı derişimlerde Alg, PVA, PEI ve AgNP ile hazırlanmış polimerik çözeltiler ile üretilen mikrobaloncuklar 50 mL falkonda 10 mL distile su içerisinde 37°C su banyosunda 24 saat inkübe edilerek tartılmış (W₁) ve daha sonra liyofilize edilerek kurutulduktan sonra tekrar tartılmıştır (W₀) ve mikrobaloncukların yüzde su tutma kapasiteleri aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 3) ile hesaplanmıştır (n=4).

$$\% \text{ su tutma kapasitesi} = \frac{W_1 - W_0}{W_1} \times 100 \quad \text{Eşitlik 3}$$

3.2.4.3. Mikrobaloncuk Yapıların Hidrolitik Bozunma Profillerinin Belirlenmesi

Mikrobaloncuk yapıların hidrolitik (saf su) bozunma davranışları için eşit büyüklükte (1-2 cm çapında) hazırlanan örnekler kurutulularak tartılmıştır (W₀). Daha sonra tartılan örnekler 2mL saf su içerisinde 37°C'de su banyosunda farklı zaman aralıklarında inkübe edilerek tekrar liyofilizatörde kurutulduktan sonra kuru ağırlıkları (W₁) ölçülüp bozunma profilleri aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 4) ile belirlenmiştir (n=3).

$$\% \text{ kütle kaybı} = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100 \quad \text{Eşitlik 4}$$

3.2.4.4. Mikrobaloncuk Yapıların Gümüş Salım Profillerinin Analizi

Salım çalışmaları için eşit büyüklükte (1-2 cm çapında) ve ağırlıkta hazırlanan örnekler, kurutularak tartıldıktan sonra (her örnek 5 mg) 15 mL'lik falkon tüpler içerisine yerleştirilerek 5 mL PBS ortamında 37°C su banyosunda inkübe edilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında (1, 2, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 120, 168 saat) alınan çözeltiler indüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi (Agilent Technologies-7800 ICP-MS) ile analiz edilmiştir (n=9).

3.2.5. AgNP İçeren Mikrobaloncuk Yapıların Sitotoksosite Testleri

Geliştirilen üç boyutlu-gözenekli mikrobaloncuk yapıların sitotoksisiteleri fibroblast hücreleri (L-929) kullanılarak hücre canlılığı indirekt MTT yapılarak belirlenmiştir [10]. L-929 hücreleri laboratuvarımız hücre stoğunda bulunmakta olup kültürleri rutin olarak laboratuvarımızda kullanılan yöntem ile yapılmıştır. Hücreler sıvı azot tankından çıkarılarak çözdürülmüş ve kültürleri bileşiminde %10 FBS (Biochrom, ABD), %1 L-glutamin (Cegrogen, Almanya) ve %0,1 Penisilin-streptomisin (Cegrogen, Almanya) içeren yüksek şeker içeriğine sahip DMEM (Cegrogen, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Hücre kültürü kabının yüzeyini %80 oranında kapladığı görülen hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp sayılmış ve deneylerde kullanılmıştır.

Diğer taraftan üç boyutlu-gözenekli mikrobaloncuk yapılar fosfatlı tuz tamponu (PBS, Gibco, ABD) ile yıkanmış ve laminar akışlı kabinde 45 dak. boyunca ultraviyole ışığa (UV) maruz bırakılarak steril edilmiştir. Sterilizasyonu takiben ekstrakt hazırlanması için 6 cm²/mL referans değeri kullanılarak örnek grubu başına kullanılacak kültür ortamı hesaplanmış ve örneklerin üzerine hesaplanan miktarda hücre büyütme ortamı konularak 72 saat standart hücre kültürü koşullarında (37 °C, %5 CO₂) inkübe edilmiştir (n=3). Bu işleme paralel olarak L-929 hücreleri göz başına 1.10⁴ hücre olacak şekilde kültür kabına (Greiner, Almanya) ekilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki ortam örnek grupları üzerinden elde edilen ekstrakt değiştirilmiş ve hücrelerin 24 saat boyunca ekstraktlar ile muamelesi sağlanmıştır (n=6). Pozitif kontrol grubu olarak %10 DMSO içeren hücre büyütme ortamı ve negatif kontrol olarak normal hücre büyütme ortamı kullanılmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra MTT analizi yapılarak % hücre canlılığı tespit edilmiştir. Bu amaçla hücrelerin üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılarak bileşimde %10 oranında MTT (5 mg/mL, Sigma-Aldrich) solüsyonu bulunan serumsuz

besi ortamı eklenmiş ve 4 saat boyunca standart hücre kültür koşullarında inkübe edilmiştir. 4 saat sonra oluşan formazan kristalleri DMSO kullanılarak çözdürülmüştür ve 570 ile 690 nm’de absorbans ölçümü yapılarak % hücre canlılığı hesaplanmıştır.

MTT ile hücre canlılığının test edildiği çalışma n=6 tekrarlı yapılmış ve sonuçlar ortalama±standart sapma olarak raporlanmıştır. Elde edilen hücre canlılığı verilerinin istatistiksel anlamlılığı GraphPad Prism (6.01 versiyon) kullanılarak tek yönlü ANOVA testi ile belirlenmiş olup, grupların çoklu karşılaştırılması için Bonferroni Çoklu Kıyaslama testi kullanılmıştır. p<0.05 olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.2.6. Mikrobaloncuk Yapıların Hücre Morfolojisi ve Canlılığı Üzerine Etkisi

Alg-PVA-PEI/AgNP mikrobaloncuk yapıların üzerinde kültüre edilen L-929 hücrelerinin morfolojilerinin ve canlılıklarının test edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla L-929 hücreleri uygun sayıya getirildikten sonra hücre kültür kabının yüzeyinden tripsinizasyon ile kaldırılmış ve daha önce verilen yöntem ile sterilizasyonu yapılan doku iskelelerine 3×10^4 hücre/doku iskelesi olacak şekilde hücreler ekilmiş ve farklı zaman dilimlerinde (24. ve 72. saatlerde) hücre morfolojisi ve canlılığı LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, ABD) kullanılarak tespit edilmiştir. Kit, üreticinin direktifleri uygulanarak kullanılmıştır. Özetle, 24 ve 72 saat sonunda örnekler üzerindeki besi ortamı, bileşiminde 4 μ M Calcein AM (canlı hücrelerin yeşil boyamaktadır) ve 2 μ M Etidyum homodimer-1 (ölü hücreleri kırmızı boyamaktadır) bulunan çalışma solüsyonu ile değiştirilmiş ve 37 °C de karanlıkta 45 dak. inkübe edilmiştir [78]. İnkübasyondan sonra hücre kültür kabının yüzeyinde bulunan hücrelerden floresans mikroskop altında görüntüler alınarak hücre canlılığı analiz edilmiştir.

3.2.7. AgNP İçeren Mikrobaloncuk Yapıların Antibakteriyel Etkisi

Üç boyutlu-gözenekli aljinat mikrobaloncuk yapıların antibakteriyel etkinliklerin belirlenmesi için gümüş salım profilleri de göz önünde bulundurularak antibakteriyel disk difüzyon testi uygulanmıştır. Disk difüzyon yara bölgelerinde sıklıkla karşılaşılan gram pozitif (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus ATCC 43300 (MRSA)*, *Staphylococcus aureus (S. aureus-ATCC 29213)*) ve gram negatif (*Escherichia coli (E. coli-ATCC 25922)*) bakteri türlerine karşı gerçekleştirilmiştir. 1×10^8 CFU (colony

forming unit), 0.5 mac farland bulanıklık değerinde hazırlanan bakteri derişimi kullanılmıştır. Eşit büyüklükte 6 mm çapında hazırlanan gözenekli mikrobaloncuk rnekleler 1×10^8 CFU derişiminde bakteri içeren agar plakalarına yerleştirilerek 24 saat sonunda bakteriyel üremenin geliştiği/gelişmediği inhibisyon zon (bölge) apları cetvel yardımıyla ölçülerek skorumlama yapılmıştır. Kontrol grubu olarak PEI ve AgNP sulu zeltileleri kullanılmıştır. Diğer yandan, Alg-PVA, Alg-PVA-PEI, Alg-PVA/AgNP, Alg-PVA-PEI/AgNP rnek gruplarını oluşturmuştur. Deney sonunda elde edilen inhibisyon zon (bölge) apları kontrol grubuna göre kıyaslanarak istatistiksel analizi gerçekleştirilmiştir.

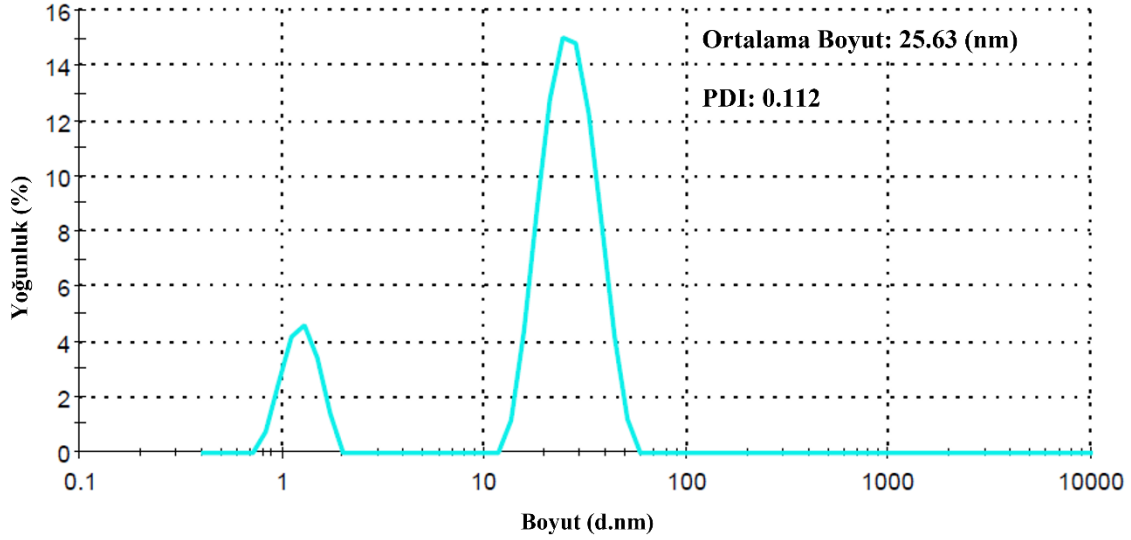
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışmasında yüksek su tutma kapasitesine sahip gözenekli yapıda ve antibakteriyel etkili 3B boyutlu gözenekli mikrobaloncuk yapıların üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç gümüş nanopartiküller sentezlenerek farklı derişimlerde Alg-PVA-PEI çözeltilerine eklenmiş ve T-bağlantılı mikroakışkan sistem ile 3B boyutlu gözenekli mikrobaloncuk yapılar üretilmiştir. Mikrobaloncukların üretim detayları ve özellikleri, gümüş nanopartiküllerin salım profilleri ve antibakteriyel etkileri, mikrobaloncuk yapıların fibroblast hücre canlılığına etkileri incelenerek sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.1. Gümüş Nanopartiküllerin Özellikleri

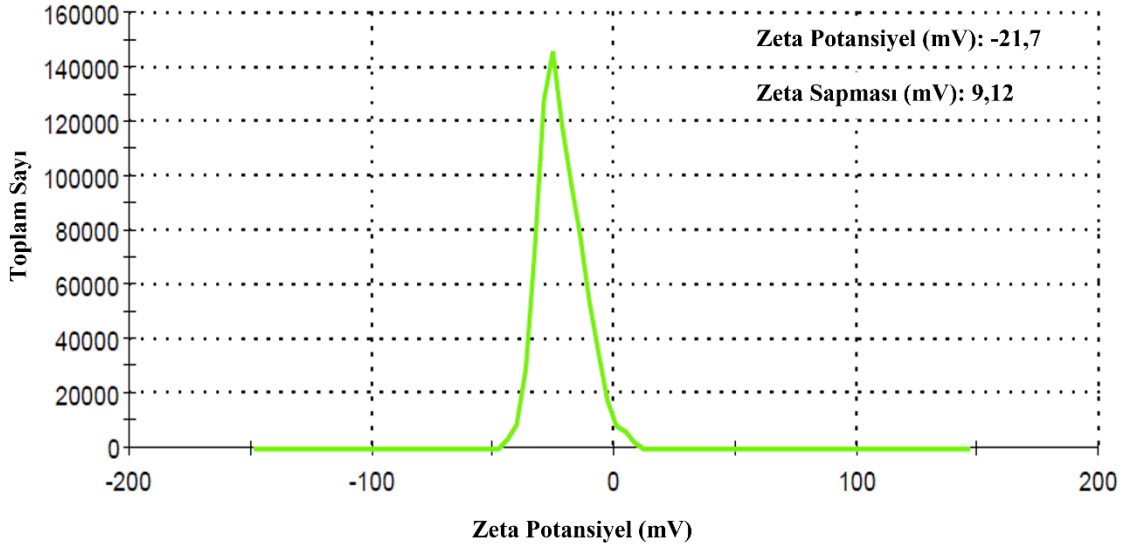
Gümüş nanopartiküller literatürden bilinen antibakteriyel özelliği sayesinde mikrobaloncuk üretiminde kullanılmıştır. Gümüş nanopartiküller, Suriati ve ark. tarafından kullanılan yöntem ile üretilmiştir [74]. Başlangıç materyali olarak gümüş nitrat, indirgeyici ve stabilize edici ajanlar olarak trisodyum sitrat ve askorbik asit kullanılmıştır. Üretilen gümüş nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zetasizer cihazı ile ve boyut ölçüm analizleri STEM dedektörü içeren cihaz kullanılarak yapılmıştır. Sentezlenen gümüş nanopartiküllerin ortalama boyutu 25 nm ve PDI değeri ise 0,112 olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1). Gümüş nanopartiküller ortalama olarak -21,7 mV zeta potansiyel değerine ve 9,12 mV zeta sapmasına sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2). STEM dedektörü içeren cihaz ile yapılan ölçüm sonucunda üretilen gümüş nanopartiküllerin küresel morfolojide sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3). Suriati ve ark. yaptığı çalışmada kullanılan yöntem ile üretilen gümüş nanopartiküllerin ortalama olarak 37,24 nanometre boyutunda ve küresel oldukları bildirilmiştir [74]. Referans çalışmada 4mM trisodyum sitrat kullanılmasıyla ortalama 38,53 nm ve 8mM trisodyum sitrat kullanılmasıyla 36,32 nm boyutunda gümüş nanopartikül üretildiği görülmüştür. Trisodyum sitrat derişimi artırıldığında partikül boyutunun küçüldüğü tespit edilmiştir. Benzer başka bir çalışmada ise AgNP üretimi için kullanılan çözeltideki trisodyum sitrat derişiminin 4mM kullanılmasıyla 20-65 nm aralığında, bu derişimin 8mM'a çıkarılmasıyla birlikte üretilen AgNP partikül boyut dağılımının 20-50 nm aralığında olduğu görülmüştür [74]. Diğer yandan, sırasıyla askorbik asit derişiminin 1mM'dan 4mM'a çıkarılmasıyla gümüş nanopartikül

boyutlarının 37,24 nm'den 47,28 nm'ye çıktığı belirtilmiştir. Gümüş nanopartikül üretiminde optimum olarak maksimum trisodyum sitrat derişiminin 8mM ve minimum askorbik asit derişimi 1mM olarak kullanılmıştır. Ayrıca, literatürde yara örtüsü ya da bazı doku iskelelerinde kullanılan gümüş nanopartiküller (5-100 nm) ile benzer boyutlarda olduğu gözlenmiştir [49, 62, 74, 79, 80].

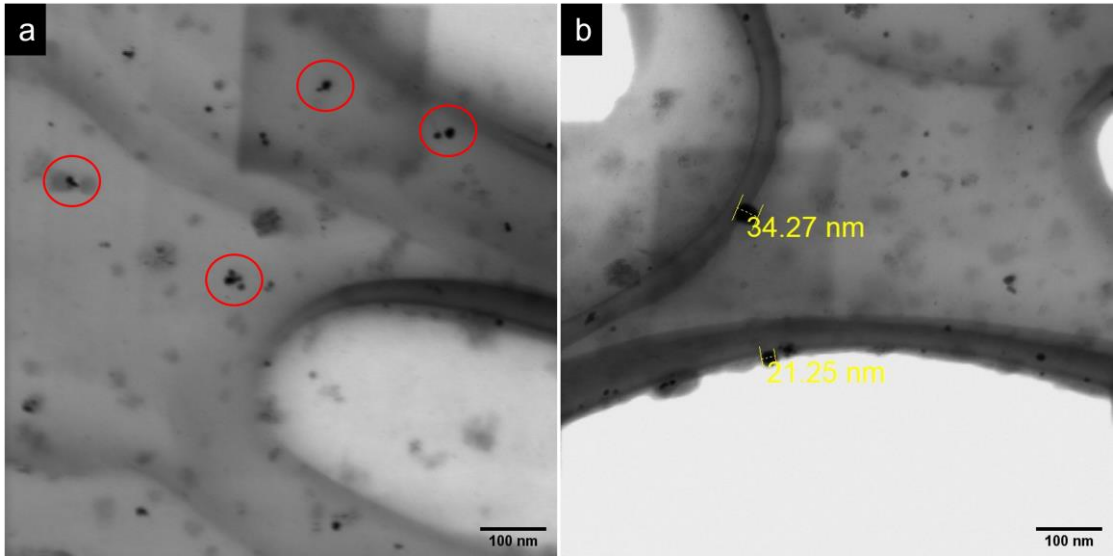


Şekil 4.1. Gümüş nanopartikül boyut dağılım grafiği.

Literatürde Shani ve ark. tarafından yapılan çalışmada, *Enicostemma axillare* yaprağı kullanılarak yeşil sentez ile gümüş nanopartikül üretimi yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde üretilen partiküller ortalama olarak 15-20 nanometre boyuta ve -24,6 mV zeta potansiyele (5,49 zeta sapması ile) sahip olduğu görülmüştür [81]. Ayrıca, Song ve ark. yaptıkları çalışmada, özellikle yara iyileşmesinde kullanılmak üzere gümüş nanopartikül içeren aljinat bazlı süngerler üretilmiştir. Üretilen gümüş nanopartiküller 3-15 nm aralığında ve -52,5mV zeta potansiyel değere sahiptir [79]. Sonuç olarak bu tez kapsamında üretilen ve karakterize edilen gümüş nanopartiküllerin özelliklerinin literatür verileri ile uyumlu olduğu ve antibakteriyel etki için kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.2. Gümüş nanopartiküllerin zeta potansiyel grafiği.



Şekil 4.3 Gümüş nanopartiküllerin STEM görüntüleri. a) Gümüş nanopartiküllerin mikroskop görüntüsü, b) Gümüş nanopartiküllerin boyut ölçümleri.

4.2. Mikrobaloncuk Üretiminde Kullanılan Polimer Çözeltilerin Özellikleri

T-bağlantılı mikroakışkan sistemde mikrobaloncuk üretimi için farklı derişimlerde polimer çözeltileri (Tablo 5) hazırlanarak viskozite ve yüzey gerilim değerleri belirlenmiştir. Alg-PVA çözeltilerinde, PVA derişimi %0,1’de sabit tutularak Alg derişimi %0,5, %1 ve %1,5 (w/v) olarak kullanılmıştır. %0,1 PVA ve %0,5 Alg içeren polimer çözeltisinin viskozitesi 6.5 mPa·s, yüzey gerilimi ise 55.3 mN/m olarak bulunmuştur. %1 Alg içeren polimer çözeltisi 18.2 mPa·s viskozite ve 54.6 mN/m yüzey gerilim değerine sahipken %1,5 Alg içeren çözeltinin viskozitesi 28.4 mPa·s ve yüzey gerilimi 54.2 mN/m olarak ölçülmüştür. Diğer yandan %0,1 PVA, %1 Alg ve sırasıyla %0,1, %1 ve %5 PEI eklenmesiyle birlikte polimer çözeltilerinin viskoziteleri sırasıyla 14.9, 17.5 ve 16.7 mPa·s ve yüzey gerilimleri ise 53.9, 54.3 ve 54.5 mN/m olarak hesaplanmıştır. %0,1 PVA, %1 Alg ve %0,05 AgNP içeren çözeltinin viskozite değeri 14.4 mPa·s, yüzey gerilimi ise 54.4 mN/m bulunmuştur. Ayrıca, %0,1 PVA, %1 Alg ve sırasıyla %0,05 ve %0,1 AgNP içeren polimer çözeltilerinin viskozite değerleri 15.0 ve 14.9 mPa·s ve yüzey gerilimleri 54.3 ve 54.8 mN/m olarak hesaplanmıştır. %0,1 PVA, %1 Alg ve %1 PEI içeren çözeltilere sırasıyla %0,05 ve %0,1 AgNP eklenmesiyle elde edilen polimer çözeltilerinin viskozite değerleri 14.7 ve 14.0 mPa·s ve yüzey gerilimleri 54.8 ve 54.4 mN/m olarak hesaplanmıştır. Polimer çözeltilerinin viskozite ve yüzey gerilim değerlerinin mikrobaloncuk üretimi üzerine etkileri ileri bölümlerde tartışılmıştır.

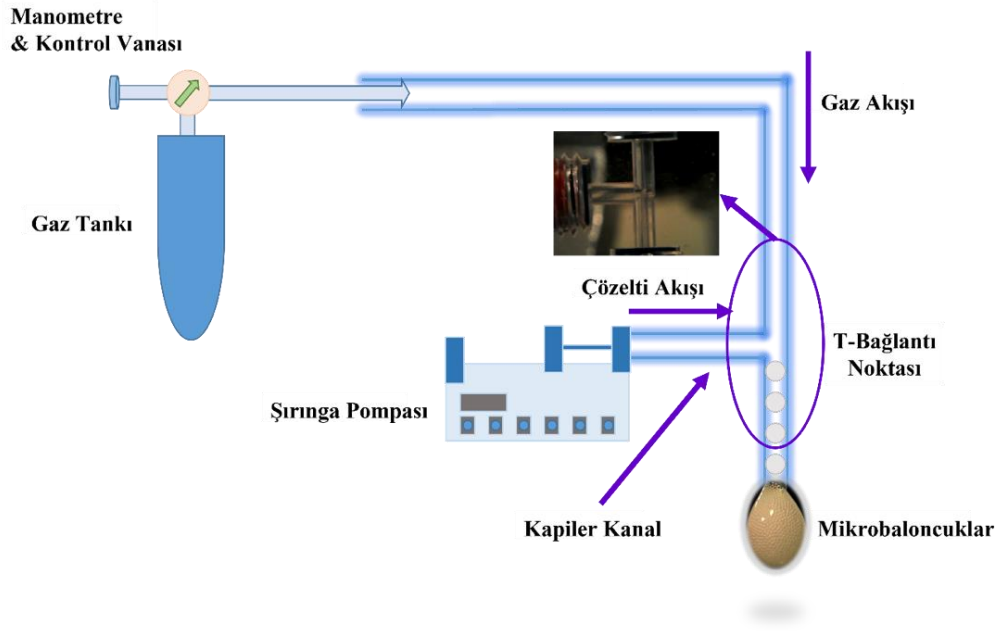
4.3. Mikroakışkan Sistem ile Mikrobaloncuk Yapıların Üretimi

Mikrobaloncuk üretimi için T bağlantılı sistem (Şekil 4.4) üst kanalından argon ile beslenmiştir. Buna dik olan kanaldan ise Tablo 5’teki polimer çözeltileri 45-50 °C’ye ısıtılarak mikrobaloncuk üretmek üzere şırıngaya alındıktan sonra polimer çözeltisi belirli bir akış hızında T-bağlantılı sisteme verilmiştir. Sistemin ortasında T-bağlantı noktasında polimer ve gaz etkileşimi ile içi hava dolu mikrobaloncuk üretim denemeleri yapılmıştır. Mikrobaloncuk üretiminde polimer derişimi, akış hızı ve gaz basıncı mikrobaloncuk oluşumunu etkileyen parametrelerdir [14, 17]. Çalışmamızda mikrobaloncuk üretiminde farklı polimer akış hızları denenmiş olup (150, 200 ve 250 µL/dk) 200 µL/dk hızında üretim yapılmıştır. Diğer yandan sisteme verilen inert gazın hızı ise 9 L/dk olarak optimize edilmiştir.

Tablo 5. Mikrobaloncuk üretiminde kullanılan polimer çözeltilerinin özellikleri.

No	Örnek	Polimer Çözeltisi (% w/v)				Viskozite (mPa·s)	Yüzey Gerilimi (mN/m)	Mikro Baloncuk Üretimi
		Alg	PVA	PEI	AgNP			
Aljinat-Poli (vinil alkol)								
1	Alg-PVA	0.5	0.1	-	-	6.5	55.3	-
2	Alg-PVA	1	0.1	-	-	18.2	54.6	✓
3	Alg-PVA	1.5	0.1	-	-	28.4	54.2	-
Aljinat-Poli (vinil alkol)-Polietilenimin								
4	Alg-PVA-PEI0.1	1	0.1	0.1	-	14.9	53.9	✓
5	Alg-PVA-PEI1	1	0.1	1	-	17.5	54.3	✓
6	Alg-PVA-PEI5	1	0.1	5	-	16.7	54.5	-
Aljinat-Poli (vinil alkol) /Gümüş Nanopartikül								
7	Alg-PVA/AgNP0.05	1	0.1	-	0.05	14.4	54.4	✓
Aljinat-Poli (vinil Alkol)-Polietilenimin/Gümüş Nanopartikül								
8	Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05	1	0.1	0.1	0.05	15.0	54.3	✓
9	Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1	1	0.1	0.1	0.1	14.9	54.8	✓
10	Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05	1	0.1	1	0.05	14.7	54.8	✓
11	Alg-PVA-PEI1/AgNP0.1	1	0.1	1	0.1	14.0	54.4	-

Tablo 5'te verilen Alg-PVA (%0,5 Alg ve %0,1 PVA), Alg-PVA-PEI0.1, Alg-PVA-PEI1, Alg-PVA/AgNP0.05, Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05, Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1 ve Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05 polimer çözeltileri kullanılarak mikrobaloncuk üretimi gerçekleştirilmiştir. Ancak Alg-PVA (%0,5 Alg ve %0,1 PVA) içeren çözeltinin viskozitesi değerlerinin düşük olması nedeniyle (6.5 mPa·s) mikrobaloncuk oluşumu gözlenmemiş olup oluşan baloncukların kanal dışarısına çıktığında patladığı ve yapıyı koruyamadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.4. T-Bağlantılı mikroakışkan sistem ile mikrobaloncuk üretim düzeneğinin şematik gösterimi.

Diğer taraftan Alg-PVA (%1,5 Alg ve %0,1 PVA) çözeltisi kullanılarak mikrobaloncuk üretimi denemesinde ise polimer çözeltisinin viskozitesi ($28.4 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) yüksek olduğundan dolayı $200 \mu\text{m}$ iç çapa sahip mikroakışkan sistemin kanalı tıkanmış olup üretim yapılamamıştır. Literatürde Elsayed ve ark. yaptığı çalışmada, %1 aljinat ve %0.25 (wt) polietilenglikol-40-stearat (PEG-40S) kullanarak T-bağlantılı sistem ile mikrobaloncuk üretimi gerçekleştirilmiştir [14]. Polimer çözeltisinin viskozite değeri $18.6 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ve 38.9 mN/m yüzey gerilimi değerine sahip olduğu görülmüştür. Yine Elsayed ve ark. yapmış olduğu başka çalışmada, %0,70 (wt) Aljinat ve %0,25 (wt) PEG-40S polimer çözeltisi ile mikrobaloncuk üretimi yapılmış olup bu çözeltinin viskozite değeri $19.2 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ve yüzey gerilimi ise 47.4 mN/m olarak hesaplanmıştır [17].

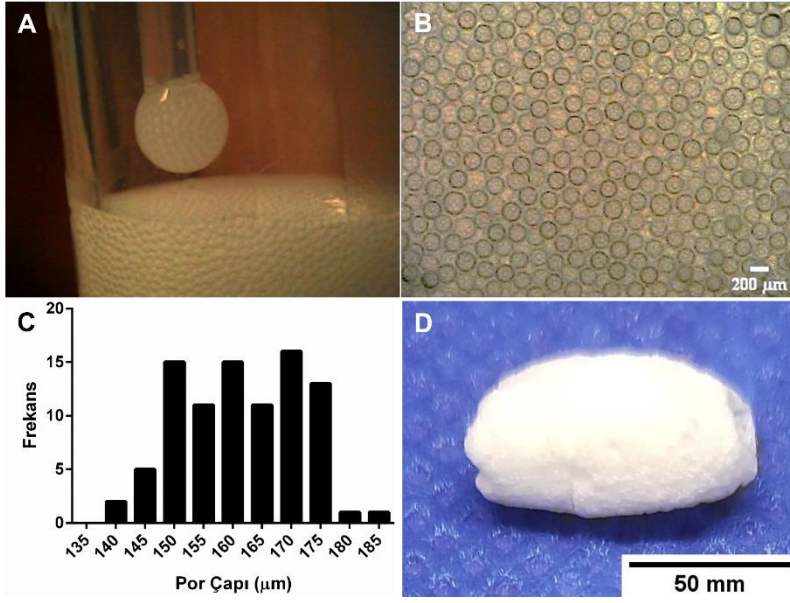
Bunlara ek olarak Alg-PVA-PEI5 (%1 Alg, %0,1 PVA ve %5 PEI) çözeltisi ile üretiminde ise viskozite ve yüzey gerilim değerleri üretim yapılabilir aralıkta olmasında rağmen çözeltinin yüksek miktarda (%5) PEI içerdiğinden dolayı üretilen mikrobaloncuklar çapraz bağlanamamış ve homojen dağılıma sahip mikrobaloncuk elde edilememiştir. Benzer şekilde Alg-PVA-PEI1/AgNP0.1 (%1 Alg, %0,1 PVA, %1 PEI ve %0,1 AgNP) çözeltisi kullanılarak mikrobaloncuk üretimi denemelerinde yüksek miktarda (%1) PEI ve (%0,1) AgNP etkileşiminden dolayı yine oluşan mikrobaloncuklar stabil bir çapraz bağlanma olmamasından dolayı üretim gerçekleştirilememiştir.

4.4. Mikrobaloncuk Yapıların Boyut Dağılımları ve Morfolojileri

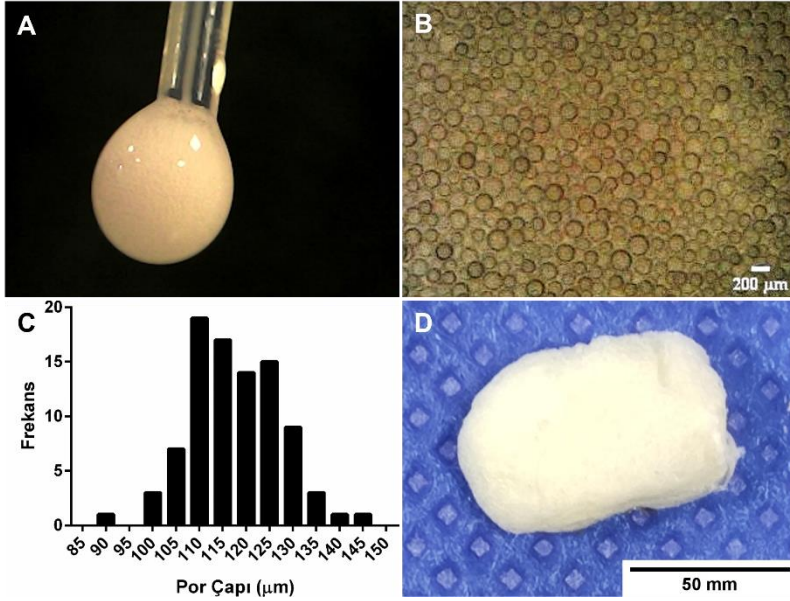
Mikrobaloncukların boyut dağılımları ve morfolojileri Şekil 4.5-Şekil 4.11’de ve ortalama por çapları Tablo 6’da sunulmuştur. T-bağlantılı mikroakışkan sistemde farklı polimer çözeltileri kullanılarak üretilen mikrobaloncukların boyutları kullanılan polimer çözeltilerinde PEI ve AgNP oranına bağlı olarak farklılıklar göstermiştir. Tablo 6’da görüldüğü gibi Alg-PVA polimer çözeltisi ile üretilen mikrobaloncukların por çapı ortalama 173.8 ± 16 μm olarak bulunmuştur. Diğer yandan sırasıyla Alg-PVA-PEI0.1 ve Alg-PVA-PEI1 çözeltilerinin por çapları 124.7 ± 9 ve 151.6 ± 10 μm ’dir. Bu çözeltilere AgNP eklenerek üretilen mikrobaloncukların por çapları ise sırasıyla, Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05, Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1, Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05 ve Alg-PVA/AgNP0.05 için 97.3 ± 11 , 133.1 ± 14 , 89.2 ± 14 ve 113.3 ± 12 μm olarak hesaplanmıştır. Yapılan ölçümlerde $n=3$ olacak şekilde 3 farklı örneğin cam yüzeyde çapraz bağlanarak üretilen mikrobaloncukların ışık mikroskobu görüntüsü alındıktan sonra ImageJ programı kullanılarak her örnek için 30 farklı mikrobaloncuğun por çapı ölçülmüş ve ortalama değerleri alınmıştır. Sonuç olarak üretilen mikrobaloncuk yapıların por çaplarının PEI ve AgNP varlığında azaldığı görülmüştür. Ancak PEI derişiminin %0.1 (w/v)’den 1 ve AgNP derişiminin % 0.05 (w/v)’den %1’e artmasıyla por çaplarının arttığı ancak Alg-PVA’nın por çap değerinin altında olduğu görülmüştür. Literatürde yapılan bir çalışmada aljinat kullanılarak üretilen mikrobaloncukların ortalama 70-150 μm por çapına sahip olduğu belirtilmiştir [14]. Diğer bir çalışmada ise Ahmad ve ark. T-bağlantılı mikroakışkan sistemde aljinat kullanarak ürettiği mikrobaloncukların ortalama 154 μm çapında olduğunu belirtmiştir [82]. Bir başka çalışmada üretilen mikrobaloncuklar 70-300 μm por çap aralığına sahip olup, 300 μm por çapında üretilen örneklerin 70 μm çapındaki örneklere göre %170 daha kararlı bir yapıya sahip olduğu raporlanmıştır [83].

Mikrobaloncukların 1000x dijital mikroskop görüntüleri incelendiğinde monodispers bir dağılıma sahip olduğu gözlenmiştir. T-bağlantılı mikroakışkan sistem kullanılarak elde edilen mikrobaloncukların dijital mikroskoptan çekilen görüntüleri ve ürün halinde yapısının görüldüğü fotoğraflar (Şekil 4.5-Şekil 4.11) görülmektedir.

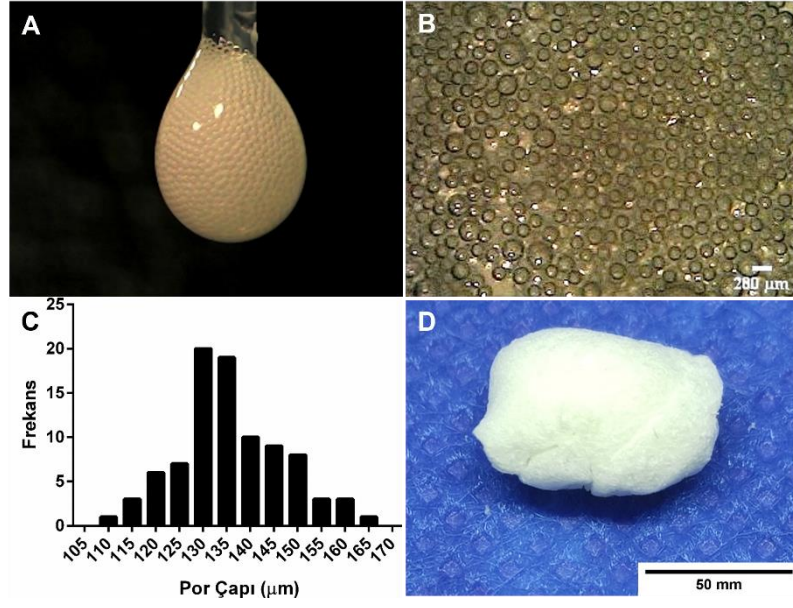
Mikrobaloncukların oluşumuna paralel olarak CaCl_2 çözeltisinde çapraz bağlandıktan sonra kurutulmuş ve 3 boyutlu gözenekli yapılar elde edilmiştir ve Şekil 4.5-Şekil 4.11’de, verilmiştir. Elde edilen 3 boyutlu yapılar oldukça gözenekli ve süngerimsi özellikte olduğu gözlenmiştir.



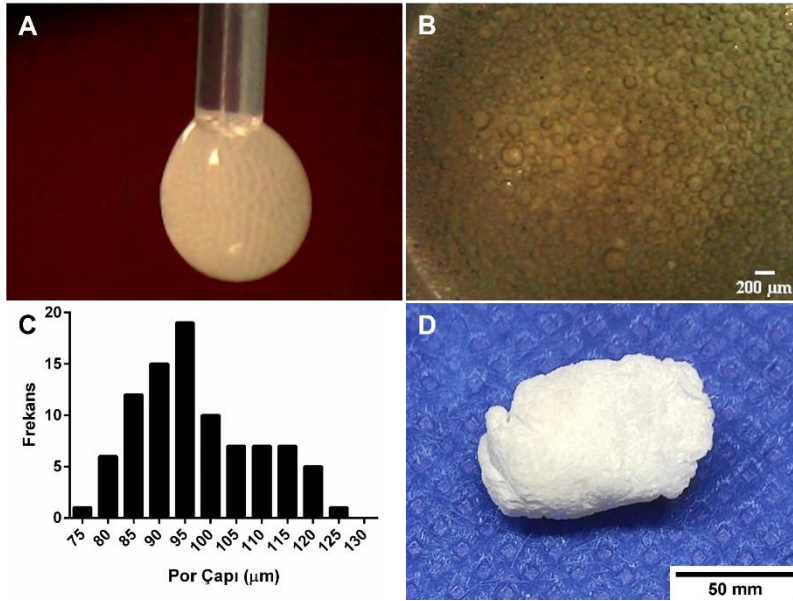
Şekil 4.5. Alg-PVA Mikrobaloncuklar: A) Mikrobaloncukların oluşumu, B) Mikrobaloncukların ışık mikroskobu görüntüleri (1000x), C) Mikrobaloncukların por çap dağılımının histogram grafiği, D) 3-boyutlu gözenekli yapı.



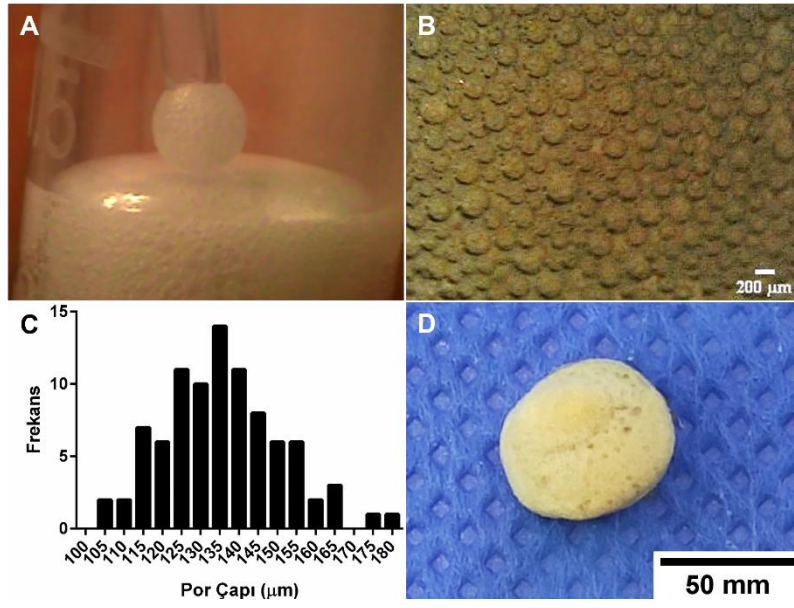
Şekil 4.6. Alg-PVA-PEI0.1 Mikrobaloncuklar: A) Mikrobaloncukların oluşumu, B) Mikrobaloncukların ışık mikroskobu görüntüleri (1000x), C) Mikrobaloncukların por çap dağılımının histogram grafiği, D) 3-boyutlu gözenekli yapı.



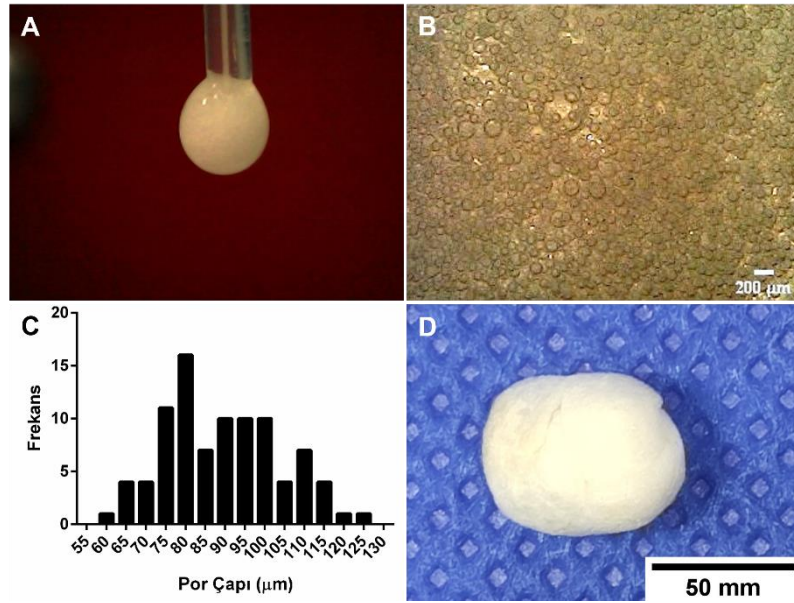
Şekil 4.7. Alg-PVA-PEI1 Mikrobaloncuklar: A) Mikrobaloncukların oluşumu, B) Mikrobaloncukların ışık mikroskobu görüntüleri (1000x), C) Mikrobaloncukların por çap dağılımının histogram grafiği, D) 3-boyutlu gözenekli yapı.



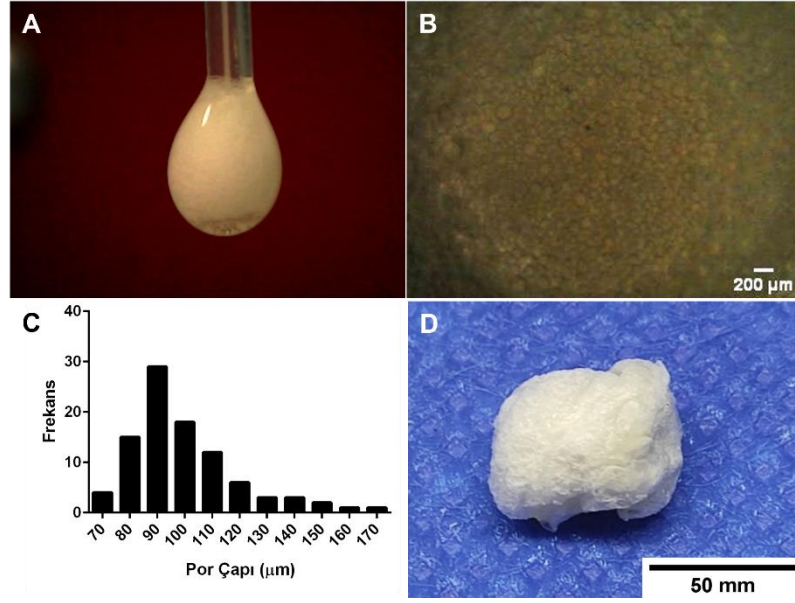
Şekil 4.8. Alg-PVA-PEI/0.1AgNP0.05 Mikrobaloncuklar: A) Mikrobaloncukların oluşumu, B) Mikrobaloncukların ışık mikroskobu görüntüleri (1000x), C) Mikrobaloncukların por çap dağılımının histogram grafiği, D) 3-boyutlu gözenekli yapı.



Şekil 4.9. Alg-PVA-PEI/0.1AgNP0.1 Mikrobaloncuklar: A) Mikrobaloncukların oluşumu, B) Mikrobaloncukların ışık mikroskobu görüntüleri (1000x), C) Mikrobaloncukların por çap dağılımının histogram grafiği, D) 3-boyutlu gözenekli yapı.



Şekil 4.10. Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05 Mikrobaloncuklar: A) Mikrobaloncukların oluşumu, B) Mikrobaloncukların ışık mikroskobu görüntüleri (1000x), C) Mikrobaloncukların por çap dağılımının histogram grafiği, D) 3-boyutlu gözenekli yapı.



Şekil 4.11. Alg-PVA/AgNP0.05 Mikrobaloncuklar: A) Mikrobaloncukların oluşumu, B) Mikrobaloncukların ışık mikroskobu görüntüleri (1000x), C) Mikrobaloncukların por çap dağılımının histogram grafiği, D) 3-boyutlu gözenekli yapı.

4.5. Mikrobaloncuk Yapıların Su Tutma Kapasiteleri

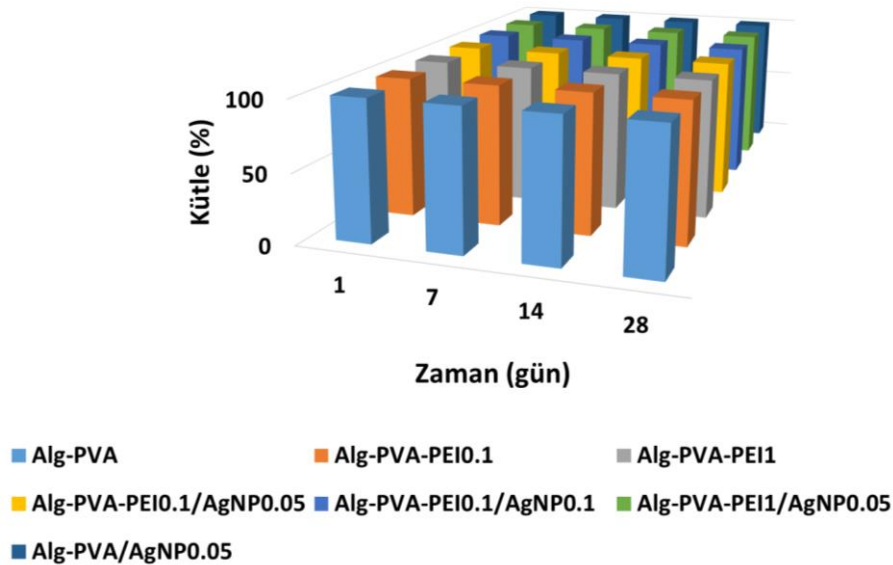
3-Boyutlu gözenekli yapıların % su tutma kapasiteleri yaklaşık olarak 3685-4300 arasında bulunmuştur (Tablo 6). Polimer kompozisyonuna ve yüksek gözenek yapısına bağlı olarak geliştirilen yapıların su tutma kapasitelerinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Benzer çalışmalar literatürde de izlenmiştir. Örneğin Sing ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada, farklı oranlarda gümüş nanopartikül içeren PVP-Aljinat hidrojellerinin 24 saatte yaklaşık %1881–2361 aralığında su tutma kapasitesine sahip olduğu görülmüştür [84]. Diğer çalışmalarda ise, çinko içeren aljinat hidrojel yapılarının su tutma kapasitelerinin maksimum %450 seviyesinde [85] olduğu ve Ca^{2+} ile çapraz bağlanarak üretilen sodyum aljinat baloncuklarının maksimum %350 [86] olduğu görülmüştür. 3-Boyutlu mikrobaloncuk yapıların su tutma kapasitesinin yüksek olması polimerlerin hidrofilik yapısından dolayı olduğu, bu özelliğin enfekte ve eksudalı yara iyileşmesinde önemli rol oynayacağı düşünülmektedir.

Tablo 6. Mikrobaloncuk yapıların por çapı ve su tutma kapasitesi.

No	Örnek	Por Çapı (µm)	Su Tutma Kapasitesi (%)
1	Alg-PVA	173.8±16	4210
2	Alg-PVA-PEI0.1	124.7±9	3939
3	Alg-PVA-PEI1	151.6±10	4250
4	Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05	97.3±11	3879
5	Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1	133.1±14	4302
6	Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05	89.2±14	3685
7	Alg-PVA/AgNP0.05	113.3±12	3983

4.6. Mikrobaloncuk Yapıların Hidrolitik Bozunma Davranışları

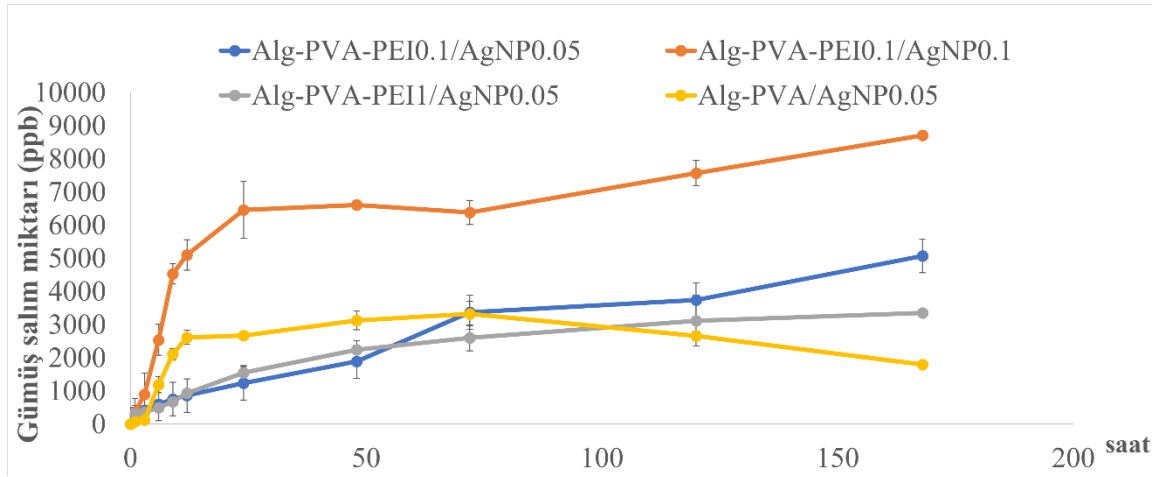
Mikrobaloncuk yapıların sulu ortamda kararlılıklarını belirlemek üzere farklı zaman aralıklarında hidrolitik bozunma davranışları incelenmiştir. Aljinat, memelilerde doğal olarak hidrolize uğramaz ve bozunmaz. Bunun nedeninin aljinatın bozunmasından sorumlu alginaz enziminin memelilerde bulunmamasıdır. Ancak iki değerlikli iyonların bir değerlikli iyonlarla yer değiştirmesi ya da açığa çıkması ile polimer zincirleri çözülebilir. Bu çalışmada geliştirilen mikrobaloncuk gözenekli yapıların sulu ortamda 28 güne kadar hidrolize uğramadığı ve uygulanan iyonik çapraz bağlama ile kararlılıklarını korudukları gözlenmiştir.



Şekil 4.12. Mikrobaloncuk yapıların sulu ortamda kararlılıkları.

4.7. Mikrobaloncuk Yapıların Gümüş Salım Profilleri

Gümüş nanopartikül içeren gözenekli mikrobaloncuk yapıların gümüş salım profilleri değerlendirildiğinde tüm gruplarda ilk 24 saatte patlama etkisiyle yüksek miktarda gümüş salımı gerçekleşmiş daha sonra platoya ulaşmıştır (Şekil 4.13). PEI içermeyen Alg-PVA/AgNP0.05 örneklerinde, 24 saat sonunda 2667 ppb ve 72 saat sonra 3329 ppb AgNP salımı görülmüştür. Daha sonra bu yapıya %0.1 PEI eklenmesiyle AgNP'lerin daha yavaş salımına neden olduğu, Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05 örneğinde ilk 24 saat sonunda bu değer 2667 ppb değerinden 1234 ppb'ye düştüğü görülmüş ve 72 saat sonunda 3374 ppb AgNP salımı gerçekleşmiştir. AgNP salımının bu örnek grubunda daha düşük olmasının PEI'nin katyonik yapısı nedeniyle aljinatla etkileşime girerek çapraz bağlanmayı bir miktar artırdığı düşünülmektedir. Aynı örnekte AgNP miktarının % 0.05'ten (w/v) 0.1'e çıkarılmasıyla geliştirilen Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1 grubunda ise ilk 24 saatte 6463 ppb ve 72 saat sonunda 6383 ppb AgNP salımı olmuştur. Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05 polimer grubu ile üretilen mikrobaloncuk yapılarında ise PEI oranının %1'e artırılmasıyla yine PEI'nin AgNP salım miktarını yavaşlattığı ve ilk 24 saatte 1552 ppb ve ilk 72 saatte 2605 ppb değerinde olduğu bulunmuştur ve bu örnek grubunda 120 ve 168. saatlerde ise AgNP salım miktarı hemen hemen sabit kalarak salımın sonlandığı anlaşılmaktadır. Mikrobaloncuk yapıların bu süre içinde sulu ortamda kararlı olması nedeniyle gümüş salımının difüzyon ile gerçekleştiği öngörülmektedir. Sonuç olarak AgNP içeren tüm örneklerde ilk 24 saatte patlama etkisiyle yüksek miktarda AgNP salımı gerçekleşmiş olup, ilk 9 saatte AgNP salım miktarı tüm gruplar için katlanarak artmış olup literatür ile uyumlu veriler elde edilmiştir [87, 88]. Ayrıca, AgNP'lerin mikrobaloncuk yapılardan uzatılmış salım sergilemesinden dolayı enfekte yaralarda antibakteriyel etkisinde uzun süreli olması açısından önemli olacaktır.



Şekil 4.13. 3-Boyutlu gözenekli mikrobaloncuk yapılardan gümüş nanopartikül salımı.

4.8. Mikrobaloncuk Yapıların Antibakteriyel Etkileri

Gümüş nanopartikül içeren 3-boyutlu mikrobaloncuk yapıların antibakteriyel aktiviteleri Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) M2 A9.26:1 Disk Difüzyon Test Yöntemi ile *S. Aureus*, *E. Coli* ve *MRSA* bakterilerine karşı test edilmiştir. Bakteri besi yeri olarak Mueller-Hinton agar kullanılmıştır. Agar yüzeyi, 0.5 McFarland standardının bulanıklığına ayarlanmış bir hücre süspansiyonuna batırılmış bir sürüntü kullanılarak aşılansmıştır [89]. Kontrol grubu ve örnekler 6 mm çapında dairesel diskler halinde kesilerek hazırlanmıştır. Kontrol grubu olarak %0.1, % 1PEI ve %0.05 AgNP ve %0.1 PEI diskler üzerine emdirilerek kurutulmuştur. Tüm gruplar ve kontrol disklerinin her biri *S. Aureus*, *E. Coli* ve *MRSA* içeren Mueller-Hinton agar plaklarına yerleştirilmiş ve gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnhibisyon zon çapları 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra bir cetvel yardımıyla mm cinsinden ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 7 ve 8'de, inhibisyon zon çapı görselleri ise Şekil 4.14 -15'te sunulmuştur.

Alg-PVA grubunda PEI ve AgNP içeriği olmadığından dolayı üç farklı bakteri türüne karşı da antibakteriyel etki gözlenmemiştir. Kontrol grubu olarak % 0.05 ve % 0.1 AgNP içeren disk çapları sadece *E.Coli*'ye karşı 6 mm'den 10 mm arttığı gözlenmiştir. Benzer şekilde Alg-PVA/AgNP0.05 örneklerde inhibisyon zone çapı 6.00 mm'den 7.0 mm artarak düşük miktarda antibakteriyel özellik göstermiştir. AgNP'lerin sadece *E.Coli*'ye karşı

antibakteriyel etki göstermesinin *E.Coli'nin* gram negatif bakteri olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Diğer taraftan kontrol grubu olarak %0.1 PEI içeren disk çapları *E.Coli* karşı 6 mm'den 10 mm'ye artarken, %1 PEI içeren disk çapları ise *S.Aureus* ve *MRSA* karşı sırasıyla 10.5 ± 0.6 ve 10.0 ± 0.0 mm olarak ölçülerek antibakteriyel etki gösterdiği izlenmiştir. PEI'nin katyonik yapısı nedeniyle antibakteriyel özellik göstermesi beklenen bir durum olmakla birlikte %0.1 PEI içeren disklerin gram negatif bir bakteri olan *E.Coli*'ye karşı antibakteriyel aktivite göstermesi, diğer taraftan %1PEI içeren disklerin gram pozitif *S.Aureus* ve *MRSA*'ya karşı antibakteriyel aktivite göstermesi anlaşılmalıdır. % 0.1 PEI içeren Alg-PVA-PEI0.1 gram pozitif bir bakteri olan *S. Aureus*'a karşı örnek çapının 6 mm'den 7.3 ± 0.52 mm'ye çıktığı, % 1 PEI içeren Alg-PVA-PEI1 grubuna bakıldığında *S. Aureus* ve *MRSA* bakterilerine karşı örnek çaplarının 6 mm'den 7 ± 0 mm'ye çıkarak düşük miktarda antibakteriyel atki gözlenmiştir.

Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05 grubunda inhibisyon zone çapları *S. Aureus* için 10 ± 0 mm, *E. Coli* için 11 ± 0.9 mm ve *MRSA* için 10 ± 0 mm olarak ölçülmüştür. Benzer şekilde Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1 grubunda ise ölçülen inhibisyon zone çapları *S. Aureus*, *E. Coli* ve *MRSA* için sırasıyla 9 ± 0 mm, 11.7 ± 1.36 mm ve 10 ± 0 mm olarak tespit edilmiştir. Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05 örnekleride *S. Aureus* (10 ± 0), *E. Coli* (9.7 ± 0.51) ve *MRSA* (10.7 ± 0.51) bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği görülmüştür.

Sonuç olarak sadece AgNP içeren örnekler sadece *E.Coli*'ye karşı antibakteriyel etki gösterirken hem AgNP hemde PEI içeren örneklerde ise tüm bakteri grupların karşı antibakteriyel etki gözlenmiştir.

Literatürde, Calamak ve ark. tarafından yapılan çalışmada ipek fibroininden üretilmiş ve gümüş iyonları içeren fiber yapılarının antibakteriyel aktivileri disk difüzyon testi ile incelenmiştir. Üretilen fiber yapılarından %0.1 ve %0.5 gümüş iyonu içeren gruplarının *S. Aureus* bakterisine karşı antibakteriyel etki göstermediği, yalnızca %1 gümüş iyonu içeren ve metanol ile işlem gören fiber yapıların inhibisyon zon çaplarının 5 mm'den 6.5 mm'ye, gluteraldehit ile çapraz bağlanan fiberlerde ise 7.3 mm'ye çıktığı görülmüştür [90]. Mohiti-Asli ve ark. yaptığı çalışmada PLA ile ürettikleri nanofiber yapıda doku iskelelerinin *S. Aureus* ve *E. Coli* bakterilerine karşı antibakteriyel etkilerine bakılmıştır. Üretilen iskelelere farklı oranlarda (31.25, 62.5, 125 ve 250 µg/ml) gümüş iyonu eklenmiş ve bu malzemelerin *S. Aureus* ve *E. Coli* bakteri suşlarına karşı antibakteriyel etkiye sahip

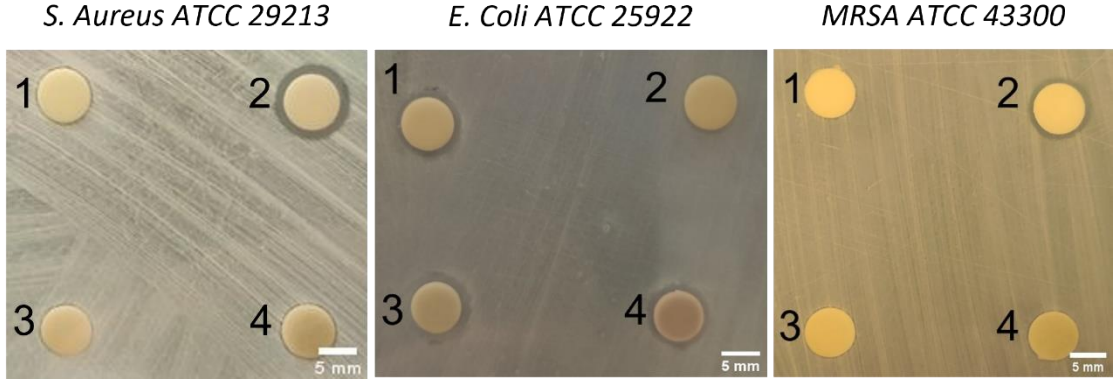
olduğu görülmüştür [91]. Diğer taraftan Jiraroj ve ark. yapmış olduğu çalışmada, zeolit malzemesine Ag⁺ iyonu ve gümüş nanopartikül (AgNP) eklenerek üretilen kompozit malzemede gram pozitif (*S. Aureus*) ve gram negatif (*E. Coli*) bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir. Antibakteriyel özelliğin zamana karşı farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Gümüş iyonu içeren kompozitin, AgNP içeren kompozit malzemeye göre *E. Coli*'ye karşı daha fazla antibakteriyel etkisinin olduğu ve 3 saat sonra ise ortalama 394 nm boyutunda AgNP içeren kompozitin *S. Aureus* bakterisine karşı daha yüksek antibakteriyel etki gösterdiği görülmüştür [92].

Literatürde bazı yayınlarda negatif yüklü bakteriler ile pozitif yüklü nanopartiküller arasındaki elektrostatik çekimin antibakteriyel etkide önemli olduğu bildirilmektedir. Bu tez çalışmasında sadece AgNP içeren örneklerin *E. Coli*'ye karşı antibakteriyel etki göstermesinin bu nedenle olduğu kanısındayız. Diğer taraftan yüksek derecede antibakteriyel etki için örneklerden salınan AgNP miktarı önemli bir parametre olup minimum inhibisyon derişiminin (MIC) üzerinde olması gerekmektedir. Literatürde minimum inhibisyon derişiminin gram pozitif *S. Aureus*, gram pozitif *S.epidermis* ve gram negatif *P.aeruginosa* için sırasıyla 5 ppm, 1.69 ve 3 ppm olarak verilmiştir. Tez çalışmasında 24 saat sonra AgNP salım değerleri 1234-6463 ppb arasında olup belirtilen minimum inhibisyon derişiminin çok üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan bu tez çalışmasındaki gümüş nanopartikül içeren 3B mikrobaloncuk örnekleri incelendiğinde 24 saat sonra AgNP salımı 6463 ppm değeri ile Alg-PVA-PEI0.1/AgNP örneğine ait olup *E.Coli*'ye karşı en yüksek antibakteriyel etkiyi bu örnek göstermiştir.

Tablo 7. Kontrol gruplarının antibakteriyel inhibisyon zon çapları

No	Kontrol Grupları (w/v)	İnhibisyon Zon Çapı (mm)*		
		<i>S. Aureus</i> ATCC 29213	<i>E. Coli</i> ATCC 25922	<i>MRSA</i> ATCC 43300
1	%0.1 PEI	-	10±0.0	-
2	%1 PEI	10.5±0.6	-	10±0.0
3	%0.05 AgNP	-	10±0.0	-
4	%0.1 AgNP	-	10±0.0	-

*disk çapı 7 mm'dir.

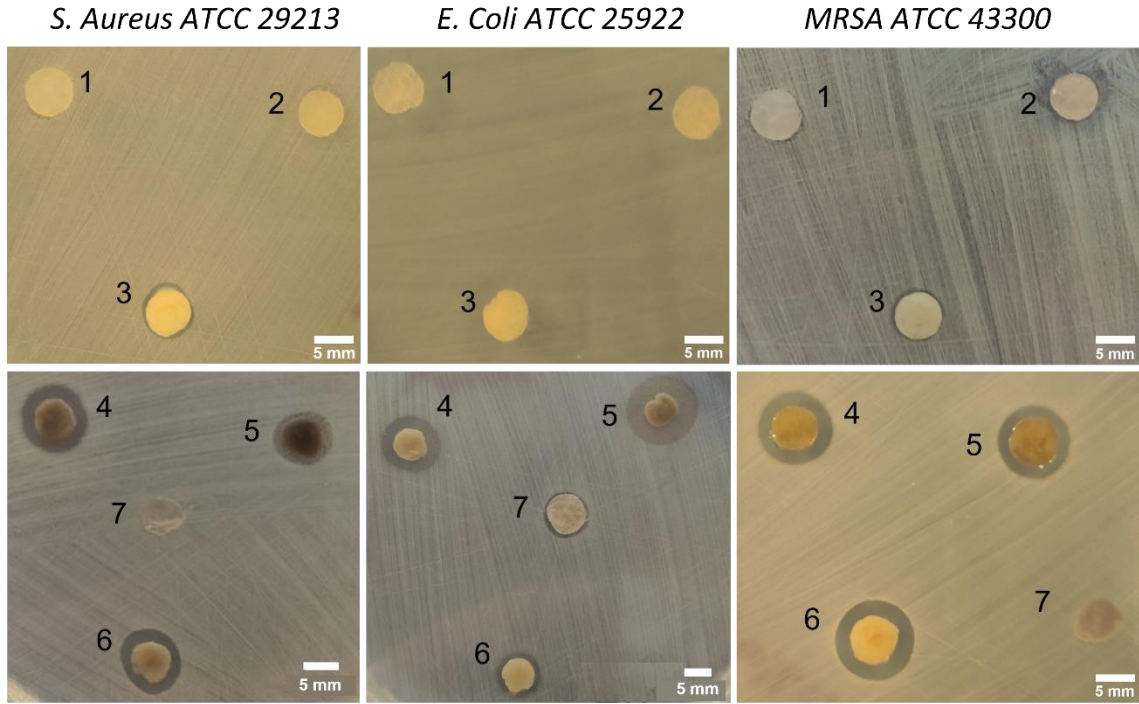


Şekil 4.14. Kontrol gruplarının antibakteriyel disk difüzyon testi inhibisyon çapları: Disk çapı 7 mm'den %0.1 PEI ile *E. Coli* bakterisine karşı 10 mm (1), %1 PEI ile *S. Aureus* 'a karşı 10.5 mm (2) ve *MRSA* bakterisine karşı 10 mm, %0.05 AgNP grubunda ise *E. Coli* 'ye karşı 10 mm (3) ve %0.1 AgNP grubunda yine *E. Coli* bakterisine karşı 10 mm'dir (4).

Tablo 8. Mikrobaloncuk yapıların inhibisyon zon çapları.

	Örnek Grupları	İnhisyon Zon Çapı (mm)*		
		<i>S. Aureus</i> <i>ATCC 29213</i>	<i>E. Coli</i> <i>ATCC 25922</i>	<i>MRSA</i> <i>ATCC 43300</i>
1	Alg-PVA	-	-	-
2	Alg-PVA-PEI0.1	7.3±0.5	-	-
3	Alg-PVA-PEI1	7±0.1	-	7±0.0
4	Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05	10±0.0	11±0.9	10±0.0
5	Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1	9±0.0	11.7±1.4	10±0.0
6	Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05	10±0.0	9.7±0.5	10.7±0.5
7	Alg-PVA/AgNP0.05	-	7±0.0	-

*örneklerin çapı 6 mm'dir.



Şekil 4.15. Mikroakışkan temelli 3-Boyutlu gözenekli mikrobaloncuk yapıların antibakteriyel disk difüzyon testi-inhibisyon çapları: Başlangıç çapları 6 mm olan örnek grupları: (1) Alg-PVA grubu üç bakteri türüne karşı aktivite göstermemiştir, (2) Alg-PVA-PEI0.1 *S. Aureus* bakterisine karşı 7.3 mm, (3) Alg-PVA-PEI1 *S. Aureus* ve *MRSA* bakterilerine karşı 7 mm, (4) Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05 *S. Aureus* bakterisine karşı 10 mm, *E. Coli*'ye karşı 11 mm ve *MRSA*'ya karşı 10 mm, (5) Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1 *S. Aureus* bakterisine karşı 9 mm, *E. Coli*'ye karşı 11.7 mm ve *MRSA*'ya karşı 10 mm, (6) Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05 *S. Aureus* bakterisine karşı 10 mm, *E. Coli*'ye karşı 9.7 mm ve *MRSA*'ya karşı 10.7 mm, (7) Alg-PVA/AgNP0.05 grubu ise *E. Coli*'ye karşı 7 mm olarak ölçülmüştür (ölçek = 5 mm).

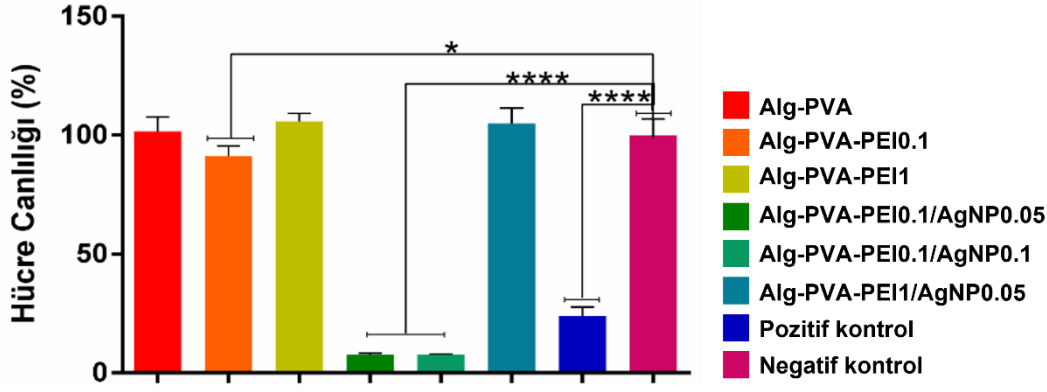
4.9. Mikrobaloncuk Yapıların Sitotoksiteleri

Üretilen üç boyutlu-gözenekli mikrobaloncuk yapıların antibakteriyel yara örtüsü olarak kullanılması amaçlandığı için ISO 10993-5 "Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi" "Bölüm 5:Vücut dışı sitotoksiste deneyleri" standartının "Endirekt MTT sitotoksiste testi" ile sitotoksiste testi yapılmıştır. Deney grupları ile negatif kontrol grubu için elde edilen hücre canlılığı verileri istatistiksel anlamlılık açısından kıyaslanmış ve sonuçlar Şekil 4.16'da sunulmuştur. MTT sonuçları, malzeme tipine göre hücre canlılığının farklılık gösterdiğini; Alg-PVA, Alg-PVA-PEI0,1, Alg-PVA-PEI1 ve Alg-PVA-PEI1/AgNP0,05 gruplarının yüksek biyoyumluluk (>%95) gösterdiğini ancak Alg-PVA-PEI0,1/AgNP0,1 ve Alg-PVA-PEI0,1/AgNP0,05 gruplarının toksik etki (<%8)

gösterdiği tespit edilmiştir. Negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında Alg-PVA, Alg-PVA-PEI1 ve Alg-PVA-PEI1/AgNP0,05 gruplarında elde edilen hücre canlılığı, negatif kontrol grubu ile benzer bulunmuşken ($p>0.05$), Alg-PVA-PEI0,1 grubunda anlamlı düzeyde düşük tespit edilmiştir ($p<0.05$). Yine negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre canlılığı Alg-PVA-PEI0,1/AgNP0,1 ve Alg-PVA-PEI0,1/AgNP0,05 gruplarında anlamlı düzeyde düşük çıkmıştır ($p<0.05$), ancak her iki grupta benzer sonuçlar tespit edilmiştir ($p>0.05$). Eşit miktarda AgNP içeren gruplar (Alg-PVA-PEI1/AgNP0,05 ve Alg-PVA-PEI0,1/AgNP0,05) kıyaslandığında, %1 oranında PEI kullanılan grupta hücre canlılığı >95 iken, %0,1 PEI kullanıldığı grupta hücre canlılığı %7,8 olarak tespit edilmiştir.

Diğer gruplara göre Alg-PVA-PEI0,1/AgNP0,1 ve Alg-PVA-PEI0,1/AgNP0,05 örneklerinin toksik etki göstermesinin nedeninin 72 saat sonra salınan yüksek AgNP miktarı olduğu kanısındayız. Alg-PVA-PEI0,1/AgNP0,1 ve Alg-PVA-PEI0,1/AgNP0,05 örneklerinden 72 saat sonra sırasıyla 6383 ve 3374 ppb AgNP salımı gerçekleşmiştir. En yüksek AgNP salımına sahip Alg-PVA-PEI0,1/AgNP0,1 örneği *E.Coli*'ye karşı en yüksek antibakteriyel etki göstermiştir.

Calamak ve ark. yaptıkları çalışmada, %0.1, 0.5 ve 1 gümüş iyonları içeren nanofiber yapılar üretmişlerdir. Ürettikleri malzemelerin antibakteriyel aktivitesi ve MTT analizlerine bakıldığında, düşük gümüş iyonu içeren (%0.1 ve 0.5) malzemelerin ortalama %90'ın üzerinde hücre canlılığına sahip olduğu fakat antibakteriyel olmadığı görülmüştür. Yüksek gümüş iyonu içeren (%1) nanofiber yapılar ise antibakteriyel aktiviteye sahip olmakla birlikte yaklaşık %50 hücre canlılığına sahip yani toksik olduğu gözlenmiştir [90]. Sunulan tez çalışmasında ise düşük miktarda AgNP kullanılmış olup Alg-PVA-PEI1/AgNP0,05 grubunda hem yüksek oranda hücre canlılığı (~%105) hem de antibakteriyel aktivite gözlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, sodyum aljinat, PVA, PEI ve AgNP içeren biyomalzemelerin MTT analizleri sonucunda toksik etki göstermediği, AgNP derişimine bağılı olarak biyoyumlu malzeme olarak kullanıldığı görülmüştür [73, 93-97].



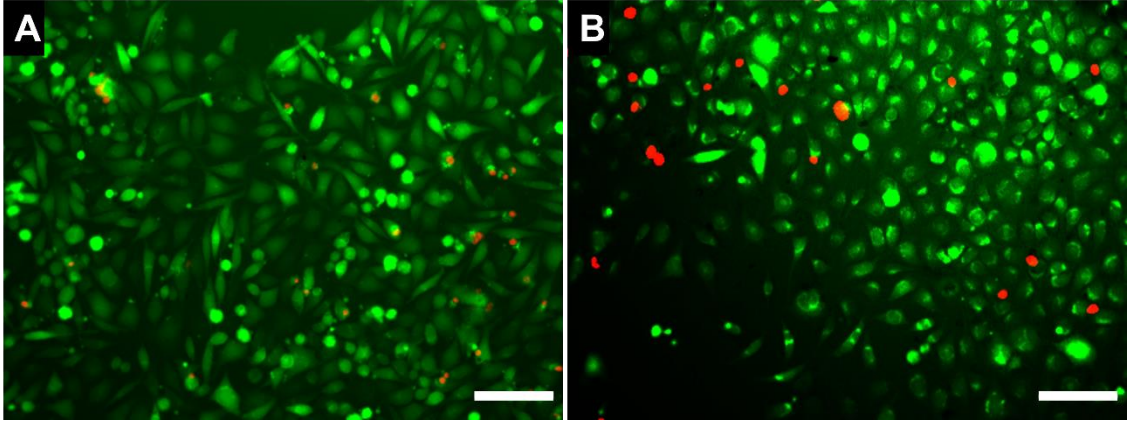
Şekil 4.16. MTT indirekt sitotoksosite testi: % hücre canlılığı. * $p<0,05$ ve **** $p<0,0001$

4.10. Mikrobaloncuk Yapıların Hücre Canlılığına Etkisi

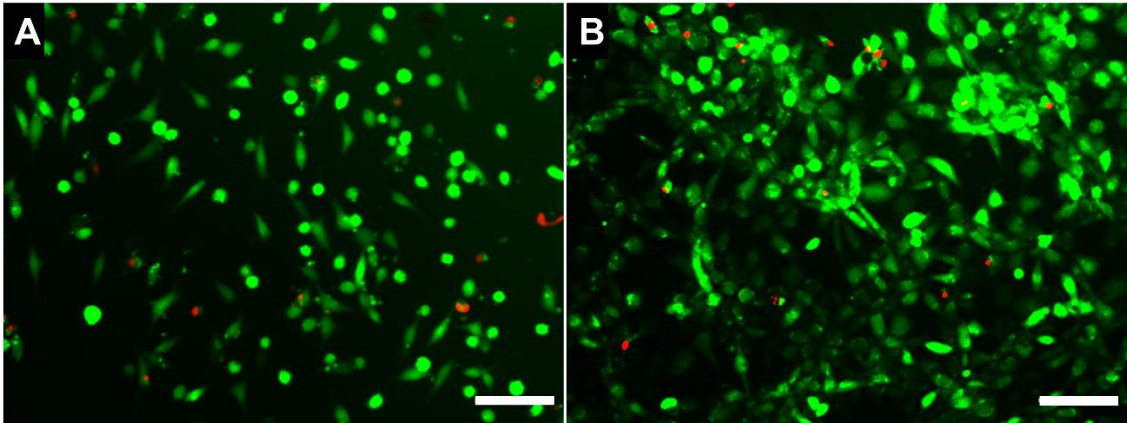
MTT sonuçlarının teyit edilmesi ve hücre morfolojilerinin görüntülenmesi için canlı/ölü 24 ve 72 gün sonundaki canlı/ölü analizi yapılmıştır (Şekil 4.17-Şekil 4.23). Hücre kültür kabının yüzeyinde Alg-PVA, Alg-PVA-PEI0.1, Alg-PVA-PEI1, Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05 ve Alg-PVA/AgNP0.05 gruplarında zamana bağlı olarak yüksek hücre canlılığı elde edildiği ancak MTT ile toksik olarak bildirilen Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05 ve Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1 örneklerde ise yüksek sayıda ölü hücre olduğu izlenmiştir. 1. gün sonunda Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05 ve Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1 gruplarında yüksek sayıda ölü hücre gözlenmişken 3. gün sonunda Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1 grubunda canlı hücre sayısının arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, MTT analizinde elde edilen sonuçları doğrular niteliktedir. Canlı/ölü analiz sonuçları, test edilen her iki zaman diliminde üç boyutlu-gözenekli mikrobaloncuk yapılar üzerinde tutunan hücrenin az olduğunu, canlı hücrelerinin çoğunun kültür kabının yüzeyine tutunduklarını ve normal hücre morfolojisine sahip olduklarını göstermiştir. Yine Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05 ve Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1 gruplarında da tespit edilen ölü hücrelerin büyük çoğunluğunun kültür kabının yüzeyinde olduğu gözlenmiştir. Hücre morfolojileri bakımından incelendiğinde ise, doku iskelesi üzerinde tutunan hücrelerin test edilen her iki zaman diliminde yuvarlak morfolojiye sahip olduğunu, ancak kültür kabı yüzeyinde tutunan hücrelerin uzamış ve fibroblastik morfolojiye sahip olduğunu göstermiştir.

Literatürde, Rezvanian ve ark. yapmış olduğu çalışmada, $CaCl_2$ kullanılarak iyonik olarak çapraz bağlanan sodyum aljinat-pektin hidrojelleri yara iyileşmesinde kullanılmak üzere üretilmiştir. Üretilen hidrojeller farklı zamanlar boyunca (2-20 dakika aralığında) çapraz

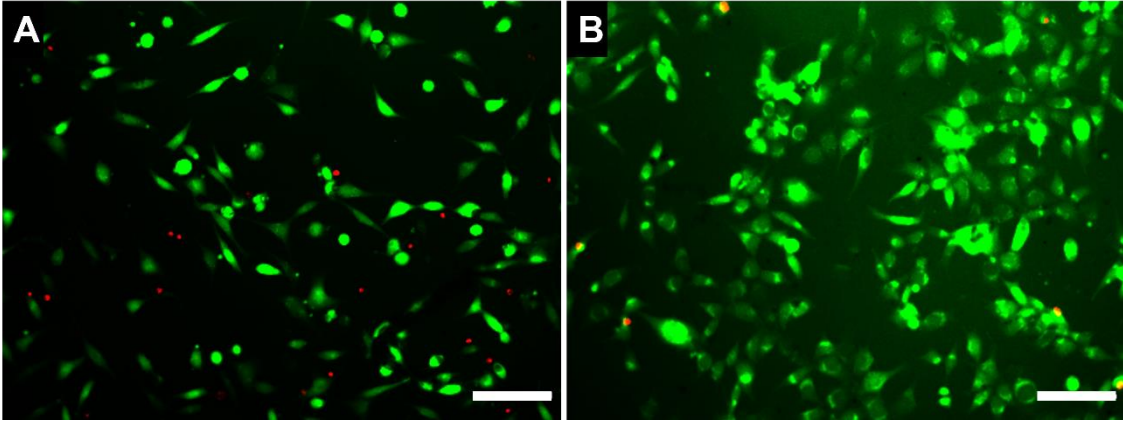
bağlanmıştır [98]. Yapılan çalışmada sunulan tez çalışmasıyla aynı yöntem (canlı/ölü hücre kiti) kullanılarak hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra canlılıkları kontrol edilmiştir ve çapraz bağlanma süresi önemli olmadan tüm gruplar ortalama %75 üzerinde canlılık göstermiştir.



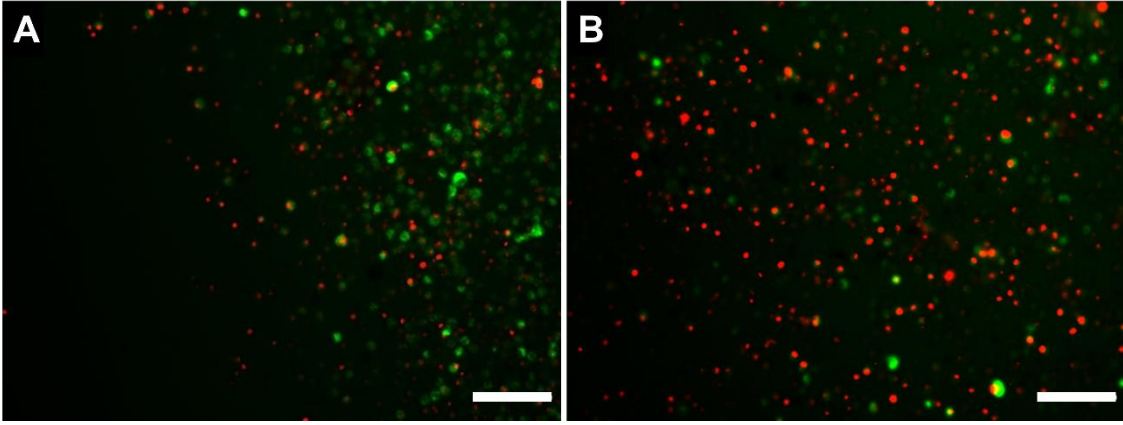
Şekil 4.17. Alg-PVA 3-boyutlu gözenekli mikrobaloncuk yapıların L929 hücre hattı ile yapılan canlı/ölü hücre kültürü testi floresans mikroskop görüntüleri: A) 24 saat, B) 72 saat (ölçek=100 μ m).



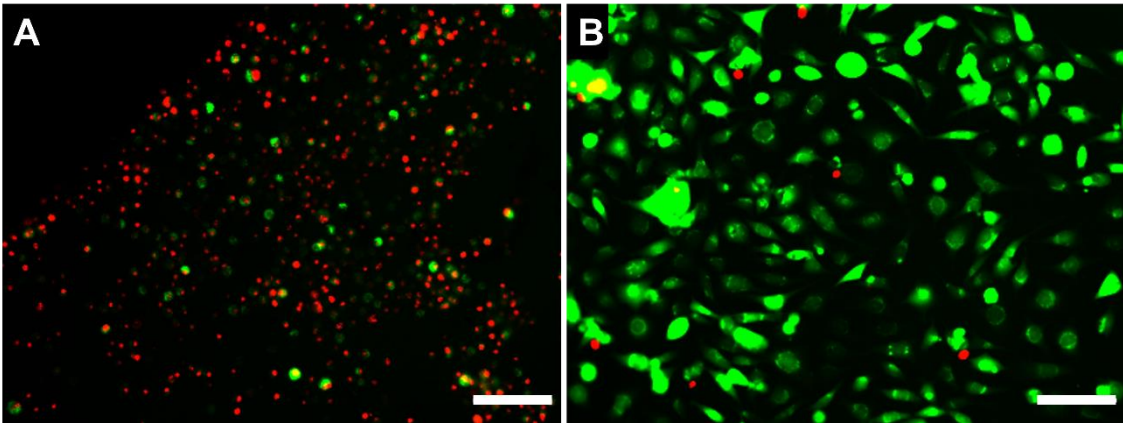
Şekil 4.18. Alg-PVA-PEI0.1 3-boyutlu gözenekli mikrobaloncuk yapıların L929 hücre ile yapılan canlı/ölü hücre kültürü testi floresans mikroskop görüntüleri: A) 24 saat, B) 72 saat (ölçek=100 μ m).



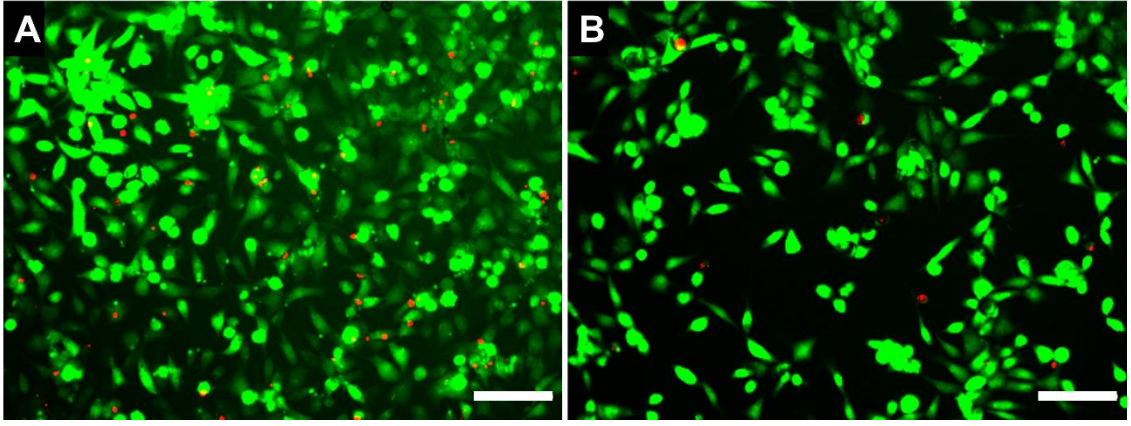
Şekil 4.19. Alg-PVA-PEI1 3-boyutlu gözenekli mikrobaloncuk yapıların L929 hücre hattı kullanılarak yapılan canlı/ölu hücre kültürü testi floresans mikroskop görüntüleri: A) 24 saat, B) 72 saat (ölçek=100 μm).



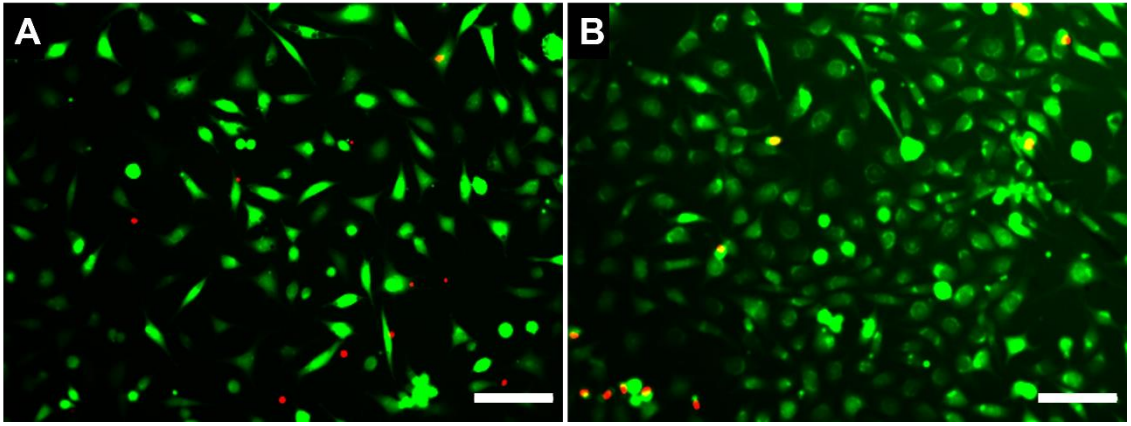
Şekil 4.20. Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05 mikrobaloncuk yapıların L929 hücre hattı kullanılarak yapılan canlı/ölu hücre kültürü testi floresans mikroskop görüntüleri: A) 24 saat, B) 72 saat (ölçek=100 μm).



Şekil 4.21. Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1 mikrobaloncuk yapıların L929 hücre hattı kullanılarak yapılan canlı/ölu hücre kültürü testi floresans mikroskop görüntüleri: A) 24 saat, B) 72 saat (ölçek=100 μm).



Şekil 4.22. Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05 mikrobaloncuk yapıların L929 hücre hattı kullanılarak yapılan canlı/ölü hücre kültürü testi floresans mikroskop görüntüleri: A) 24 saat, B) 72 saat (ölçek=100 μ m).



Şekil 4.23. Alg-PVA/AgNP0.05 mikroakışkan temelli mikrobaloncuk yapıların L929 hücre hattı kullanılarak yapılan canlı/ölü hücre kültürü testi floresans mikroskop görüntüleri a) 24 saat, b) 72 saat (ölçek=100 μ m).

Sonuç olarak elde edilen tüm bulgular değerlendirildiğinde T-bağlantılı mikroakışkan sistem ile hazırlanan mikrobaloncuk yapıların salım profilleri, antibakteriyel aktiviteleri ve toksisiteleri değerlendirildiğinde % 1 oranında PEI ve %0.05 oranında AgNP içeren Alg-PVA-PEI/AgNP örneğinin antibakteriyel etkiye sahip olması ve aynı zamanda hücreler üzerinde toksik bir etki göstermemesi, aynı zamanda uzatılmış gümüş nanopartikül salımı ve yüksek su absorpsiyonu nedeniyle enfekte yaralarda antibakteriyel yara örtüsü olarak kullanım potansiyeline sahiptir.

5. YORUM

Sunulan tez çalışmasında, mikro ve nano boyutlarda üretim sağlayan sürekli akışa dayalı ve geleneksel üretim yöntemlerine göre daha homojen ve sürekli olarak üretim sağlayabilen T-bağlantılı mikroakışkan sistem ile aljinat, PVA ve antibakteriyel özelliğe sahip olan polietilenimin ve gümüş nanopartikül (AgNP) içeren mikrobaloncuk yapılar üretilmiştir. Sentezlenen AgNP'lerin ortalama çap boyut dağılımları 31.63 ± 3.7 nm, PDI değeri 0.11 ve yüzey yükü zeta potansiyel değeri -21.7 ± 9.1 mV olarak belirlenmiştir. Mikrobaloncuk üretiminde şırınga yardımıyla sisteme verilen polimerin ortalama akış hızı $200 \mu\text{L/dk}$ ve kullanılan inert gazın basıncı ise 9L/dk olarak optimize edilmiştir. Sonuç olarak ortalama $90\text{-}175 \mu\text{m}$ por çaplarına sahip mikrobaloncuk yapılar üretilmiştir. AgNP içeren Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.05, Alg-PVA-PEI0.1/AgNP0.1, Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05 ve Alg-PVA/AgNP0.05 yapıların sırasıyla su tutma kapasiteleri %4250, 3879, 3685 ve 3983 ve por çap büyüklükleri sırasıyla 97.3 ± 11 , 133.1 ± 14 , 89.2 ± 14 ve $113.3 \pm 12 \mu\text{m}$ 'dir. Üretilen mikrobaloncuk yapıların yüksek su tutma kapasitesine ve gözenek yapısına sahip olduğu görülmüştür. Üretilen mikrobaloncuk yapılardan AgNP'lerin uzatılmış salım profili sergiledikleri izlenmiştir. Alg-PVA-PEI1/AgNP0.05 örneklerin %105 hücre canlılığına sahip olduğu ve 72 saat sonunda 2605 ppb AgNP salımı gerçekleştiği izlenmiştir. Ancak bu değer üzerindeki AgNP salımının hücre canlılığını olumsuz etkilediği görülmüştür. AgNP içeren örnekler sadece *E. Coli*'ye karşı antibakteriyel etki gösterirken PEI ve AgNP içeren aljinat mikrobaloncuk yapıların gram negatif *E. coli* ve gram pozitif *S. Aureus* ve *methicillin resistant S.aureus (MRSA)* bakterilerine karşı antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde; hazırlanan mikrobaloncuk yapılar içinde % 1 oranında PEI ve %0.05 oranında AgNP içeren Alg-PVA-PEI/AgNP0.05 örneğinin antibakteriyel etkisi, uzatılmış gümüş nanopartikül salımı, yüksek su tutma kapasitesi ve aynı zamanda hücreler üzerinde toksik bir etki göstermemesi nedeniyle antibakteriyel yara örtüsü olarak enfekte ve eksudalı yaralarda kullanım potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] M. Azmin, C. Harfield, Z. Ahmad, M. Edirisinghe, E. Stride, How do microbubbles and ultrasound interact? Basic physical, dynamic and engineering principles, *Current pharmaceutical design*, 18 (2012) 2118-2134.
- [2] A.M. Chow, J.S. Cheung, E.X. Wu, Gas-filled microbubbles—a novel susceptibility contrast agent for brain and liver MRI, 2009 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, IEEE, 2009, pp. 4049-4052.
- [3] S.M. Chowdhury, T. Lee, J.K. Willmann, Ultrasound-guided drug delivery in cancer, *Ultrasonography*, 36 (2017) 171.
- [4] E. Osei, A. Al-Asady, A review of ultrasound-mediated microbubbles technology for cancer therapy: a vehicle for chemotherapeutic drug delivery, *Journal of Radiotherapy in Practice*, 19 (2020) 291-298.
- [5] A. Upadhyay, S.V. Dalvi, Microbubble formulations: synthesis, stability, modeling and biomedical applications, *Ultrasound in medicine & biology*, 45 (2019) 301-343.
- [6] E. Stride, M. Edirisinghe, Novel microbubble preparation technologies, *Soft matter*, 4 (2008) 2350-2359.
- [7] G. Clement, Perspectives in clinical uses of high-intensity focused ultrasound, *Ultrasonics*, 42 (2004) 1087-1093.
- [8] K. Ye, D.L. Kaplan, G. Bao, C. Bettinger, G. Forgacs, C. Dong, A. Khademhosseini, Y. Ke, K. Leong, A. Sambanis, Advanced cell and tissue biomanufacturing, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4 (2018) 2292-2307.
- [9] J. Sun, M. Yin, S. Zhu, L. Liu, Y. Zhu, Z. Wang, R.X. Xu, S. Chang, Ultrasound-mediated destruction of oxygen and paclitaxel loaded lipid microbubbles for combination therapy in hypoxic ovarian cancer cells, *Ultrasonics sonochemistry*, 28 (2016) 319-326.
- [10] C. Bayram, X. Jiang, M. Gultekinoglu, S. Ozturk, K. Ulubayram, M. Edirisinghe, Biofabrication of gelatin tissue scaffolds with uniform pore size via microbubble assembly, *Macromolecular Materials and Engineering*, 304 (2019) 1900394.
- [11] A. Wubneh, E.K. Tsekoura, C. Ayranci, H. Uludağ, Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 80 (2018) 1-30.
- [12] E. Fantino, A. Chiappone, F. Calignano, M. Fontana, F. Pirri, I. Roppolo, In situ thermal generation of silver nanoparticles in 3D printed polymeric structures, *Materials*, 9 (2016) 589.
- [13] P. Ravi, Understanding the relationship between slicing and measured fill density in material extrusion 3D printing towards precision porosity constructs for biomedical and pharmaceutical applications, *3D printing in medicine*, 6 (2020) 1-10.
- [14] M. Elsayed, A. Kothandaraman, M. Edirisinghe, J. Huang, Porous polymeric films from microbubbles generated using a T-junction microfluidic device, *Langmuir*, 32 (2016) 13377-13385.

- [15] M. Gultekinoglu, X. Jiang, C. Bayram, K. Ulubayram, M. Edirisinghe, Honeycomb-like PLGA-b-PEG structure creation with T-Junction microdroplets, *Langmuir*, 34 (2018) 7989-7997.
- [16] J. Xu, S. Li, Y. Wang, G. Luo, Controllable gas-liquid phase flow patterns and monodisperse microbubbles in a microfluidic T-junction device, *Applied Physics Letters*, 88 (2006) 133506.
- [17] M. Elsayed, J. Huang, M. Edirisinghe, Bioinspired preparation of alginate nanoparticles using microbubble bursting, *Materials Science and Engineering: C*, 46 (2015) 132-139.
- [18] M. Zhang, X. Zhao, Alginate hydrogel dressings for advanced wound management, *International Journal of Biological Macromolecules*, (2020).
- [19] F.M. Kievit, O. Veiseh, N. Bhattarai, C. Fang, J.W. Gunn, D. Lee, R.G. Ellenbogen, J.M. Olson, M. Zhang, PEI-PEG-chitosan-copolymer-coated iron oxide nanoparticles for safe gene delivery: synthesis, complexation, and transfection, *Advanced functional materials*, 19 (2009) 2244-2251.
- [20] E.A. Kamoun, E.-R.S. Kenawy, X. Chen, A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings, *Journal of advanced research*, 8 (2017) 217-233.
- [21] W. Li, L. Zhang, X. Ge, B. Xu, W. Zhang, L. Qu, C.-H. Choi, J. Xu, A. Zhang, H. Lee, Microfluidic fabrication of microparticles for biomedical applications, *Chemical Society Reviews*, 47 (2018) 5646-5683.
- [22] Y.K. Jo, D. Lee, Biopolymer microparticles prepared by microfluidics for biomedical applications, *Small*, 16 (2020) 1903736.
- [23] J. Ma, S.M.-Y. Lee, C. Yi, C.-W. Li, Controllable synthesis of functional nanoparticles by microfluidic platforms for biomedical applications—a review, *Lab on a Chip*, 17 (2017) 209-226.
- [24] J.P. Martins, G. Torrieri, H.A. Santos, The importance of microfluidics for the preparation of nanoparticles as advanced drug delivery systems, *Expert opinion on drug delivery*, 15 (2018) 469-479.
- [25] D. Liu, H. Zhang, F. Fontana, J.T. Hirvonen, H.A. Santos, Microfluidic-assisted fabrication of carriers for controlled drug delivery, *Lab on a Chip*, 17 (2017) 1856-1883.
- [26] K.V. Sharp, R.J. Adrian, Transition from laminar to turbulent flow in liquid filled microtubes, *Experiments in fluids*, 36 (2004) 741-747.
- [27] K.Y. Lee, D.J. Mooney, Alginate: properties and biomedical applications, *Progress in polymer science*, 37 (2012) 106-126.
- [28] C.K. Kuo, P.X. Ma, Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties, *Biomaterials*, 22 (2001) 511-521.
- [29] A.D. Augst, H.J. Kong, D.J. Mooney, Alginate hydrogels as biomaterials, *Macromolecular bioscience*, 6 (2006) 623-633.
- [30] Y. Suzuki, Y. Nishimura, M. Tanihara, K. Suzuki, T. Nakamura, Y. Shimizu, Y. Yamawaki, Y. Kakimaru, Evaluation of a novel alginate gel dressing: Cytotoxicity to

fibroblasts in vitro and foreign-body reaction in pig skin in vivo, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, 39 (1998) 317-322.

[31] X. Zhao, N. Huebsch, D.J. Mooney, Z. Suo, Stress-relaxation behavior in gels with ionic and covalent crosslinks, *Journal of applied physics*, 107 (2010) 063509.

[32] J.S. Boateng, K.H. Matthews, H.N. Stevens, G.M. Eccleston, Wound healing dressings and drug delivery systems: a review, *Journal of pharmaceutical sciences*, 97 (2008) 2892-2923.

[33] D. Queen, H. Orsted, H. Sanada, G. Sussman, A dressing history, *International wound journal*, 1 (2004) 59-77.

[34] A. Homayouni, M.R. Ehsani, A. Azizi, M.S. Yarmand, H. Razavi, Effect of lecithin and calcium chloride solution on the microencapsulation process yield of calcium alginate beads, (2007).

[35] T. Fujie, N. Matsutani, M. Kinoshita, Y. Okamura, A. Saito, S. Takeoka, Adhesive, flexible, and robust polysaccharide nanosheets integrated for tissue-defect repair, *Advanced Functional Materials*, 19 (2009) 2560-2568.

[36] I.P.S. Fernando, W. Lee, E.J. Han, G. Ahn, Alginate-based nanomaterials: Fabrication techniques, properties, and applications, *Chemical Engineering Journal*, (2019) 123823.

[37] Q. Borjihan, A. Dong, Design of nanoengineered antibacterial polymers for biomedical applications, *Biomaterials Science*, 8 (2020) 6867-6882.

[38] K.-S. Huang, C.-H. Yang, S.-L. Huang, C.-Y. Chen, Y.-Y. Lu, Y.-S. Lin, Recent advances in antimicrobial polymers: a mini-review, *International journal of molecular sciences*, 17 (2016) 1578.

[39] A.M. Abdelghany, D.M. Ayaad, S.M. Mahmoud, Antibacterial and energy gap correlation of PVA/SA biofilms doped with selenium nanoparticles, *Biointerface Res. Appl. Chem*, 10 (2020) 6236-6244.

[40] F. Croisier, C. Jérôme, Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *European polymer journal*, 49 (2013) 780-792.

[41] S. Naskar, K. Kuotsu, S. Sharma, Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems: a review on two decades of research, *Journal of drug targeting*, 27 (2019) 379-393.

[42] I. Younes, M. Rinaudo, Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications, *Marine drugs*, 13 (2015) 1133-1174.

[43] Z. Chen, Z. Lv, Y. Sun, Z. Chi, G. Qing, Recent advancements in polyethyleneimine-based materials and their biomedical, biotechnology, and biomaterial applications, *Journal of Materials Chemistry B*, 8 (2020) 2951-2973.

[44] I.M. Helander, H.-L. Alakomi, K. Latva-Kala, P. Koski, Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of gram-negative bacteria, *Microbiology*, 143 (1997) 3193-3199.

[45] S.H. Lee, B.-H. Jun, Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine, *International journal of molecular sciences*, 20 (2019) 865.

- [46] E. Abbasi, M. Milani, S. Fekri Aval, M. Kouhi, A. Akbarzadeh, H. Tayefi Nasrabadi, P. Nikasa, S.W. Joo, Y. Hanifehpour, K. Nejati-Koshki, Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties, *Critical reviews in microbiology*, 42 (2016) 173-180.
- [47] S. Shankar, L.F. Wang, J.W. Rhim, Preparations and characterization of alginate/silver composite films: Effect of types of silver particles, *Carbohydr Polym*, 146 (2016) 208-216.
- [48] S. Sharma, P. Sanpui, A. Chattopadhyay, S.S. Ghosh, Fabrication of antibacterial silver nanoparticle—sodium alginate—chitosan composite films, *Rsc Advances*, 2 (2012) 5837-5843.
- [49] Y. Shao, C. Wu, T. Wu, C. Yuan, S. Chen, T. Ding, X. Ye, Y. Hu, Green synthesis of sodium alginate-silver nanoparticles and their antibacterial activity, *International journal of biological macromolecules*, 111 (2018) 1281-1292.
- [50] D. Spadaro, E. Barletta, F. Barreca, G. Curro, F. Neri, PMA capped silver nanoparticles produced by UV-enhanced chemical process, *Applied Surface Science*, 255 (2009) 8403-8408.
- [51] Ž. Jovanović, J. Stojkowska, B. Obradović, V. Mišković-Stanković, Alginate hydrogel microbeads incorporated with Ag nanoparticles obtained by electrochemical method, *Materials Chemistry and Physics*, 133 (2012) 182-189.
- [52] C. Baker, A. Pradhan, L. Pakstis, D.J. Pochan, S.I. Shah, Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles, *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 5 (2005) 244-249.
- [53] N. Durán, P.D. Marcato, R.D. Conti, O.L. Alves, F. Costa, M. Brocchi, Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21 (2010) 949-959.
- [54] M. Kowshik, N. Deshmukh, W. Vogel, J. Urban, S.K. Kulkarni, K. Paknikar, Microbial synthesis of semiconductor CdS nanoparticles, their characterization, and their use in the fabrication of an ideal diode, *Biotechnology and bioengineering*, 78 (2002) 583-588.
- [55] M. Darroudi, M.B. Ahmad, A.K. Zak, R. Zamiri, M. Hakimi, Fabrication and characterization of gelatin stabilized silver nanoparticles under UV-light, *International journal of molecular sciences*, 12 (2011) 6346-6356.
- [56] Q.H. Tran, A.-T. Le, Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4 (2013) 033001.
- [57] J. Yu, X. Zhou, Synthesis of dendritic silver nanoparticles and their applications as SERS substrates, *Advances in Materials Science and Engineering*, 2013 (2013).
- [58] H. Valizadeh, G. Mohammadi, R. Ehyaei, M. Milani, M. Azhdarzadeh, P. Zakeri-Milani, F. Lotfipour, Antibacterial activity of clarithromycin loaded PLGA nanoparticles, *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67 (2012) 63-68.
- [59] X. Dong, X. Ji, H. Wu, L. Zhao, J. Li, W. Yang, Shape control of silver nanoparticles by stepwise citrate reduction, *The Journal of Physical Chemistry C*, 113 (2009) 6573-6576.

- [60] Y. Sun, Y. Xia, Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles, *science*, 298 (2002) 2176-2179.
- [61] A. Haider, I.-K. Kang, Preparation of silver nanoparticles and their industrial and biomedical applications: a comprehensive review, *Advances in materials science and engineering*, 2015 (2015).
- [62] S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji, Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy, *Rsc Advances*, 4 (2014) 3974-3983.
- [63] D.K. Lee, Y.S. Kang, Synthesis of silver nanocrystallites by a new thermal decomposition method and their characterization, *Etri Journal*, 26 (2004) 252-256.
- [64] D.-C. Tien, K.-H. Tseng, C.-Y. Liao, J.-C. Huang, T.-T. Tsung, Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method, *Journal of alloys and compounds*, 463 (2008) 408-411.
- [65] K.-H. Tseng, H.-L. Lee, C.-Y. Liao, K.-C. Chen, H.-S. Lin, Rapid and efficient synthesis of silver nanofluid using electrical discharge machining, *Journal of Nanomaterials*, 2013 (2013).
- [66] C.M. Powers, A.R. Badireddy, I.T. Ryde, F.J. Seidler, T.A. Slotkin, Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12 cells: critical contributions of silver ion, particle size, coating, and composition, *Environmental health perspectives*, 119 (2011) 37-44.
- [67] I. Montes-Burgos, D. Walczyk, P. Hole, J. Smith, I. Lynch, K. Dawson, Characterisation of nanoparticle size and state prior to nanotoxicological studies, *Journal of Nanoparticle Research*, 12 (2010) 47-53.
- [68] K.A. Dawson, S. Anguissola, I. Lynch, The need for in situ characterisation in nanosafety assessment: funded transnational access via the QNano research infrastructure, *Nanotoxicology*, 7 (2012) 346-349.
- [69] M. Gajbhiye, J. Kesharwani, A. Ingle, A. Gade, M. Rai, Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5 (2009) 382-386.
- [70] P. Mukherjee, A. Ahmad, D. Mandal, S. Senapati, S.R. Sainkar, M.I. Khan, R. Parishcha, P. Ajaykumar, M. Alam, R. Kumar, Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis, *Nano letters*, 1 (2001) 515-519.
- [71] G. Li, D. He, Y. Qian, B. Guan, S. Gao, Y. Cui, K. Yokoyama, L. Wang, Fungus-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus terreus*, *International journal of molecular sciences*, 13 (2012) 466-476.
- [72] T. Klaus, R. Joerger, E. Olsson, C.-G. Granqvist, Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (1999) 13611-13614.
- [73] J. Zhang, Y. Zhu, J. Song, J. Yang, C. Pan, T. Xu, L. Zhang, Novel balanced charged alginate/PEI polyelectrolyte hydrogel that resists foreign-body reaction, *ACS applied materials & interfaces*, 10 (2018) 6879-6886.

- [74] G. Suriati, M. Mariatti, A. Azizan, Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method: Effect of reducing agent and surfactant concentration, *International journal of automotive and mechanical engineering*, 10 (2014) 1920.
- [75] T. Dadosh, Synthesis of uniform silver nanoparticles with a controllable size, *Materials letters*, 63 (2009) 2236-2238.
- [76] E. Stride, M. Edirisinghe, Novel preparation techniques for controlling microbubble uniformity: a comparison, *Medical & biological engineering & computing*, 47 (2009) 883-892.
- [77] X. Wang, X. Li, E. Stride, J. Huang, M. Edirisinghe, C. Schroeder, S. Best, R. Cameron, D. Waller, A. Donald, Novel preparation and characterization of porous alginate films, *Carbohydrate polymers*, 79 (2010) 989-997.
- [78] S. Ozturk, R. Shahbazi, N.D. Zeybek, B. Kurum, M. Gultekinoglu, E. Aksoy, M. Demircin, K. Ulubayram, Assessment of electromechanically stimulated bone marrow stem cells seeded acellular cardiac patch in a rat myocardial infarct model, *Biomedical Materials*, (2021).
- [79] S.Y. Seo, G.H. Lee, S.G. Lee, S.Y. Jung, J.O. Lim, J.H. Choi, Alginate-based composite sponge containing silver nanoparticles synthesized in situ, *Carbohydrate polymers*, 90 (2012) 109-115.
- [80] D. Kim, S. Jeong, J. Moon, Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precursor injection, *Nanotechnology*, 17 (2006) 4019.
- [81] S. Raj, S.C. Mali, R. Trivedi, Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Enicostemma axillare* (Lam.) leaf extract, *Biochemical and biophysical research communications*, 503 (2018) 2814-2819.
- [82] B. Ahmad, E. Stride, M. Edirisinghe, Calcium alginate foams prepared by a microfluidic T-junction system: Stability and food applications, *Food and Bioprocess Technology*, 5 (2012) 2848-2857.
- [83] W.D. Araujo Filho, F.K. Schneider, R.E. Morales, Evaluation of stability and size distribution of sunflower oil-coated micro bubbles for localized drug delivery, *Biomedical engineering online*, 11 (2012) 1-14.
- [84] R. Singh, D. Singh, Radiation synthesis of PVP/alginate hydrogel containing nanosilver as wound dressing, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23 (2012) 2649-2658.
- [85] M.C. Straccia, G.G. d'Ayala, I. Romano, P. Laurienzo, Novel zinc alginate hydrogels prepared by internal setting method with intrinsic antibacterial activity, *Carbohydrate polymers*, 125 (2015) 103-112.
- [86] S. Bajpai, S. Sharma, Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions, *Reactive and Functional Polymers*, 59 (2004) 129-140.
- [87] J. Liu, R.H. Hurt, Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids, *Environmental science & technology*, 44 (2010) 2169-2175.

- [88] Y.J. Lee, J. Kim, J. Oh, S. Bae, S. Lee, I.S. Hong, S.H. Kim, Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles, *Environmental toxicology and chemistry*, 31 (2012) 155-159.
- [89] K. Anderson, D. Lonsway, J. Rasheed, J. Biddle, B. Jensen, L. McDougal, R. Carey, A. Thompson, S. Stocker, B. Limbago, Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae, *Journal of clinical microbiology*, 45 (2007) 2723-2725.
- [90] S. Calamak, E.A. Aksoy, N. Ertas, C. Erdogdu, M. Sagiroglu, K. Ulubayram, Ag/silk fibroin nanofibers: Effect of fibroin morphology on Ag⁺ release and antibacterial activity, *European Polymer Journal*, 67 (2015) 99-112.
- [91] M. Mohiti-Asli, B. Pourdeyhimi, E.G. Lobo, Novel, silver-ion-releasing nanofibrous scaffolds exhibit excellent antibacterial efficacy without the use of silver nanoparticles, *Acta biomaterialia*, 10 (2014) 2096-2104.
- [92] D. Jiraroj, S. Tungasmita, D.N. Tungasmita, Silver ions and silver nanoparticles in zeolite A composites for antibacterial activity, *Powder technology*, 264 (2014) 418-422.
- [93] L. Fan, H. Ge, S. Zou, Y. Xiao, H. Wen, Y. Li, H. Feng, M. Nie, Sodium alginate conjugated graphene oxide as a new carrier for drug delivery system, *International journal of biological macromolecules*, 93 (2016) 582-590.
- [94] W.-Y. Chuang, T.-H. Young, C.-H. Yao, W.-Y. Chiu, Properties of the poly (vinyl alcohol)/chitosan blend and its effect on the culture of fibroblast in vitro, *Biomaterials*, 20 (1999) 1479-1487.
- [95] R. Niranjana, M. Kaushik, J. Prakash, K. Venkataprasanna, C. Arpana, P. Balashanmugam, G.D. Venkatasubbu, Enhanced wound healing by PVA/Chitosan/Curcumin patches: In vitro and in vivo study, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 182 (2019) 110339.
- [96] H.S. Mansur, E.d.S. Costa Jr, A.A. Mansur, E.F. Barbosa-Stancioli, Cytocompatibility evaluation in cell-culture systems of chemically crosslinked chitosan/PVA hydrogels, *Materials Science and Engineering: C*, 29 (2009) 1574-1583.
- [97] C.-T. Chiu, J.-S. Lee, C.-S. Chu, Y.-P. Chang, Y.-J. Wang, Development of two alginate-based wound dressings, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19 (2008) 2503-2513.
- [98] M. Rezvanian, N. Ahmad, M.C.I.M. Amin, S.-F. Ng, Optimization, characterization, and in vitro assessment of alginate-pectin ionic cross-linked hydrogel film for wound dressing applications, *International journal of biological macromolecules*, 97 (2017) 131-140.