

**NANOFİBER-DESENLİ POLİMERİK MEMBRANLAR:
YÜZEY KİMYASI, TOPOGRAFİSİ VE HÜCRESEL
ETKİLEŞİMLER**

**NANOFIBER-PATTERNED POLYMERIC MEMBRANES:
SURFACE CHEMISTRY, TOPOGRAPHY AND
CELLULAR INTERACTIONS**

MURAT ŞİMŞEK

Prof. Dr. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

MURAT ŞİMŞEK'in hazırladığı “**Nanofiber-Desenli Polimerik Membranlar: Yüzey Kimyası, Topografisi ve Hücresele Etkileşimler**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP ANABİLİM DALIN**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zakir RZAYEV

Baőkan

.....

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOğLU

Danıőman

.....

Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Üye

.....

Prof. Dr. Mehlika PULAT

Üye

.....

Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıőtir.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Canım aileme...

ETİK

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

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

beyan ederim.

07/01/2014

MURAT ŞİMŞEK

ÖZET

NANOFİBER-DESENLİ POLİMERİK MEMBRANLAR: YÜZEY KİMYASI, TOPOGRAFİSİ VE HÜCRESEL ETKİLEŞİMLER

Murat ŞİMŞEK

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Ocak 2014, 163 sayfa

Sunulan tez çalışması iki ana hedef doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İlk kısımda, elektroöğirme yöntemiyle üretilen farklı fiziksel ve kimyasal yapıya sahip nanofiberlerle farklı kimyasal yapıdaki polimerik membranların desenlenmesi ve elde edilen sonuçların hücre-nanotopografi ilişkisi açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır. İkinci kısımda ise elektroöğirmeyle üretilen nanofiberlerle implant yüzeylerin kaplanması ve kaplanmış yüzeylerin hayvansal hücre/bakteri tutunabilirliğine olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmasının ilk kısmı için, çözücü döküm yöntemi ile çapraz bağlı kitosan ve polikaprolakton (PCL) membranlar hazırlanmıştır. Membranların farklı fiziksel yapıdaki PCL ve PCL/kollajen nanofiberlerle desenlenmesi amacıyla elektroöğirme koşulları optimize edilmiştir. Kitosan membranlar 205 ± 65 nm ve 550 ± 190 nm çapa sahip PCL fiberlerle ve 480 ± 20 nm çapa sahip PCL/kollajen fiberlerle gelişigüzel düzende desenlenmiştir. Kitosan membranların hizalanmış düzende fiberlerle desenlenmesi 385 ± 62 nm çapındaki PCL ve 276 ± 105 nm çapındaki PCL/kollajen fiberlerle gerçekleştirilmiştir. PCL membranların gelişigüzel ve hizalanmış düzende desenlenmesi ise sırasıyla 211 ± 70 nm ve 228 ± 43 nm çapında PCL fiberlerle sağlanmıştır.

Desenlenmiş membranlar üzerinde nanotopografi-hücre etkileşimlerinin araştırılmasına yönelik olarak preosteoblast MC3T3-E1 ve MDBK (Madine Darby Bovine Kidney) hücreleri ile durgun ortamda hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı ve üremesi MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analizi ile takip edilmiş ve hücre morfolojileri SEM ve

konfokal mikroskopu ile incelenmiştir. Analiz sonuçlarına göre, hücreler hizalanmış düzendeki fiberlerin yöneliminden etkilenerek morfolojilerini değiştirmişlerdir. Hücrelerin hizalanmış düzendeki desenler yönünde yönelerek sitoplazmalarında oldukça uzun ve düzenli organize yapıda aktin demetleri oluşturdukları görülmüştür. Ayrıca çap artışına bağlı olarak hücrelerin morfolojisi gelişigüzel desenlerden de etkilenmiştir. Matrislerde kollajenin varlığı yüzeye yayılan hücre alanında artışa neden olmuştur.

Tezin ikinci kısmı için, titanyum (Ti) implantların elektroçirme ile üretilmiş polietilen oksit (PEO) nanofiberlerle kaplanmasına yönelik olarak optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Üretilen fiberler SEM ile analiz edilerek uygun üretim koşulları belirlenmiştir. *In-vitro* koşullarda fiberlerin çözünmemelerini sağlamak amacıyla çeşitli çapraz bağlanma işlemleri gerçekleştirilmiştir. En uygun çapraz bağlama koşulu şişme deneyleri ve FTIR-ATR analizi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Ti yüzeyler, %10 PETA (pentaeritrol triakrilat) (w/w) içeren PEO fiberlerle kaplanmıştır. Kaplanmış yüzeyler 37°C'de 8 günlük kuruma işlemi sonrasında ultraviyole ışık kaynağı ile muamele edilerek fiberlerin çapraz bağlanması sağlanmıştır. Ti yüzeyler olarak pürüzlendirilmiş (Ti-p) ve pürüzlendirilmemiş (Ti-y) implantlar kullanılmıştır. Kaplama öncesi ve sonrası Ti yüzeylerin karakterizasyonu SEM, AFM, pertometre ve su temas açısı ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonrası Ti-y yüzeylerdeki fiberlerin çapı 184±48 nm, Ti-p yüzeyindekilerin çapı ise 175±50 nm olarak hesaplanmıştır. Kaplama sonrası yüzeyler daha hidrofilik hale gelmiştir. Fiberler Ti-p yüzeylere daha kararlı bir şekilde tutunmuşlardır.

PEO kaplı Ti yüzeylerin hücreyel tutunmaya olan etkisinin incelenmesi için MC3T3-E1 hücreleri ve *S. epidermidis* bakterileri ile durgun ortamda kültür çalışmaları yapılmıştır. Hücre canlılığı ve üremesi MTT ile takip edilmiş, hücre/bakteri tutunabilirliği SEM ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde, PEO fiber kaplı Ti yüzeylerde yapışma önemli ölçüde azalmışken, kaplanmamış yüzeylerin hücre/bakteri üremesini desteklediği belirlenmiştir.

Tüm bu sonuçlar ışığında, elektroçirme yönteminin polimerik biyomalzemelerde nanotopografik desen oluşturulması ve metal implant kaynaklı enfeksiyon riskinin minimize edilmesi için "etkin bir kaplama yöntemi" olarak kullanılabileceği yorumu yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: elektroçirme, nanofiber, desenleme, nanotopografi, PCL, nanofiber kaplama, PEO, titanyum, bakteriyel yapışma.

ABSTRACT

NANOFIBER-PATTERNED POLYMERIC MEMBRANES: SURFACE CHEMISTRY, TOPOGRAPHY AND CELLULAR INTERACTIONS

Murat ŞİMŞEK

**Doctor of Philosophy, Nanotechnology and Nanomedicine
Division**

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

January 2014, 163 pages

In the presented study, two main aims were purposed. The first aim was to pattern polymeric membranes which have different chemistry by chemically and physically different nanofibers produced via electrospinning technique and to investigate cellular behaviour on patterned membranes for cell-nanotopography interactions. The second aim was to investigate animal cell/bacterial attachment on implant surfaces coated by electrospun nanofibers.

For the first part, chitosan and polycaprolactone (PCL) membranes were prepared by solvent casting method. Electrospinning conditions were optimized for patterning of membranes by PCL and PCL/collagen nanofibers in different physically form. Chitosan membranes were patterned by random PCL fibers with diameters of 205 ± 65 nm or 550 ± 190 nm and random PCL/collagen fibers with diameter of 480 ± 20 nm. They were also patterned by aligned PCL and PCL/collagen fibers with diameter of 385 ± 62 and 276 ± 105 nm, respectively. Patterning of PCL membranes was realised by random and aligned PCL fibers with diameters of 211 ± 70 nm and 228 ± 43 nm, respectively.

Cell-culture studies were performed under static conditions by using preosteoblastic MC3T3-E1 and epithelial MDBK (Madine Darby Bovine Kidney) cell lines to investigate nanotopography-cell interactions on patterned surfaces. Cell viability and proliferation were analyzed by MTT assay and morphological examination was done with SEM and confocal microscope. Results showed both cells were affected significantly by aligned fiber orientation. The fibers of the actin filament tend to align along the fiber direction forming long and highly organized

actin bundles in the cytoplasm. Randomly oriented patterns also affected the cell morphology owing to an increase in fiber diameter. In the presence of PCL/collagen patterns, the spreading area of cells was increased.

In the second part, polyethylene oxide (PEO) nanofibers were prepared by electrospinning for coating titanium (Ti) implants with nanofibers. Characterization of fibers was done by SEM. Crosslinking procedures were carried out to obtain insoluble PEO fibers under *in-vitro* conditions. Optimum crosslinking condition were determined by swelling experiments and ATR-FTIR analysis. As a result, Ti surfaces were coated by fibers including 10% (w/w) crosslinker PETA (pentaerythritol triacrylate). After drying for 8 days in 37°C, coated surfaces were placed under UV light to crosslink fibers. Roughened (Ti-p) and smooth (Ti-y) Ti surfaces were used for coating.

Characterization of Ti surfaces before/after coating was done by SEM, atomic force microscopy, perthometer and water contact angle measurements. Hydrophilicity of both surfaces was improved after coating. SEM results revealed that fiber diameters on coated Ti-y and Ti-p were 184 ± 48 nm and 175 ± 50 nm, respectively. Fibers on Ti-p exhibited more stable attachment than the ones on Ti-y.

To investigate the effect of PEO coated surfaces on adhesion of MC3T3-E1 cells and *S. epidermidis* bacteria, cell-culture studies were performed under static conditions. Cell viability and proliferation were analyzed by MTT assay and examination of attachment of the cells/bacteria was done by SEM. In conclusion, coated surfaces inhibited cellular attachment significantly, whereas proliferation of cells/bacteria was supported by uncoated surfaces.

In conclusion, electrospinning technique can be used as “an effective coating method” for creating patterns on polymeric biomaterials and minimizing infection risk of metallic implant.

Keywords: electrospinning, nanofiber, patterning, nanotopography, PCL, nanofiber coating, PEO, titanium, bacterial adhesion.

TEŞEKKÜR

Engin bilgi birikimi ve tecrübesi ile tezimin başlangıcından sonuna kadar geçen yorucu fakat son derece zevkli yolculuğumda benden hiçbir desteğini esirgemeyen, eşsiz akademik vizyonu sayesinde doktora eğitimim boyunca bana kalıcı değerler kazandıran, çok değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu**'na,

Tezimin çeşitli aşamalarında yer alarak bu tezin tamamlanmasında çok değerli katkıları olan değerli hocam **Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ**'ye, sevgili arkadaşlarım **Merve Çapkın YURTSEVER**'e, **Sevcan Dalkıranoğlu ALDEMİR**'e ve **Soner ÇAKMAK**'a,

Birlikte çalışma duygusunu mutluluk ve sevgiye dönüştürerek çalışmalarımı coşku içinde yürütmemi sağlayan ve ihtiyaç duyduğum her anda desteklerini ve bilgilerini benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarım **T. Tolga DEMİRTAŞ**'a, **Anıl Sera ÇAKMAK**'a, **Işıl Gerçek BEŞKARDEŞ**'e, **Damla Çetin ALTINDAL**'a, **Ekin Özge TUNÇAY**'a, **Müşra ZEREN**'e, **Gökçe KAYNAK**'a, **Gülseren IRMAK**'a,

Hayatıma girdiği andan itibaren sevgisiyle, anlayışıyla ve sabrıyla beni desteklemeyi hiç kesmeyen hayat arkadaşım **Sibel**'e, çalışma azmimin en önemli kaynağı, hayatımızın en nadide çiçeği kızım **İrmak**'a, beni ben yapan, katkıları ve emekleri paha biçilemez **anneme, babama** ve kardeşim **Dilek**'e,

Gerek tez çalışmam kapsamındaki 110M381 no'lu proje ile gerekse 109M228, 11S120, 112M021 ve 112M705 nolu projeler ile eğitim sürem boyunca bana maddi destek sağlayan **TÜBİTAK**'a,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER.....	xi
KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Doku Mühendisliği.....	4
2.1.1. Doku Mühendisliği İçin Biyomalzemeler.....	4
2.1.1.1. Doğal polimerler.....	5
2.1.1.2. Sentetik polimerler.....	8
2.1.2. Nanotopografinin Doku Mühendisliği Açısından Önemi.....	10
2.1.3. Nanofabrikasyon Teknikleri.....	11
2.1.3.1. Fotolitografi.....	13
2.1.3.2. Dip-pen nanolitografi.....	13
2.1.3.3. Elektron demeti litografisi.....	14
2.1.3.4. Polimer karışımları.....	15
2.1.3.5. Faz ayrımı.....	15
2.1.3.6. Kolloidal litografi.....	15
2.1.3.7. Kimyasal kazıma.....	16
2.1.3.8. Plazma litografi.....	16
2.1.3.9. Elektroeğirme.....	16
2.1.4. Nanotopografik Yüzey-Hücre Etkileşimleri.....	26
2.1.4.1. İntegrinler ve integrinler aracılığı ile hücre yapışması.....	27
2.1.4.2. Nanotopografi-hücre etkileşimini inceleyen çalışmalar.....	29
2.2. Biyomedikal İmplantlar.....	32
2.2.1. Titanyum İmplantlar.....	33
2.2.1.1. Titanyum implantların kullanımlarına bağlı olarak ortaya çıkan sorunlar.....	34
2.2.2. Titanyum İmplantların Modifikasyonu.....	38

2.2.2.1. Titanyum implantların PEO/PEG ile modifikasyonu	39
2.2.2.2. PEO kaplı titanyum implantlarda bakteriyel yapışma	42
2.2.2.3. PEO kaplı titanyum implantların dokuyla entegrasyonu	42
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	44
3.1. Kitosan ve PCL Membranların Elektroeğirilmiş PCL ve PCL/Kollajen Nanofiberlerle Desenlenmesi, Karakterizasyon ve Hücre Kültür Çalışmaları	44
3.1.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler	44
3.1.2. Çapraz Bağlı Kitosan Membranların Hazırlanması.....	45
3.1.3. Kitosan Membranların Elektroeğirme ile Desenlenmesi	45
3.1.3.1. Kitosan membranların kitosan nanofiberler ile desenlenmesi.....	46
3.1.3.2. Kitosan membranların polikaprolakton nanofiberler ile desenlenmesi	46
3.1.3.3. Kitosan membranların polikaprolakton/kollajen nanofiberler ile desenlenmesi	48
3.1.4. Polikaprolakton Membranların Hazırlanması.....	48
3.1.5. Polikaprolakton Membranların Polikaprolakton Nanofiberler ile Desenlenmesi.....	48
3.1.6. Kitosan ve Polikaprolakton Yüzeylerin Karakterizasyonu	49
3.1.7. Hücre Kültür Çalışmaları	49
3.1.7.1. Çalışmalarda kullanılan hücre hatları	49
3.1.7.2. Kitosan ve polikaprolakton yüzeyler ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları	49
3.1.8. İstatistiksel Analiz	51
3.2. Polietilen Oksit Nanofiberler ile Titanyum Yüzeylerin Kaplanması ve Hayvansal Hücre/Bakteri Kültürleri.....	51
3.2.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler	52
3.2.2. PEO Nanofiberlerin Üretimi ve Çapraz Bağlanması	52
3.2.3. Çapraz Bağlı PEO Nanofiberler ile Şişme Deneyleri	57
3.2.4. Çapraz Bağlı PEO Nanofiberlerin Karakterizasyonu	58
3.2.5. PEO Nanofiberler ile Titanyum Yüzeylerin Kaplanması.....	58
3.2.6. Titanyum Yüzeylerin Karakterizasyonu	58
3.2.7. Hücre ve Bakteri Kültürü Çalışmaları.....	59
3.2.7.1. Hücre yapışmasının ve üremesinin incelenmesi	59
3.2.7.2. Bakteriyel yapışmanın incelenmesi	60
4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	61
4.1. PCL ve PCL/kollajen Nanofiber Desenli Yüzeyler ve Nanotopografi-Hücre Etkileşiminin İncelenmesi	61

4.1.1. Çapraz Bağlı Kitosan Membranların Hazırlanması, Elektroğirme Tekniği ile Desenlenmesi ve Karakterizasyon Çalışmaları	62
4.1.1.1. Çapraz bağlı kitosan membranların hazırlanması	63
4.1.1.2. Kitosan membranları kitosan nanofiberler ile desenlenmesi.....	66
4.1.1.3. Kitosan membranların polikaprolakton nanofiberler ile desenlenmesi	68
4.1.1.4. Kitosan membranların polikaprolakton/kollajen nanofiberler ile desenlenmesi	78
4.1.2. Polikaprolakton Membranların Hazırlanması, Elektroğirme ile Desenlenmesi ve Desenlenmiş Yüzeylerin Karakterizasyonu	81
4.1.2.1. Polikaprolakton membranların hazırlanması	82
4.1.2.2. Polikaprolakton membranların polikaprolakton nanofiberler ile desenlenmesi	82
4.1.3. Hücre Kültür Çalışmaları	86
4.1.3.1. Membran kimyasının etkisi	88
4.1.3.2. Kitosan membrandaki farklı desen özelliklerinin etkisi.....	92
4.2. PEO Fiberler ile Yürütölen Çalışmalar.....	101
4.2.1. PEO Nanofiberlerin Üretimi ve Karakterizasyonu	101
4.2.1.1. $M_v:400,000 \text{ g mol}^{-1}$ molekül ağırlığındaki PEO'dan nanofiber üretimi..	101
4.2.1.2. $M_v:600,000 \text{ g mol}^{-1}$ molekül ağırlığındaki PEO'dan nanofiber üretimi.	108
4.2.2. PEO Nanofiberlerin Çapraz Bağlanması	115
4.2.3. Çapraz Bağlı PEO Nanofiberlerin Karakterizasyonu	119
4.2.3.1. Çapraz bağlı PEO nanofiberler ile şişme çalışmaları.....	120
4.2.4. Çapraz Bağlı PEO Nanofiberler ile Titanyum Yüzeylerin Kaplanması ve Yüzey Karakterizasyonu.....	127
4.2.4.1. SEM ve AFM analizleri	128
4.2.4.2. Su temas açısı ölçümleri	133
4.2.4.3. Hücre/bakteri kültürü çalışmaları	133
KAYNAKLAR.....	141
EK	158
ÖZGEÇMİş	161

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2. 1. Nanodesenleme yöntemleri, avantajları ve dezavantajları	12
Çizelge 2. 2. Elektroēğirmede sıklıkla kullanılan bazı çözücülere ait dielektrik sabitleri.....	21
Çizelge 2. 3. Elektroēgrilmiş fiber örgü yüzeylerinde oluşan hücresele cevaplar ...	25
Çizelge 2. 4. Nanotopografik detaylara verilen hücresele cevaplar	32
Çizelge 2. 5. Ti implant yüzeylerinin modifiye edilmesinde kullanılan yöntemler ..	39
Çizelge 2. 6. PEO'nun bazı uygulama alanları	41
Çizelge 3. 1. Kitosan nanofiberlerin üretimi için incelenen sistem parametreleri .	46
Çizelge 3. 2. PCL nanofiberlerin üretimi için incelenen sistem parametreleri. a) Gelişigüzel düzende ve b) Hizalanmış düzende desenleme parametreleri	47
Çizelge 3. 3. PCL/Col nanofiberlerin üretimi için incelenen sistem parametreleri.	48
Çizelge 3. 4. PEO nanofiberlerinin üretimi için incelenen parametreler.....	53
Çizelge 3. 5. PEO nanofiberlerin kimyasal yolla çapraz bağlanması için incelenen parametreler	54
Çizelge 3. 6. Bp içeren örneklerin UV300 ışık kaynağı ile çapraz bağlanabilmesi için incelenen parametreler. a) Membran formda ve b) Fiber formda incelenen parametreler	55
Çizelge 3. 7. PEO membranların ve fiberlerin Bp ve PETA varlığında UV12 ışık kaynağı ile çapraz bağlanabilmesi için incelenen parametreler.....	56
Çizelge 3. 8. PETA içeren PEO nanofiberlerin UV12 öncesi ve sonrasında şişme davranışlarının belirlendiğı koşullar	57
Çizelge 4. 1. Çapraz bağlı kitosan membrana ait FTIR-ATR spektrum verileri ve değerlendirmesi.....	65
Çizelge 4. 2. Çizelge 4. 2. Çapraz bağlı CS ve PCL membranlar üzerine desenlenmiş PCL ve PCL/Col nanofiberlerin üretim koşulları ve çap değerleri....	85
Çizelge 4. 3. Çalışmalarda kullanılacak örnekler ve kısaltmaları.....	85
Çizelge 4. 4. Desenlenmiş yüzeylerdeki hücresele cevapların hücresele morfoloji ile karşılaştırılması	100
Çizelge 4. 5. %6 PEO (w/v) derişiminden elde edilen nanofiberlere ait çalışma koşulları ve fiber çapları	103

Çizelge 4. 6. %8 PEO (w/v) derişiminden elde edilen nanofiberlere ait çalışma koşulları ve fiber çapları	105
Çizelge 4. 7. %4 PEO (w/v) derişiminden elde edilen nanofiberlere ait çalışma koşulları ve fiber çapları	108
Çizelge 4. 8. %5 PEO (w/v) derişiminden elde edilen nanofiberlere ait çalışma koşulları ve fiber çapları	111
Çizelge 4. 9. Çalışmalarda kullanılacak örnekler ve kısaltmaları	128

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2. 1. a) Kitinin ve b) Kitosanın kimyasal yapısı	6
Şekil 2. 2. Kollajenin a) Moleküler ve b) Üçlü heliks yapısı.....	7
Şekil 2. 3. a) Macaque maymununun korneal epitel bazal membranının SEM görüntüsü, b) İnsan kornea dokusunun TEM görüntüsü, c) İskelet kasının ve d) Kemiğin hiyerarşik yapısının şematik gösterimi.....	11
Şekil 2. 4. Fotolitografinin şematik gösterimi	13
Şekil 2. 5. Dip-pen nanolitografinin şematik gösterimi	14
Şekil 2. 6. Elektron demeti litografisinin şematik gösterimi	14
Şekil 2. 7. Kolloidal litografinin şematik gösterimi	16
Şekil 2. 8. Taylor konisi oluşumunun zamana bağlı olarak şematik gösterimi	18
Şekil 2. 9. Basit bir elektroçirme düzeneği.....	18
Şekil 2. 10. Elektroçirme işleminde oluşabilen whipping kararsızlık halleri	19
Şekil 2. 11. a) Düşük viskozitede çözücü molekülleri yüzey geriliminin etkisiyle bir araya gelirler. b) Yüksek viskozitede çözücü molekülleri bir araya gelmiş polimer zincirleri arasında dağılmıştır.....	20
Şekil 2. 12. Elektroçirme ile elde edilmiş çeşitli formlarda fiberler. a) Gelişigüzel düzenlenmiş polivinilprolidon (PVP) nanofiberler, b) Hizalanmış PCL fiberler, c) PGA fiberler, d) Tek kanallı PVP/titanyum dioksit ve e) Çok kanallı PVP/ titanyum dioksit fiberler	23
Şekil 2. 13. İntegrin molekülleri ile lipid tabakasının her iki yanında bulunan proteinlerin etkileşimini ifade eden fokal yapışmanın şematik gösterimi.....	28
Şekil 2. 14. Titanyum ve alaşımlarının uygulamaları. a) Yapay diş, b) Yapay kalça protezi, c) Yapay kalp kapakçığı ve d) Yapay vasküler stentler.....	33
Şekil 2. 15. Saf titanyum yüzeyindeki oksit filmin şematik gösterimi (*Ti (IV): çok değerlikli katyon)	34
Şekil 2. 16. Hücre yapışmasında rol alan fizikokimyasal kuvvetler arasındaki boyutsal etkileşimler	36
Şekil 2. 17. Biyofilm oluşum süreci (*EPS: hücre dışı polisakkarit tabakası)	37
Şekil 2. 18. Bakteriyel yapışmayı belirleyen faktörler	37
Şekil 2. 19. a) PEO'nun kimyasal yapısı, b) ve c) Molekül ağırlıklarına göre değişen PEG/PEO polimerinin fiziksel görünümü.....	40

Şekil 2. 20. Polimer zincirlerinin a) Mantar etkisi ve b) Fırça etkisini ifade eden şematik gösterim	41
Şekil 4. 1. a) Kitosan membranların üretim şeması ve b) Kitosandaki grupların NaOH ile muamelesi sonrasındaki durumu	64
Şekil 4. 2. Çapraz bağlı kitosan membrana ait FTIR-ATR spektrumu	65
Şekil 4. 3. a) Gelişigüzel sarmal şeklinde dolanmış polimer molekülü ve b) Polielektrolitin çözücü ortamındaki durumu	66
Şekil 4. 4. 1.2 mL sa ⁻¹ akış hızında üretilen CS fiberlerin CS membrandaki SEM görüntüleri. (a) %2 (w/v) CS, 10 cm, 22 kV (10 KX); %2.7 (w/v) CS, 6.4 cm b) 20 kV, c) 21 kV, d) 22 kV, e) 23 kV ve f) 24 kV (1 KX, sağ üst görüntüler 5 KX).....	67
Şekil 4. 5. %12 PCL (w/v, DCM/DMF, 50/50) çözeltilisinden elde edilen PCL fiberlerin SEM görüntüleri. a) 5 KX ve b) 40 KX	70
Şekil 4. 6. %8 PCL (w/v, HFIP) derişiminden farklı akış hızlarda üretilen fiberlerin lameldeki i-mikroskop görüntüleri (40X). 12 kV, 10 cm a) 0.1 mL sa ⁻¹ ; b) 2 mL sa ⁻¹	70
Şekil 4. 7. %10 PCL (w/v, HFIP) derişiminden 0.6 mL sa ⁻¹ akış hızında üretilen fiberlerin lameldeki i-mikroskop görüntüleri (40X). 8 kV a) 6 cm, b) 10 cm, c) 20 cm, d) 22 cm. CS membrandaki SEM görüntüleri; 22 cm e) 18 kV (1 KX, sağ üst görüntü 10 KX) ve f) 20 kV (1 KX, sağ üst görüntü 5 KX).....	72
Şekil 4. 8. %10 PCL (w/v, HFIP) derişiminden 2 mL sa ⁻¹ akış hızında üretilen fiberlerin lameldeki i-mikroskop (40X) ve SEM görüntüleri. a) 6 cm, 8 kV; b) 7 cm, 13 kV; 10 cm c) 7 kV, d) 11 kV (500X, sağ üst görüntü 5 KX), e) 15 kV; f) 20 cm, 20 kV	73
Şekil 4. 9. %10 PCL (w/v, HFIP) derişiminden, 4 mL sa ⁻¹ , 20 cm ve 20 kV koşuluyla elde edilen gelişigüzel düzendeki fiberlerin CS membrandaki SEM görüntüleri, a) 1 KX, b) 2 KX; 12 mL sa ⁻¹ , 35 cm, 22.5 kV koşulundaki SEM ve AFM görüntüleri c) 2 KX, d) 10 KX, e) 2-boyutlu f) 3-boyutlu.....	74
Şekil 4. 10. Hizalanmış düzendeki fiberlerin üretilmesinde kullanılan toplayıcılara örnekler. a) Tekerlek tipi, b) Silindirik, c) Paralel ızgaralı döner toplayıcı ve d) Paralel elektrodlu toplayıcı	75
Şekil 4. 11. %10 PCL (w/v, HFIP)'den üretilen hizalanmış düzendeki fiberlerin lameldeki i-mikroskop (40X) ve CS membrandaki SEM görüntüleri. 2 mL sa ⁻¹ , 18 kV a) 20 cm, b) 18 cm; c) 15 kV, 12 cm; 11 kV, 10 cm d) 2,400 rpm, e) 2,000 rpm; 1.5 mL sa ⁻¹ f) 18 kV, 18 cm (2,400 rpm, sağ üst görüntüler 1 KX).....	76
Şekil 4. 12. %10 PCL (w/v, HFIP), 0.1 mL sa ⁻¹ , 11 kV, 10 cm (2,400 rpm) koşulundan elde edilen hizalanmış düzendeki fiberlerin lameldeki i-mikroskop ve CS membrandaki SEM ve AFM görüntüleri. a) 40X, b) 1 KX, c) 5 KX; d) 2-boyutlu ve e) 3-boyutlu.....	77

Şekil 4. 13. %8 PCL/Col (w/v, HFIP)'den üretilen gelişigüzel düzendeki fiberlerin lameldeki i-mikroskop (40X) ve CS membrandaki SEM görüntüleri. a) 0.5 mL sa ⁻¹ , 20 cm, 20 kV; b) 0.75 mL sa ⁻¹ , 13 cm, 12 kV; c) 2 mL sa ⁻¹ , 13 cm, 15 kV; d) 3 mL sa ⁻¹ , 13 cm, 15 kV; 3 mL sa ⁻¹ , 10 cm, 20 kV e) 2 KX ve f) 5 KX	79
Şekil 4. 14. PCL ve PCL/Col fiberlere ait FTIR-ATR spektrumu	80
Şekil 4. 15. %8 PCL/Col (w/v, HFIP) çözeltilisinden üretilen hizalanmış düzendeki fiberlerin lameldeki i-mikroskop ve CS membrandaki SEM görüntüleri (2,400 rpm). a) 3 mL sa ⁻¹ , 13 cm, 15 kV (40X); b) 0.5 mL sa ⁻¹ , 20 cm, 20 kV (40X); 0.1 mL sa ⁻¹ 10 cm, 11 kV c) 40X, d) 1 KX (sağ üst görüntü 5 KX).....	81
Şekil 4. 16. PCL membranlara ait SEM görüntüleri. a) Membranın havaya bakan yüzü ve b) Membranın Petri'ye bakan yüzü (2 KX)	82
Şekil 4. 17. %10 PCL (w/v, HFIP), 12 mL sa ⁻¹ , 35 cm ve 22.5 kV koşulunda PCL membranlara gelişigüzel düzende desenlenmiş nanofiberlerin SEM görüntüleri. a) 5 KX ve b) 10 KX.....	83
Şekil 4. 18. %10 PCL (w/v, HFIP), 0.1 mL sa ⁻¹ , 10 cm, 11 kV koşulunda PCL membrana desenlenmiş hizalanmış düzendeki nanofiberlerin SEM görüntüleri. a) 2 KX ve b) 10 KX.....	84
Şekil 4. 19. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS ve PCL membranlara ait SEM görüntüleri. a) CSm:PCL-G1, b) CSm:PCL-G2, c) CSm:PCL-H, d) CSm:PCL/Col-G, e) CSm:PCL/Col-H, f) CS membran, g) PCLm:PCL-G1, h) PCLm:PCL-H, i) PCL membran	86
Şekil 4. 20. Kristal viyole ile boyanmış MC3T3-E1 ve MDBK hücrelerinin i-mikroskop görüntüleri (40X)	87
Şekil 4. 21. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS membranlardaki a) MC3T3-E1 ve b) MDBK hücrelerinin 24., 48., ve 96. saatte MTT ile değerlendirilen mitokondriyal aktiviteleri (★★★p<0.001, ★★p<0.01).....	88
Şekil 4. 22. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS ve PCL membranlardaki MC3T3-E1 hücrelerinin 2 (a, b, e, f, i ve j) ve 12 (c, d, g, h, k ve l) saatlik hücre kültüründeki SEM görüntüleri. (a ve c) CSm:PCL-G1, (b ve d) PCLm:PCL-G1, (e ve g) CSm:PCL-H, (f ve h) PCLm:PCL-H, (i ve k) CS membran ve (j ve l) PCL membran yüzeylerindeki hücreler.....	89
Şekil 4. 23. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS ve PCL membranlardaki MDBK hücrelerinin 2 (a, b, e, f, i ve j) ve 12 (c, d, g, h, k ve l) saatlik hücre kültüründeki SEM görüntüleri. (a ve c) CSm:PCL-G1, (b ve d) PCLm:PCL-G1, (e ve g) CSm:PCL-H, (f ve h) PCLm:PCL-H, (i ve k) CS membran ve (j ve l) PCL membran yüzeylerindeki hücreler.....	91
Şekil 4. 24. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS membrandaki MC3T3-E1 hücrelerinin hücre kültürünün 2. ve 12. saatindeki SEM görüntüleri. (a ve b) CSm:PCL-G2'deki hücreler (oklar <i>lamelliapodia</i> ve uzamış <i>filopodia</i> 'yı göstermektedir); (c ve d) CSm:PCL/Col-G'deki hücreler; (e ve f) CSm:PCL/Col-H'deki hücreler (oklar iki hücre arasındaki köprüyü göstermektedir)	93

- Şekil 4. 25. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS membrandaki MC3T3-E1 hücrelerinin 12. saatteki konfokal mikroskobu görüntüleri. a) CSm:PCL-G2, b) CSm:PCL-G1, c) CSm:PCL/Col-G, d) CSm:PCL-H, e) CSm:PCL/Col-H ve f) CSm yüzeylerdeki hücreler (20X, yeşil ve kırmızı floresanlar sırasıyla F-aktin filamentlerini ve hücre çekirdeğini göstermektedir) 94
- Şekil 4. 26. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS membrandaki MDBK hücrelerinin hücre kültürünün 2. ve 12. saatindeki SEM görüntüleri. (a ve b) CSm:PCL-G2'deki; (c ve d) CSm:PCL/Col-G'deki; (e ve f) CSm:PCL/Col-H'deki hücreler 96
- Şekil 4. 27. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS membrandaki MDBK hücrelerinin 12. saatteki konfokal mikroskobu görüntüleri. a) CSm:PCL-G2, b) CSm:PCL-G1 (oklar aktin noktalarını göstermektedir), c) CSm:PCL/Col-G, d) CSm:PCL-H, e) CSm:PCL/Col-H ve f) CSm yüzeylerdeki hücreler (20X, yeşil ve kırmızı floresanlar sırasıyla F-aktin filamentlerini ve hücre çekirdeğini göstermektedir) 97
- Şekil 4. 28. %6 PEO (w/v) derişimi, 0.3 mL sa⁻¹ akış hızı ve 15 cm toplayıcı mesafesi için elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüleri (5 KX, sağ üst görüntüler 30 KX). a) 10 kV, b) 12 kV, c) 14 kV ve d) 20 kV..... 102
- Şekil 4. 29. % 6 PEO (w/v) derişimi, 0.3 mL sa⁻¹ akış hızı ve 15 cm toplayıcı mesafesi için elde edilen nanofiberlerin çap-voltaj ilişkisi 103
- Şekil 4. 30. %6 PEO (w/v), 1 mL sa⁻¹, 15 cm koşulunda elde edilen fiberlerin i-mikroskop görüntüleri (40X). a) 10 kV, b) 14 kV c) 18 kV ve d) 20 kV..... 104
- Şekil 4. 31. %8 PEO (w/v) derişimi ve 15 cm toplayıcı mesafesinde elde edilen fiberlerin SEM görüntüleri (5 KX, sağ üst görüntüler 30 KX). 0.25 mL sa⁻¹ a) 12 kV, b) 16 kV ve c) 20 kV; 0.5 mL sa⁻¹ d) 12 kV, e) 16 kV ve f) 20 kV 106
- Şekil 4. 32. %8 PEO (w/v) derişimi, 15 cm mesafe, 0.25 mL sa⁻¹ ve 0.5 mL sa⁻¹ akış hızları için elde edilen nanofiberlerin çap-voltaj ilişkisi 107
- Şekil 4. 33. %8 PEO (w/v) derişimi ve 15 cm toplayıcı mesafesinde elde edilen fiberlerin SEM görüntüleri (2 KX, sağ üst görüntüler 10 KX) 1 mL sa⁻¹ a) 14 kV ve b) 18 kV 107
- Şekil 4. 34. %4 PEO (w/v) derişiminde ve 0.5 mL sa⁻¹ akış hızında elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüleri (5 KX, sağ üst görüntüler 30 KX). 10 cm a) 10 kV, b) 14 kV ve c) 18 kV; 15 cm d) 10 kV, e) 14 kV ve f) 18 kV 109
- Şekil 4. 35. %4 PEO (w/v) derişimi ve 0.5 mLsa⁻¹ akış hızı, 10 cm ve 15 cm mesafede elde edilen nanofiberlerin çap-voltaj ilişkisi 110
- Şekil 4. 36. %5 PEO (w/v) derişiminden ve 0.5 mL sa⁻¹ akış hızından elde edilen fiberlerin SEM görüntüleri (1 KX, üstteki küçük görüntüler 10 KX). 15 kV a) 10 cm, b) 20 cm, c) 25 cm ve d) 30 cm; 15 cm e) 10 kV, f) 15 kV, g) 18 kV ve h) 25 kV 112
- Şekil 4. 37. %5 PEO (w/v) derişimi, 0.5 mL sa⁻¹ akış hızı, 13 kV ve 15 kV voltajda elde edilen nanofiberlerin çap-mesafe ilişkisi 113

Şekil 4. 38. %5 (w/v) PEO derişimi, 0.5 mL sa ⁻¹ akış hızı ve 15 cm mesafede elde edilen nanofiberlerin çap-voltaj ilişkisi	113
Şekil 4. 39. 0.5 mL sa ⁻¹ akış hızı, 15 cm mesafede elde edilen nanofiberlerin çap-derişim ilişkisi	114
Şekil 4. 40. %5 PEO (w/v) derişiminden ve 0.5 mL sa ⁻¹ akış hızından elde edilen fiberlerin i-mikroskop görüntüleri (40X). a) 10 kV ve b) 16 kV	114
Şekil 4. 41. 37°C'de kurumaya alınan a) UV12 uygulanmış ve b) UV12 uygulanmamış %7.5 PETA içeren PEO nanofiberlerin kuruma süresine göre şişme davranışları.....	122
Şekil 4. 42. 37°C'de kurumaya alınan a) UV12 uygulanmış ve b) UV12 uygulanmamış %10 PETA içeren PEO nanofiberlerin kuruma süresine göre şişme davranışları.....	123
Şekil 4. 43. PEO'nun PETA ile çapraz bağlanma reaksiyonunun şematik gösterimi	124
Şekil 4. 44. PEO, PEO-PETA10 ve PEO-PETA10/UV12 nanofiberlerin FTIR-ATR spektrumları.....	126
Şekil 4. 45. PEO-PETA10/UV12 nanofiberlerin kuruma sürelerine göre FTIR-ATR spektrumları.....	127
Şekil 4. 46. PEO fiber kaplanmış (sol) ve kaplanmamış (sağ) Ti-y implantlara ait görüntüler	128
Şekil 4. 47. (a, b) Ti-y ve (c, d) Ti-p yüzeylerin AFM görüntüleri. (a, c) 2 boyutlu ve (b, d) 3 boyutlu görüntüler	130
Şekil 4. 48. Ti yüzeylerdeki PEO nanofiberlerin SEM görüntüleri (5 KX, sağ üst görüntüler 30 KX) ve bu nanofiberlere ait çap dağılımları. a) Ti-yPEOf, b) Ti-yPEOf/UV12 ve c) Ti-pPEOf/UV12.....	131
Şekil 4. 49. PEO nanofiber kaplı titanyum yüzeylerin AFM ve SEM görüntüleri. a) Ti-yPEOf/UV12, b) Ti-pPEOf/UV12 (3-boyutlu); 24 saat şişme sonrası Ti-yPEOf/UV12 c) 2-boyutlu (sağ üst SEM görüntüsü), d) 3-boyutlu görüntü; 24 saat şişme sonrası Ti-pPEOf/UV12 e) 2-boyutlu (sağ üst SEM görüntüsü) ve f) 3-boyutlu.....	132
Şekil 4. 50. a) Ti-y, b) Ti-p, c) Ti-yPEOf/UV12 ve d) Ti-pPEOf/UV12 yüzeylerindeki su damlasına ait fotoğraflar (t=0).....	133
Şekil 4. 51. (a, b) Ti-y ve (c, d) Ti-p yüzeylerdeki MC3T3-E1 hücrelerinin 4 saat inkübasyon sonrası SEM görüntüleri; sarı oklar küresel morfolojideki hücreleri, beyaz oklar ise yayılmaya başlayan hücreleri göstermektedir (a ve c 250X; b ve d 500X (sağ alt görüntüler 750X))	135

Şekil 4. 52. (a, b) Ti-yPEOf/UV12 ve (c, d) Ti-pPEOf/UV12 yüzeylerdeki MC3T3-E1 hücrelerinin 4 saat inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (a ve c 150X, b ve d 250X)..... 136

Şekil 4. 53. MTT analizi ile Ti-y, Ti-p, Ti-yPEOf/UV12, Ti-pPEOf/UV12 ve TCPS yüzeylerdeki hücre canlılığının takibi (İstatistiksel anlam farklılığı, n=3 *** p<0.001 (Ti-y kontrol grubudur); +++ p<0.001 (Ti-p kontrol grubudur); ooo p<0.001 (Ti-yPEOf/UV12 kontrol grubudur); *** p<0.001 (Ti-pPEOf/UV12 kontrol grubudur) 137

Şekil 4. 54. (a, b) Ti-y (x500 (sağ alt görüntü 15 KX), 1 KX) ve (c, d) Ti-PEOf/UV12 (1 KX, 2 KX (sağ alt görüntü 30 KX)) yüzeylerindeki *S. epidermidis* bakterilerinin 24 saat inkübasyon sonrası SEM görüntüleri 139

KISALTMALAR

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
Al	Aluminyum
ALP	Alkalen Fosfataz
BMSC	Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre
BSA	Sığır Serum Albümin
Col	Kollajen
CS	Kitosan
DCM	Diklorometan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimetilformamid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffer
DPN	Dip Pen Nanolitografi
ECH	Epiklorohidrin
ECM	Hücre Dışı Matris
EDL	Elektron Demeti Litografisi
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EPS	Hücre Dışı Polisakkarit
FBS	Fetal Sığır Serumu
FDA	Drug and Food Administration
FTIR-ATR	Fourier Dönüşümlü Toplam Yansıması Azaltılmış Kızılötesi Spektroskopisi
GA	Glutareldehit
GO	Glioksal
HCl	Hidroklorik Asit
HDMS	Hekzametil Disilazan
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (Hekzafloro-2-propanol)
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
Mo	Molibden
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-Difeniltetrazolyum Bromür
NaOH	Sodyum Hidroksit
Nb	Niyobyum
PA	Poliamid

PAA	Poliakrilik Asit
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PCL	Poli(ϵ -kaprolakton)
Pd	Paladyum
PDMS	Polidimetil Siloksan
PEG	Polietilen Glikol
PEO	Polietilen Oksit
PETA	Pentaeritritol triakrilat
PHBV	Polihidroksibutilvalerat
PLCL	Poli (L-laktik asit-ko-kaprolakton)
PLGA	Poli(Laktik-ko-glikolik asit)
PLL-g-PEG	Polilisin-graft-Polietilen Glikol
PMMA	Polimetil Metakrilat
PVA	Polivinil Alkol
PVP	Polivinil Prolidon
RGD	Arjinin-glisin-aspartik asit
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus Epidermidis</i>
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Sn	Kalay
TCPS	Polistiren Hücre Kültür Kapları
TFA	Trifloroasetik Asit
TGF	Transforme Büyüme Faktörü
THF	Tetrahidrofuran
Ti	Titanyum
TSB	Triptik Soy Besiyeri
UV	Ultraviyole
w/w	Ağırlık/Ağırlık Oranı
w/v	Ağırlık/Hacim Oranı
V	Vanadyum
YKH	Yumuşak Kas Hücreleri
Zr	Zirkonyum
α -MEM	Minimum Essential Medium Alpha Modification

1. GİRİŞ

Doku mühendisliği yaklaşımında, biyomalzemelerin nanotopografik yüzey özelliklerinin hücrel etkileşimlerde ve hücrel fonksiyonların düzenlenmesindeki yerinin araştırılması fonksiyonel doku oluşumuna uygun biyomalzemelerin geliştirilebilmesi açısından önem taşımaktadır [1]. Hücrelerin doğal ortamlarında kendilerine yapısal destek sağlayan ve hücre yapışması, çoğalması, göçü, farklılaşması, hücre fenotipinin düzenlenmesi ve doku yapısının kontrol edilmesinde rol oynayan hücre dışı matris (ECM) nano boyutta yapılar içermektedir [2]. Hücrelerin bu yapı içerisinde öncelikle etkileşim halinde bulunduğu fibröz proteinler ve glikozaminler nanoboyutta fiber yapılardan oluşmaktadır. Ayrıca, hücreler mikron boyutunda olmakla birlikte, hücre yapışması ile başlayan hücrel fonksiyonlar nano boyuttaki hücre organelleri ile gerçekleşmektedir.

Doku mühendisliği araştırmalarına yönelik olarak, doğal ortam koşullarının modellenerek hücrelerin tutunmasını sağlamak amacıyla biyoyumlu doğal ve sentetik polimerler kullanılmaktadır. Doğal polimerlerin sıkça tercih edilenlerinden biri, kitinden türetilen kitosan adlı polisakkarit olup, ucuz ve çevre-dostu yöntemlerle üretilmektedir [3, 4]. Kitosanın hücrel aktiviteleri (yapışma, yayılma, üreme ve vb.) olumlu yönde etkilediğinin bilinmesi, seçimindeki temel kriter olmuştur. Doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan diğer bir doğal polimer de kollajendir. İnsan vücudunda en çok bulunan bağ doku bileşeni olan kollajen hayvansal proteinlerin yaklaşık olarak %30'unu oluşturmaktadır. En sıklıkla kullanılan kollajen türü Tip I kollajendir. Kollajenin hücrel yapışmayı ve büyümeyi arttırdığı bilinmektedir [5]. Doku mühendisliği araştırmalarında sıklıkla kullanılan FDA (Food and Drug Administration) onaylı PCL, hidrofobik, hücre kültüründe toksik etki göstermeyen ve yapısındaki ester grupları nedeni ile biyolojik olarak bozunabilen bir sentetik polimerdir.

Biyomalzeme yüzeylerinde kontrollü nanotopografinin elde edilebilmesi amacıyla geliştirilen tekniklerin (fotolitografi, dip pen litografi, koloidal litografi, elektron demeti litografisi gibi) çeşitli dezavantajlarının aksine, **elektroegirme** tekniği sahip olduğu avantajları ile doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilecek birçok polimere uygulanabilmesi nedeniyle önem kazanmaktadır. Polimer çözeltisi ve işlem parametrelerinin optimize edilmesi ile farklı fiber çapına (20 nm'den birkaç

mikrometreye kadar değişen) ve oryantasyonuna (gelişigüzel ya da hizalanmış düzen) sahip fiberler elde edilebilmektedir [6]. Ucuz bir yöntem olarak elektroğirme tekniği, malzeme seçimindeki esneklik ve fiber özelliklerinin kontrol edilebilmesi nedeniyle çeşitli doku mühendisliği uygulamaları için biyomalzeme üretiminde kullanılmaktadır. Üretilen nano boyuttaki fibröz matrisler hücre etkileşimi için geniş yüzey alanı sağlamakta, besin maddeleri gibi sıvıların transferine olanak tanımakta ve doğal ECM yapısına benzerlik göstermektedir [3, 7].

Vücut içinde kullanılacak implantların ortaya çıkardığı sorunların başında enfeksiyon kaynaklı olanlar gelmektedir. İmplantasyon öncesi veya sonrası ya da sırasında implantlar kontaminasyonlara karşı çok hassas durumdadırlar ve çoğunlukla malzeme yüzeylerinde mikrobiyal enfeksiyondan başlayarak biyofilm oluşumuna kadar giden bir dizi istenmeyen süreç ortaya çıkmaktadır. Biyolojik ortamlarda kullanılan malzemelerin başarısı büyük oranda yüzey özelliklerine bağlıdır ve bakteriyel enfeksiyonun önlenmesi amacıyla yüzey özelliklerinin değiştirilmesi ve geliştirilmesi gereksinimi ortaya çıkmaktadır.

Son yıllarda, ortopedi ve dişçilik gibi biyomedikal alanlarda titanyum (Ti) ve Ti alaşımlarının kullanımı, sahip oldukları özellikleri nedeniyle ön plana çıkmıştır. Modifiye edilmemiş Ti ve Ti alaşımlarının yukarıda bahsi geçen bakteriyel enfeksiyonlara açık olması, yüksek tedavi giderleri ve hatta hastayı ölüme kadar götürebilen sonuçlar açığa çıkarmaktadır [8]. Ti implantların kullanımında en çok ortaya çıkan bakteri enfeksiyonuna *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) bakteri türü yol açmaktadır. Ayrıca implantasyon sonrasında malzemenin yüzeyi hızlı bir şekilde plazma proteinleri ile kaplanmakta, bu da bakteriyel yapışmayı tetiklemektedir.

Malzeme yüzeylerinde protein adsorbsiyonunu, bakteri yapışmasını ve biyofilm oluşumunu azaltmak/engellemek için uygulanan yaklaşımlar antikoagülant kaplamalar (heparin), hidrofilik zincirlerle yüzey modifikasyonu, fosforilkolin ile modifiye edilmiş polimer kaplamalar ve polietilen glikol/polietilen oksit (PEG/PEO) tabanlı kaplamalardır [9]. Biyomedikal uygulamalarda geniş çapta kullanılan PEO'nun protein ve bakteri yapışmasını engelleyici niteliklere sahip olması sebebiyle implant yüzeylerine kaplanması öne çıkmaktadır [10, 11].

Sunulan tez çalışmasında biyomalzeme yüzeylerinin nano/mikro ölçekte

desenlenmesi ve kaplanması için elektroğirme yönteminin kullanılabilirliğinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. İki ana kısımdan oluşan bu çalışmalar i) Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere nano/mikro ölçekte topografiye sahip polimerik esaslı biyomalzemelerin geliştirilmesi; ve ii) Enfeksiyon riski minimize edilmiş metal esaslı implant malzemelerin geliştirilmesi, hedefleri doğrultusunda yürütülmüştür.

Sunulan bu tez çalışmasının ilk kısmında kitosan ve PCL membranlar üretilmiş ve bu membranlar üzerinde elektroğirme tekniği kullanılarak farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip nanofiber tabanlı topografik desenler elde edilmiştir. Elde edilen bu desenlerin fibroblastik morfolojideki MC3T3-E1 preosteoblast ve epitel morfolojideki MDBK (Madine Darby Bovine Kidney) hücrelerinin davranışlarına olan etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla öncelikle membran kimyasının etkisini incelemeye yönelik olarak, kitosan ve PCL membranlarda gelişigüzel ve doğrusal hizalanmış düzende PCL nanofiberlerle iki farklı topografi oluşturulmuştur. Desenlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin hücre davranışlarına olan etkisini belirlemek için ise, kitosan membranlar PCL/kollajen ve iki farklı boyutta PCL fiberler ile gelişigüzel ve hizalanmış düzende desenlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, nanotopografi-hücre sel işlevler arasındaki ilişki açısından değerlendirilerek yorumlanmıştır.

Sunulan bu tez çalışmasının ikinci kısmında ise enfeksiyon riskinin azaltılması amacıyla Ti yüzeylerin elektroğirme yöntemi ile elde edilen PEO nanofiberlerle kaplanması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilen elektroğirme işleminin ardından PEO fiberler pentaeritritol triakrilat (PETA) çapraz bağlayıcısı ile UV ışığı altında muamele edilerek *in vitro* ortamda çözünmez hale getirilmişlerdir. Sonrasında, kaplanmış Ti yüzeylerde MC3T3-E1 hücrelerinin ve biyofilm oluşturan *S. epidermidis* bakterilerinin yüzeylere tutunma davranışları analiz edilerek elde edilen bulgular ışığında sonuçlar yorumlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, yapılan tez çalışmasının temelini oluşturan konular ile ilgili literatür bilgisi 2 başlık altında toplanmıştır. İlk olarak, polimerik yüzeylerde nanotopografi oluşturma yöntemlerine (özellikle çalışma kapsamında kullanılan teknik olan elektroçirme yöntemine) ve bu yöntemler ile hazırlanan yüzeylerdeki hücre davranışlarının incelenmesine yönelik bilgilere doku mühendisliği kapsamı içerisinde yer verilmiştir. İkinci bölümde ise, biyomedikal implantların (özellikle titanyum implantların) kullanımına bağlı ortaya çıkan sorunlara ve bu sorunların çözümü için geliştirilmiş yaklaşımlara yönelik bilgiler yer almıştır.

2.1. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, mühendislik ve yaşam bilimlerinde kullanılan yöntemleri bir araya getirerek doku yenilenmesi ve organ fonksiyonlarının iyileştirmesi için etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini amaçlayan disiplinler arası bir bilim dalıdır. Kaza, travma veya kanser sonucu meydana gelen organ ve doku hasarlarının iyileştirilmesinde geniş ölçüde kullanılan geleneksel yöntem organ veya dokuların transplantasyonudur. Ancak bu yöntem cerrahi müdahale gerektirdiğinden hem hastaya acı vermekte hem de enfeksiyona neden olabilmektedir. Ayrıca, kullanılacak doku kaynaklarının sınırlı olması, uygun vericinin bulunmasının zorluğu ve implantasyondan sonra oluşabilecek immünojenik etkiler organ nakli cerrahisinin önemli dezavantajlarını oluşturmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda doku yenilenmesi için yapay sistemlerin geliştirildiği “doku mühendisliği yaklaşımı” ön plana çıkmıştır [12]. Bu yaklaşım ile organların ya da dokuların başarılı bir şekilde rejenerasyonu için gerekli en temel iki faktör; doku oluşumunu sağlayacak olan hücreler ve hücrelere yapısal destek sağlayan biyomalzemelerdir. Hücre dışı ortamın (extracellular matrix; ECM) koşulları hücre fonksiyonları ve hücrelerin morfolojik yapılarını etkilemektedir. Bu nedenle, yapay dokuların tasarlanması sırasında ve hücre fonksiyonlarının incelendiği çalışmalarda, hücrelerin doğal ortamlarındaki fizyolojik çevrenin boyutlar ve bileşenler açısından benzer bir şekilde modellenmesi gerekmektedir [6, 13].

2.1.1. Doku Mühendisliği İçin Biyomalzemeler

Doku mühendisliği uygulamalarında, hücrelerin tutunmasını sağlayabilmek ve doğal ortam koşullarını oluşturmak amacıyla biyouyumlu ve toksik özellik göstermeyen biyomalzemeler kullanılmaktadır. Bu biyomalzemeler çeşitli doğal ve

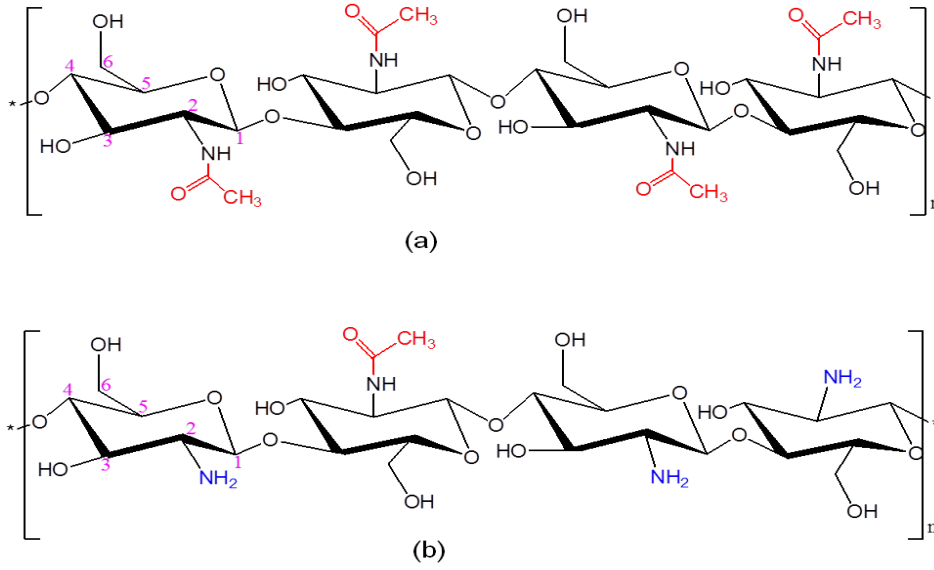
sentetik polimerlerden üretilebilmektedir.

2.1.1.1. Doğal polimerler

Doğal polimerler bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi yenilenebilir kaynaklardan türetilmekte ve psedoplastik davranış, jelleşme yeteneği, su tutma kapasitesi, biyobozunurluk ve daha birçok özellikleri nedeniyle doku mühendisliğinde çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Ayrıca kimyasal ve enzimatik modifikasyona olanak sağlayan birçok işlevsel gruplara da (amino, karboksil ve hidroksil) sahip olabildikleri gibi yapılarındaki özel tanıma bölgeleri yoluyla hücreler ile etkileşebilme özelliği de göstermektedirler. Doğal polimerlerin sentetik/doğal yapıdaki farklı polimerler ile birleştirilmesi ile elde edilen hibrit malzemeler ECM'nin doğal çevresini taklit edebilirler. Doğal kaynaklı polimerler enzimler yoluyla bozunabilmektedirler. Bu polimerlerin kullanımlarındaki en önemli dezavantaj kaynaklarına bağlı olarak safsızlıkları ve endotoksinleri içerebilmelerinden dolayı istenmeyen immün cevaplara yol açabilmeleridir. Ayrıca, özellikleri büyük ölçekli izolasyon işlemleri süresince üretimden üretime farklı olabilmektedir. Fakat doğal polimerlerin kullanımlarının artmasıyla geliştirilen yeni yaklaşımlar daha doğal ve daha işlevsel dokuların geliştirilmesine destek olabilecek doku iskelelerin tasarlanmasının yolunu açmaktadır [14].

Kitosan

Yengeç, karides gibi kabuklu su ürünlerinin ana bileşeni olan, böceklerin iskeletinde ve mantarların hücre duvarlarının yapısında da bulunan kitinden türetilen bir polisakarit olan kitosan, biyoyumlu ve toksik olmayan yapısı nedeniyle çok sayıda uygulama alanı bulmuştur. Kitosan, ilk kez 1811 yılında Henri Bracannot tarafından keşfedilmiştir. 1894'de Hoppe-Seyler, kitini potasyum hidroksit içerisinde 180°C'de işleme sokmuş (deasetilasyon) ve asetil içeriği azaltılmış bir ürün olan kitosan'ı elde etmiştir [15]. Kitin ve kitosan arasındaki temel farklılık, yapılarındaki asetil içeriğinden kaynaklanmaktadır (Şekil 2.1). Deasetilasyon derecesi kitinin yapısında bulunan aminoasetil gruplarından asetil grubunun uzaklaştırılma derecesidir. Böylece geride sadece amin grubu kalmaktadır. Kitinin belli derecede deasetillenmesi (%60 ve üzeri) sonucunda kitosan elde edilmektedir. Kitosanın deasetilasyon derecesinin, başta çözünme özelliği olmak üzere birçok parametre üzerinde büyük etkisi bulunmaktadır [16, 17].



Şekil 2. 1. a) Kitinin ve b) Kitosanının kimyasal yapısı

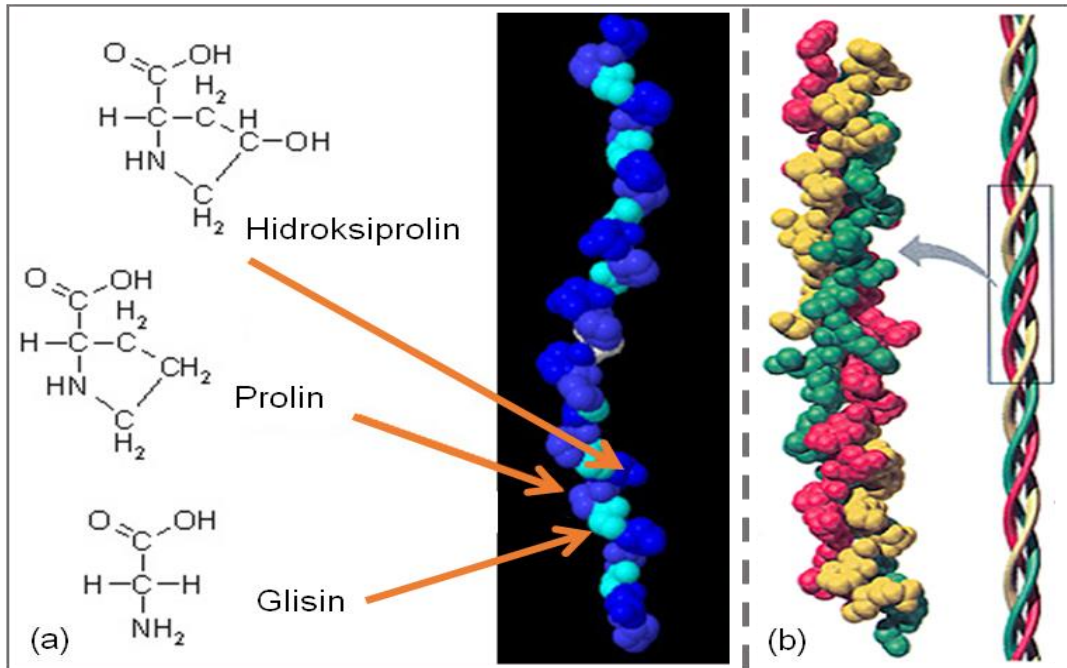
Şu anda kitosan doku mühendisliğinde en umut verici doğal kaynaklı polimerlerden biridir. Özellikle kimyasal çok yönlülüğü, tahmin edilebilir gözenek büyüklüğüne ve bozulma hızına sahip yapıların elde edilebilmesi kitosanı bu uygulamalar için iyi bir doku iskelesi adayı yapmaktadır. Biyouyumluğunun iyi olması, antibakteriyal aktivitesi ve büyüme faktörlerine bağlanma yeteneği de yaygın kullanımındaki diğer nedenler olarak sayılabilir. Doku mühendisliği uygulamalarında çeşitli fiziksel şekillerde ve formlarda hazırlanabilen kitosanın en çok tercih edilen formları gözenekli iskelet yapılar ve jel membranlardır [14]. Kitosan yapılar, hepatosit kültürlerinde [18], kıkırdak doku rejenerasyonunda [19], kemiğin yeniden yapılanması için ortopedik kompozitlerde [20], deri dokusunun rejenerasyonunda yara iyileştirici malzeme olarak [21], karaciğer dokusunun rejenerasyonunda, damar endotel ve yumuşak kas hücre kültürlerinde [22], fibroblastik kültürlerde [23] ve periferik sinir dokusunun onarımı için nöronlara destek sağlamak amacıyla [24] kullanılmış ve önemli avantajlar sağladığı görülmüştür. Kitosanın doğal veya sentetik yapıdaki malzemelerle birleşiminden elde edilen kompozit malzemeler de çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında önemli yer tutmaktadır. Kitosan/kollajen kompozit yapılarda kıkırdak doku rejenerasyonuna yönelik çalışmalar ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir [25].

Kollajen

Kollajen memeli dokularında (kornea, kan hücreleri, deri, kıkırdak, kemik, tendon ve ligament) en çok bulunan proteindir ve ECM'nin ana bileşenini oluşturur [26,

27]. Ana işlevi yapısal bütünlüğünü sağlamak olan kollajenler ayrıca, hücre mikroçevresindeki önemli işlevleri yerine getirirler ve büyüme faktörleri gibi hücre düzenleyicilerinin saklanması ve salgısında rol alırlar.

Endüstriyel kollajenler hayvan dokularından (domuz ve buzağı derisi, sığırtendonu, sıçan vs) elde edilerek enzim muamelesi ve tuz/asit ekstraksiyonu ile kolaylıkla saflaştırılabilirler. Bununla beraber, hayvan türevli kollajenler enfeksiyon riskine sahip olabileceklerinden, deniz kaynaklı (denizanası kollajeni) veya insan rekombinant kollajenin üretimi ile daha güvenli kollajen kaynakları sağlanabilmektedir.



Şekil 2. 2. Kollajenin a) Moleküler ve b) Üçlü heliks yapısı

Şimdiye kadar 20'nin üzerinde genetik olarak farklı kollajen türü tanımlanmıştır, fakat kollajenin temel yapısı glisin, prolin ve hidroksiprolinin tekrarlayan dizilerinden oluşan bir polipeptittir [27] (Şekil 2. 2 a [28]). Yalnızca tip I, II, III, V ve XI kollajen türleri fibriller şeklinde kendi kendine düzenlenirler [26]. Fibriller, uzunluğu 300 nanometre (nm) ve çapı 1.5 nm olan üçlü heliks yapıdaki kollajen moleküllerinden oluşur [29] (Şekil 2.2 b, [30]). Üzerinde en fazla çalışılan tür olan tip I kollajen, kornea, kemik, tendon ve deri bileşenidir. Tip II kollajen kıkırdak ve omurlar arası disklerde bulunur. Tip III kollajen dokulardaki örgülü (retiküler) fiberleri oluşturur ve atardamarlar, bağırsak ve rahim gibi oyuk yapıların duvarlarını güçlendirir. Tip IV kollajen bazal laminada gevşek fibril ağları olarak

bulunmaktadır. Kollajenin hücre tutunmasında etkili olan integrin proteini bağlayıcı RGD (arjinin- glisin-aspartik asit) bölgeleri, yüzeye bağlı hücrelerin ilk tutunma aşamasında ve kültürde hücre canlılığının devamında önemli rol oynamaktadır [5].

Bir biyomalzeme olarak kollajen 1970'li ve 1980'li yıllarda mükemmel biyouyumluluğu, düşük antijenisitesi, yüksek biyobozunurluğu, iyi hemostatik ve hücre bağlayıcı nitelikleri nedeni ile çeşitli bağ doku uygulamalarında kullanılmaya başlanmıştır [31]. Yara örtüsü ve yapay deri uygulamalarını içeren birçok doku mühendisliği uygulamaları için FDA tarafından onaylanmış bir biyomalzemedir [32].

2.1.1.2. Sentetik polimerler

Doğal polimerler gibi sentetik polimerler de doku mühendisliği uygulamaları için iskele üretiminde kullanılmaktadır. Kimyasal olarak sentezlenen polimerler doğal kaynaklı polimerlere göre farklı avantajlara sahiptirler. Sentetik polimerlerin en önemli avantajı özel işlevlere uygun hale getirilebilmek için modifiye edilebilmeleri ve bu yolla kontrol edilebilir özelliklere sahip olmalarıdır. Ayrıca birçok sentetik polimer hidrolitik degradasyona uğradığı için, iskelenin bozunma hızı *in-vivo* ortam farklılığına bağlı olarak önemli ölçüde değişmez. En çok kullanılan sentetik polimerler poliesterlerdir. Sentetik polimerlerin kullanımındaki en büyük dezavantaj istenmeyen bozunma ürünleridir. Yüksek derişimdeki bozunma ürünleri, yerel asitliği arttırarak inflamasyon veya fibröz enkapsülasyon gibi yan etkilere yol açabilirler [33, 34].

Şimdiye kadar poli(glikolik asit) (PGA), poli(laktik asit), poli(hidroksi bütirat), ve poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) gibi biyobozunur polimerler kullanılarak çok çeşitli doku iskeleleri geliştirilmiştir. Bu sentetik biyobozunur polimerler arasında yumuşak ve sert doku uyumluluğu özelliklerinden dolayı PCL yaygın bir şekilde incelenmektedir. FDA onaylı sentetik bir polimer olan PCL yarı kristalin özelliklere sahip bir poliesterdir. PCL biyobozunur ester bağları oluşturan halka açılımı polimerizasyonu ile elde edilir. PCL'nin bozunması bu ester bağlarının yığın veya yüzey hidrolizi ile gerçekleşir. Birçok avantajıyla beraber, diğer bazı biyobozunur poliesterler gibi, PCL doku iskelelerinin kullanımı da birkaç engelden dolayı sınırlıdır; (1) doku iskelesi üzerinde hücre tanıma bölgelerinin yokluğundan dolayı zayıf hücre afinitesi ve tutunması; (2) hidrofobisitenin hücrelerin gözenekli yapı iskelesine nüfuzunu engellemesi; (3) nötr yük dağılımı nedeniyle ECM ile

etkileşimin yokluğu ve (4) PCL'in hidrolizinden oluşan asidik bozunma ürünlerinin bazı yan etkilere neden olabilmesi [35].

PCL'nin pek çok araştırmada doku oluşumunu desteklediği gösterilmiştir [5]. Grubumuz tarafından yapılan çalışmalarda, yara örtü malzemesi olarak hazırlanan PCL ve PCL/kollajen fiber matrislere EGF immobilize edilmiş ve insan dermal keratinositler (HS2) kültüre edilmiştir [36]. Modifiye edilmemiş fiberlere göre EGF ile modifiye edilen fiber matrislerde erken hücre yapışması ve hızlı üreme davranışı gözlenmiş, ayrıca HS2'lerde daha yüksek seviyede loricrin gen ifadesi tespit edilmiştir. Rutledge ve ark. [37] tarafından yapılan bir çalışmada elektroçirme ile PCL ve PCL/polietilen oksit fiberler üretilmiş ve insan dermal fibroblastların fiber çapına ve gözenek büyüklüğüne bağlı olarak farklı davranışlar sergiledikleri gösterilmiştir. PCL/kollajen fiber örgülerin iskelet kas hücrelerinin davranışları üzerindeki etkisini incelemeye yönelik bir diğer çalışmada, gelişigüzel düzendeki fiberlere göre hizalanmış düzendeki fiberlerin miyotüp oluşumunu ve hücre hizalanmasını tetiklediği belirlenmiştir [38]. PCL/kitosan nanofibröz doku iskelelerinin NIH3T3, L929 ve MG63 hücre hatlarının yapışmasını ve çoğalmasını desteklediği bulunmuştur [39].

Doku mühendisliği uygulamaları için PCL, farklı doku iskelesi hazırlama yöntemleriyle (çözücü döküm-partikül uzaklaştırma, elektroçirme, eriterek birikim modellemesi ve 3-boyutlu baskılama) şekillendirilebilmektedir. Bunlar arasında elektroçirme ile hazırlanan mikro/nano fiber formdaki matrisler önemli yer tutmaktadır.

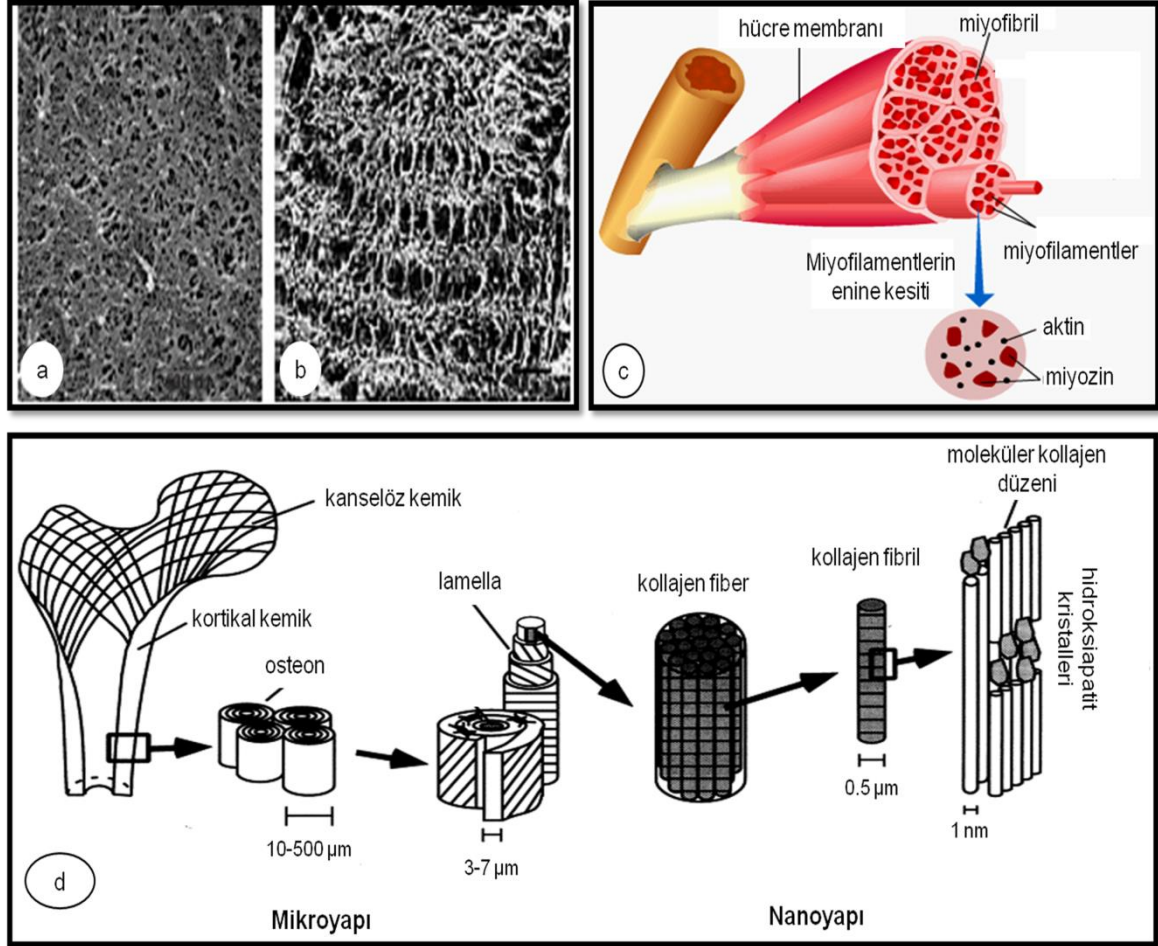
Doku mühendisliği yaklaşımında, hücrelere yapısal destek sağlayan biyomalzemelerin topografik yüzey özellikleri ve hücrelerin biyomalzeme yüzeyi ile olan etkileşimlerinin hücresel fonksiyonlar üzerindeki etkilerinin anlaşılması, hedeflenen doku rejenerasyonu için kontrollü malzemelerin tasarımında kritik önem taşımaktadır [6, 13, 40]. Bu yaklaşım ile hedeflenen doku oluşumunun gerçekleştirilebilmesi için biyomalzemelerin doğal ortamdaki ECM'ye benzer şekilde sentezlenmesi, hücresel fonksiyonları etkileyen hücre-biyomalzeme etkileşimleri açısından bir gerekliliktir. Mikron boyutlu topografinin hücre yapışmasının yönlendirilmesine ve sonrasında hücresel fonksiyonlara olan etkisi gösterilmiştir [6, 40]. Bununla birlikte, hücrelerin *in-vitro* ortamda yapay doku iskelelerine yerleştirildiklerinde doğal ortamlarından çok farklı olan kontrolsüz nano

yapılar ile karşılaşmaları, hücrelerin çoğalmasını ve işlevlerini olumsuz yönde etkileyebileceğinden *in-vitro* ortamda nano-çevrenin kontrol edilebilmesi önem arz etmektedir [41]. Ek olarak yüzey topografisinin hücre davranışlarına olan etkisinin hücre türüne bağlı olarak değiştiği de bilinmektedir. Hücre dışı matrisin topografik ve kimyasal düzeni ve hücrelerin bu düzen içerisindeki davranışları hakkındaki araştırmalar, yüzey topografisinin farklılaştırılmasıyla *in-vitro* ortamda hücre yapışması ve hücre fonksiyonlarının kontrol edilebildiği fonksiyonel malzemelerin geliştirilmesine olanak tanımıştır.

2.1.2. Nanotopografinin Doku Mühendisliği Açısından Önemi

Tüm dokular fonksiyonlarını büyük oranda etkileyen makro-ölçekli (>1 mm), mikro ölçekli (1 µm-1 mm) ve nano-ölçekli (<1 µm) bileşenlere sahiptirler. Canlı dokulardaki mikro çevre sayısız hücreler, ECM proteinleri ve çözünebilir ve ECM'ye bağlı çeşitli bileşenleri barındırır. ECM'deki çözünebilir ve immobilize makromoleküller birkaç nm'den birkaç bin nm'ye kadar değişen büyüklükteki kollajenleri, glikoproteinleri, glikozaminoglikanları ve proteoglikanları içerir. Bu biyomakromoleküllerden oluşan ECM nano ölçekte topografiler içermektedir. Doku gelişiminde ve organizasyonunda önemli rol oynayan ECM'nin sık rastlanan bileşeni olan bazal membran nanoboyutta gözeneklere, yükseltilere ve fiberlere sahiptir. Buna bir örnek olarak Macaque maymununun 147-191 nm aralığında yükseltilere, ortalama 77 nm fiber çapına ve ortalama 72 nm gözenek çapına sahip korneal epitel bazal membranı gösterilebilir (Şekil 2. 3 a) [1]. Benzer özellikler insan kornea dokusunda da gözlemlenir. Korneanın ağ yapısı, 60 nm tekrarlayan aralıklarla çapraz bağlanmış proteoglikanları içeren yoğun kollajen fibril ağlarından oluşur (Şekil 2. 3 b) [42]. Diğer bir örnek olarak, mikro ölçekte yoğun paralel düzende miyofibrilleri içeren iskelet kası verilebilir. İskelet kası, nano ölçekte miyofibrilleri oluşturan birbirine kenetlenmiş miyofilamentlerden (çapı 5–8 nm ve uzunluğu 1 mikrometre (µm) olan ince filamentler ve çapı 10 nm ve uzunluğu 1,6 µm olan kalın miyofilamentler) oluşur (Şekil 2.3 c). Kemiğin nanoölçekteki yapısı ise kollajen fiberlerden ve hidroksiapatit kristallerinden (4 nm) oluşmaktadır (Şekil 2. 3 d). Benzer hiyerarşik yapılar hemen hemen tüm insan dokularında bulunmaktadır [42]. Ayrıca hücreler de benzer hiyerarşik yapıya sahiptir. Büyüklükleri mikron boyutunda olan hücreler, yapışma ve hücre göçü gibi fonksiyonlarını nano boyuttaki hücre altı bileşenleriyle (*lamellipodia* ve *filopodia*)

gerçekleştirirler [40]. Hücrelerin etkileşim içinde bulunduğu ECM'nin bu hiyerarşik yapısı hücrelerin yapışması, çoğalması, göçü, farklılaşması, hücre fenotipinin düzenlenmesi ve doku yapısının kontrol edilmesinde rol oynamaktadır [2]. Bu nedenle, *in-vivo* ortamda nano yapılar ile etkileşimleri kaçınılmaz olan hücrelerin *in-vitro* ortamda da kontrollü bir nano-çevrede üretilmeleri, fizyolojik açıdan hatasız dokuların elde edilebilmesi açısından önem taşımaktadır [13].

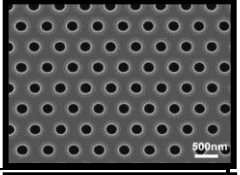
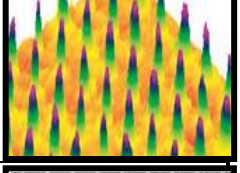
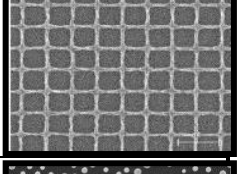
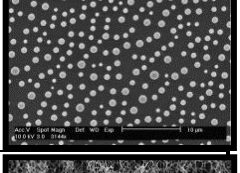
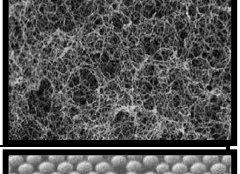
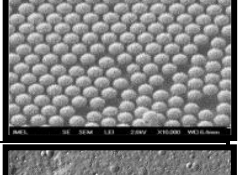
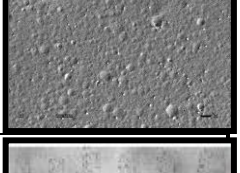
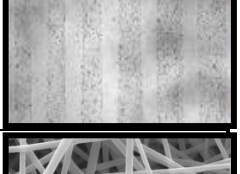
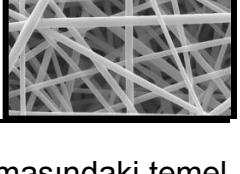


Şekil 2. 3. a) Macaque maymununun korneal epitel bazal membranının SEM görüntüsü, b) İnsan kornea dokusunun TEM görüntüsü, c) İskelet kasının ve d) Kemiğin hiyerarşik yapısının şematik gösterimi

2.1.3. Nanofabrikasyon Teknikleri

Hücrelerin nanoyapılarla olan etkileşimlerinin *in-vitro* ortamda aydınlatılması amacıyla, nanotopografiye sahip yüzeylerin fabrikasyonuna ilişkin çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Biyomalzeme yüzeyinin, hücrenin doğal ortamını modellemek üzere nanotopografik olarak modifiye edilmesi amacıyla uygulanan bu teknikler avantajları ve dezavantajları bakımından Çizelge 2.1 de özetlenmiştir.

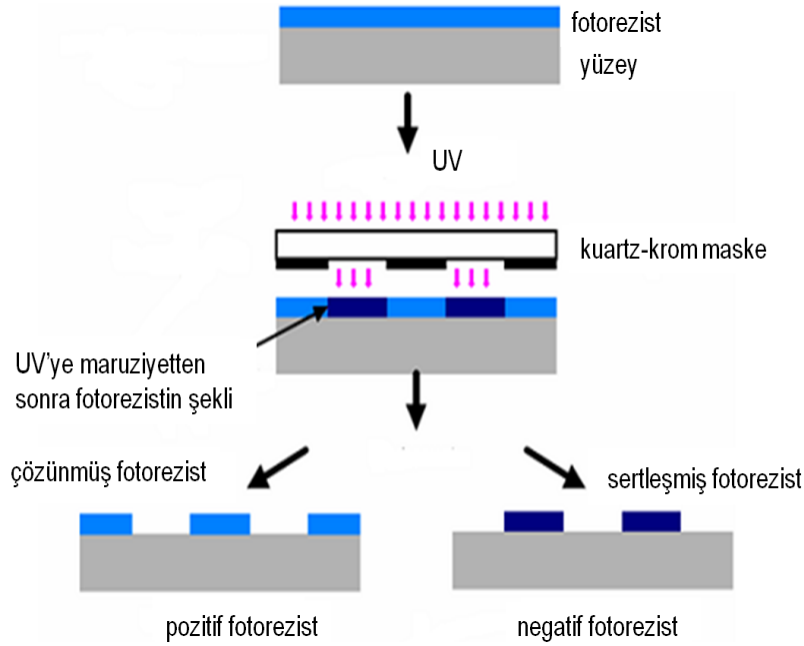
Çizelge 2. 1. Nanodesenleme yöntemleri, avantajları ve dezavantajları

Desenleme Yöntemi	Avantajlar	Dezavantajlar	Topografi
Fotolitografi	İstenen desenlerin elde edilebilmesi	Pahalı donanımlar, temiz-oda koşullarına ihtiyaç duyulması	
Dip Pen Nanolitografi	Bağıl olarak düşük miktardaki moleküler maddelerin yüzeye aktarılabilmesi	Uzun desenleme süreci	
Elektron Demeti Litografisi (EDL)	İstenen desenlerin elde edilebilmesi, maskeye ihtiyaç duyulmaması, bilgisayar kontrollü desenleme	Pahalı donanımlar, uzun desenleme süreci	
Polimer Karışımları	Hızlı, basit ve ucuz	Düşük desen kontrolü	
Faz Ayrımı	Gözenekli iskele üretilmesi, basit, ek donanım ihtiyacının olmaması	Organize olmayan desenler	
Kolloidal Litografi	EDL'ye göre daha geniş alanların desenlenebilmesi	Spesifik desenler elde edilememesi	
Kimyasal Kazıma	Hızlı, basit ve ek donanıma ihtiyaç olmaması	Spesifik desenlerin elde edilememesi	
Plazma Litografi	Farklı karakterdeki birçok polimerin yüzeye kaplanabilmesi	Kararlı kaplama elde etme zorluğu, koşulların belirlenmesinin zaman alıcılığı	
Elektroeğirme	Çok sayıda polimere uygulanabilmesi ve ECM'nin taklit edilebilmesi	Optimizasyon zorluğu	

Aşağıda bu yöntemlere kısaca değinilmiş, ancak sunulan tez çalışmasındaki temel yaklaşımı oluşturması nedeniyle elektroeğirme yöntemine ayrıntılı olarak yer verilmiştir.

2.1.3.1. Fotolitografi

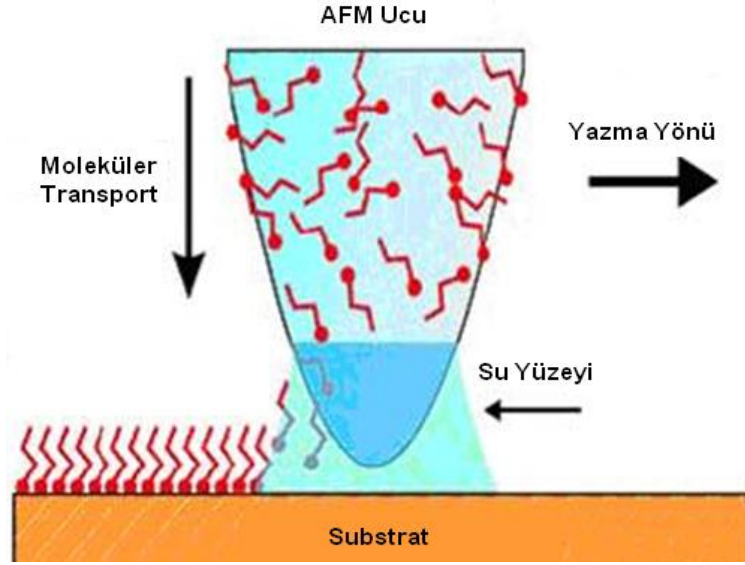
Fotolitografi yönteminde üzerinde nanodesenlerin oluşturulacağı yüzey, **fotorezist** (pozitif veya negatif) adı verilen ışığa duyarlı bir polimer tabakası ile kaplanır. İstenilen desenin malzeme yüzeyine aktarılabilmesi için, ışık kaynağı ve malzeme arasında kuartz-krom maskeler konumlandırılır. Pozitif fotorezist kullanımında, maskenin delikli bölgelerinden yüzeye ulaşan UV ışınları ile etkileşen fotorezist, çözünür forma geçmektedir. UV ışık ile etkileşmeyen bölgeler ise malzeme yüzeyinde yükselti olarak kalmaktadır. Negatif fotorezist ise UV ışınları ile etkileştiğinde sertleşmektedir [12]. Böylece maskenin, ışığı geçiren bölgelerindeki desen yüzeye aktarılmaktadır. UV ışınları ile muamele sonrası, katman yıkanarak ışığa duyarlı tabaka üzerinde istenilen özellikteki desenler elde edilebilmektedir (Şekil 2. 4) [41].



Şekil 2. 4. Fotolitografinin şematik gösterimi

2.1.3.2. Dip-pen nanolitografi

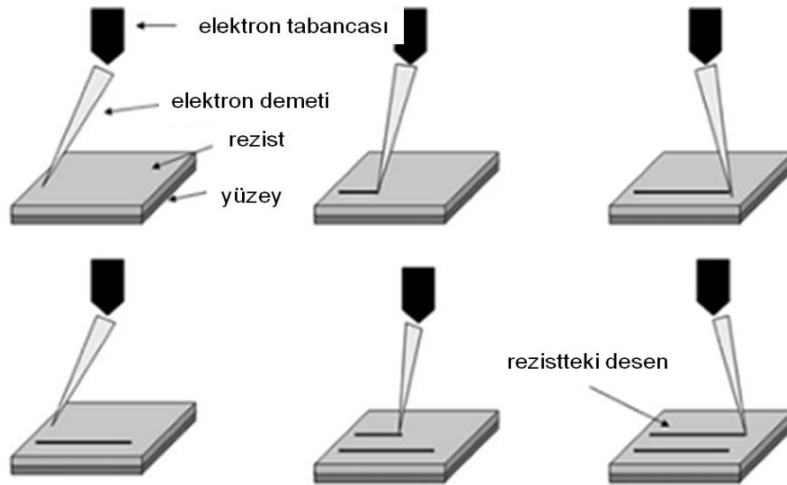
Dip pen nanolitografi (DPN) bir substrat üzerinde desen oluşturmak amacıyla atomik kuvvet mikroskobunun (AFM) kullanıldığı doğrudan yazma litografi tekniğidir [43]. Bu teknikte, moleküller bir haznedan atomik kuvvet mikroskobu ucuna moleküller alınır ve bir çözücü veya su vasıtasıyla substrat yüzeyine biriktirilir (Şekil 2. 5). Doğrudan yazma biçimiyle DPN yöntemi organik molekülleri, makromolekülleri, nanopartikülleri ve metal iyonlarını içeren çeşitli mürekkeplerin yüzeyde biriktirilmesine izin verir.



Şekil 2. 5. Dip-pen nanolitografinin şematik gösterimi

2.1.3.3. Elektron demeti litografisi

Elektron demeti litografisi, yüksek enerjili elektronların fotolitografideki gibi benzer olarak pozitif veya negatif fotorezist ile kaplanmış olan yüzey üzerine uygulanması prensibine dayanmaktadır. Bu teknik ile yüksek enerjili elektron demeti ile taranan yüzeyde biriken enerji, fotoduyarlı yüzeyde görünmeyen bir şekil bırakır. Kimyasal banyo sürecinde istenilen desenler açığa çıkar. Pozitif duyarlı yüzeyler için banyo elektronlara maruz kaldığı bölgeyi yapıdan uzaklaştırırken, negatif duyarlı yüzeylerde tam tersi durum meydana gelir (Şekil 2. 6). Elektron demetinin şekli ve özellikleri, elektronların enerjisi ve yoğunluğu, fotorezist yüzeyin moleküler yapısı ve kalınlığı, elektron-katı cisim etkileşimleri, banyonun kimyasal özellikleri ve banyo süresi gibi parametreler desen oluşumunda etkili faktörlerdir [41].



Şekil 2. 6. Elektron demeti litografisinin şematik gösterimi

2.1.3.4. Polimer karışımları

İki farklı polimerin (örneğin polistiren/poli (4-bromostiren) karışımı) karıştırılarak, “eğirerek döküm” (spin casting) yöntemi ile silikon yüzeylere kaplandığı bu yöntemde, eğirme işlemi sırasında kendiliğinden gerçekleşen faz ayrımı sonucunda yüzeyde nano ölçekli detaylar oluşmaktadır [41]. Polimer karışımları kullanılarak gelişigüzel düzende nanoölçekli çukurlar, adacıklar ve şeritler elde edilebilmektedir. Polimer oranı değiştirilerek desenlerin şekli değiştirilebilirken, polimer derişiminin değiştirilmesi ile de desen büyüklüğü değiştirilebilir.

2.1.3.5. Faz ayrımı

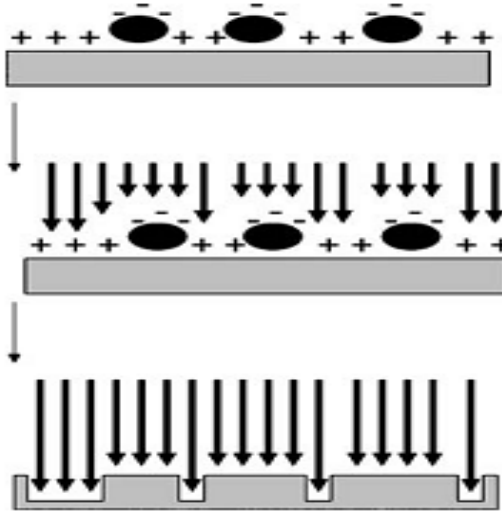
Çok bileşenli homojen sistemler, belli koşullar altında termodinamik kararlılıklarını yitirirler ve sistem birden fazla faza ayrılır. Polimer çözeltileri soğutulduklarında faz ayrımı gerçekleşir, polimerce zengin ve polimerce fakir olmak üzere 2 ayrı faz oluşur. Polimerce fakir fazın yani çözücü fazının uzaklaştırılması ile polimerce zengin fazın katılaşması söz konusudur [44].

Faz ayrımı mikron altı ölçekte fiberlere sahip üç boyutlu iskelelerin elde edilmesini sağlayan bir tekniktir. Bu teknik ile herhangi bir uygulamaya uygun hale getirilebilecek sürekli fiber ağları oluşturulabilir. Gözenek yapısı kullanılan çözücünün değiştirilmesi ile kolaylıkla değiştirilebilir. Çözücüdeki bu değişim ile fiber çapı kolaylıkla kontrol edilebilir ve tekrarlanabilirlik verimi yüksektir. Başlangıç polimer derişimi iskelenin nihayi gözenekliliğinde ve fiber çapında önemli bir parametredir. Yüksek polimer derişimi daha kalın fiberlerin ve daha az gözenekli yapıların oluşmasına yol açar. Bu teknik ile elde edilen fiberler gelişigüzel düzendedir [41].

2.1.3.6. Kolloidal litografi

Bu teknik kontrol edilebilir topografilere sahip yüzeylerin üretilmesine olanak sağlar. Kolloidal litografide kazıyıcı maske olarak nanokolloidler kullanılır. Bu nanokolloidler tek tabaka olarak yüzeye yayılır ve yüzey üzerinde elektrostatik olarak kendi kendilerine düzenlenirler. Daha sonra, iyon demeti bombardımanı ya da film buharlaştırma teknikleri ile nanokolloidler ya da nanokolloidlerin kaplamadıkları bölgeler aşındırılabilir. Bu yöntem ile nanokolonlar ve nanoçukurlar elde edilebilmektedir. Yönlendirilmiş iyon demeti bombardımanı nanokolonları üretmek amacıyla kullanılırken, film buharlaştırma kolloidin ortadan kaldırılmasından sonra çukur oluşumuna yol açar (Şekil 2. 7). Kolloid tabakasının

kapsamı ve kolloid büyüklüğü değiştirilerek yüzeyin yapısı değiştirilebilir [41].



Şekil 2. 7. Kolloidal litografinin şematik gösterimi

2.1.3.7. Kimyasal kazıma

Kimyasal kazıma, malzeme yüzeyine aşındırma özelliğine sahip bir kimyasalın (hidroflorik asit veya sodyum hidroksit) emdirilmesiyle, yüzeyde nano ölçekte topografik yapıların elde edilmesi işlemidir. Kazıma işlemiyle yüzeyde nanoölçekte çukurlar ve çıkıntılar oluşturulabilir [41].

2.1.3.8. Plazma litografi

Plazma yüzey muamelesi, uygulanması basit ve biyolojik uygulamalar için polimerik malzemelerin işlevselleştirilmesinde uygun bir tekniktir. Plazma litografi ile desen elde etmek için, plazmanın etkileşeceği yüzey üzerine bir dizi kanal veya delik içeren bir polimer kalıbı (ör: polidimetil siloksan (PDMS)) yerleştirilir. Muamele sonrası plazma, bu kanallardan veya deliklerden geçerek yüzey ile etkileşir. Bu şekilde işlevselleştirilen yüzeyde bir şablon oluşur [45].

2.1.3.9. Elektroeğirme

Biyomalzeme yüzeylerinde kontrollü nanotopografinin elde edilebilmesi amacıyla geliştirilen nanofabrikasyon teknikleri arasında, nanofiberlere sahip matris yapıların elde edilmesinde kullanılan elektroeğirme tekniği, sağladığı avantajlar bakımından öne çıkmaktadır. Elektroeğirme işlemi son yıllarda, yalnızca çeşitli polimerik fiberlerin eğrilmesindeki çok yönlülüğü ile değil aynı zamanda standart mekanik fiber eğirme teknikleri kullanılarak elde edilmesi zor mikron-altı fiberlerin sürekli üretilebilmesine de olanak sağladığından çok dikkat çekmektedir. Sıradan fiberlere nazaran daha küçük gözenekleri ve çok daha yüksek yüzey alanları ile

elektroeğrilmiş fiberler çok sayıdaki alanda başarıyla kullanılmaktadırlar [7].

Elektroegirme işlemleri 1600'lü yıllarda, William Gilbert'in elektro-manyetizmanın sıvılar üzerine etkisini gözlemlemesiyle tesadüfî bir şekilde ortaya çıkmıştır. Gilbert çalışmasında bir su damlasının elektriksel olarak kuru bir yüzeyden belli bir mesafede, bir koni biçiminde çekildiğine işaret etmiştir ki bu **elektrosprey** ve **elektroegirme** işleminin başladığı noktadır. 1882'de Lord Rayleigh, yalıtılmış yüklü bir damlacığa etki eden elektrik kuvvetinin yüzey gerilimi kuvvetini yendiği anda damlanın ince jetlere ayrılarak aktığını tespit etmiştir. Elektroegirme yöntemiyle fiber üretimine dair ilk patent 1934 yılında Anton Formhals (US Patent, 1-975-504) tarafından alınmıştır. Formhals çalışmasında selüloz asetat çözeltisinden filamentler elde etmiştir. 1960'lı yıllarda Taylor tarafından geliştirilen bir teoride, bir elektrik alan içindeki viskoz damladan ince fiberlerin oluşumunun, elektriksel kuvvetler tarafından yüklenen sıvı yüzeyindeki maksimum kararsızlıktan dolayı gerçekleştiği açıklanmıştır.

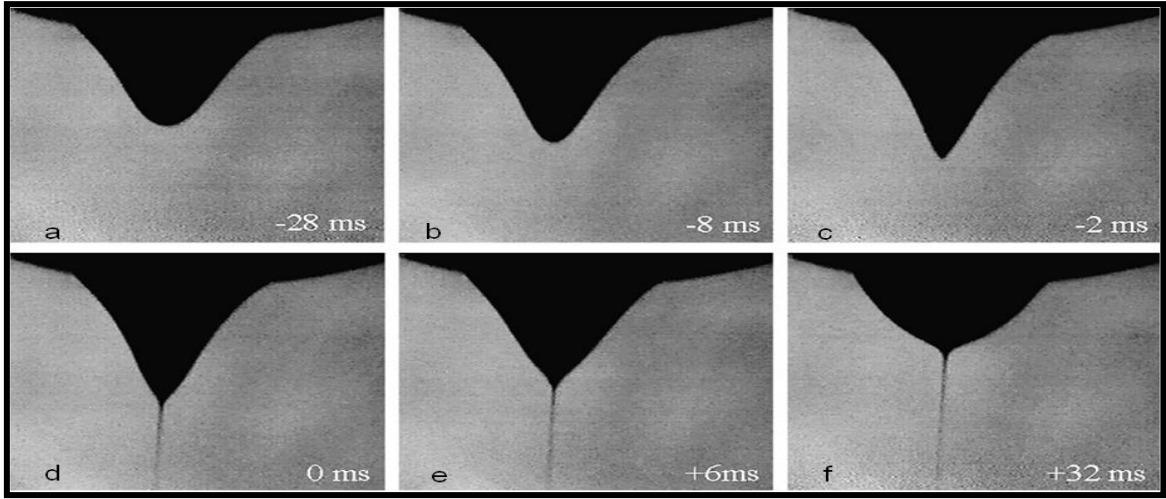
Teorik temeller

Elektroegirme tekniği elektrostatik kuvvetler kullanılarak polimerlerin fiber yapıda elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu teknikte kapiler bir besleme ünitesinde bulunan polimer çözeltisine yüksek voltaj (1-30 kV) uygulanır. Besleyici ünite içindeki iğnenin ucunda asılı durumda duran polimer çözeltisi damlası kritik bir voltaj değerine kadar, yüzey geriliminin uyguladığı kuvvetlerden dolayı, küresel bir biçimde bulunur. Uygulanan potansiyel fark bir eşik değerine ulaştığı anda, elektrostatik kuvvetler yüzey gerilimi kuvvetlerine eşitlenir. Bu noktada polimer damlası şekil değiştirerek koni (Taylor konisi) biçimini alır (Şekil 2. 8). Oluşan elektrostatik kuvvetler polimer çözeltisinin yüzey gerilimini yendiğinde fiber jet formunda oluşan akış, toplayıcı görevi gören iletken bir yüzey üzerinde kararsız bir yapıda fiber formunda toplanır.

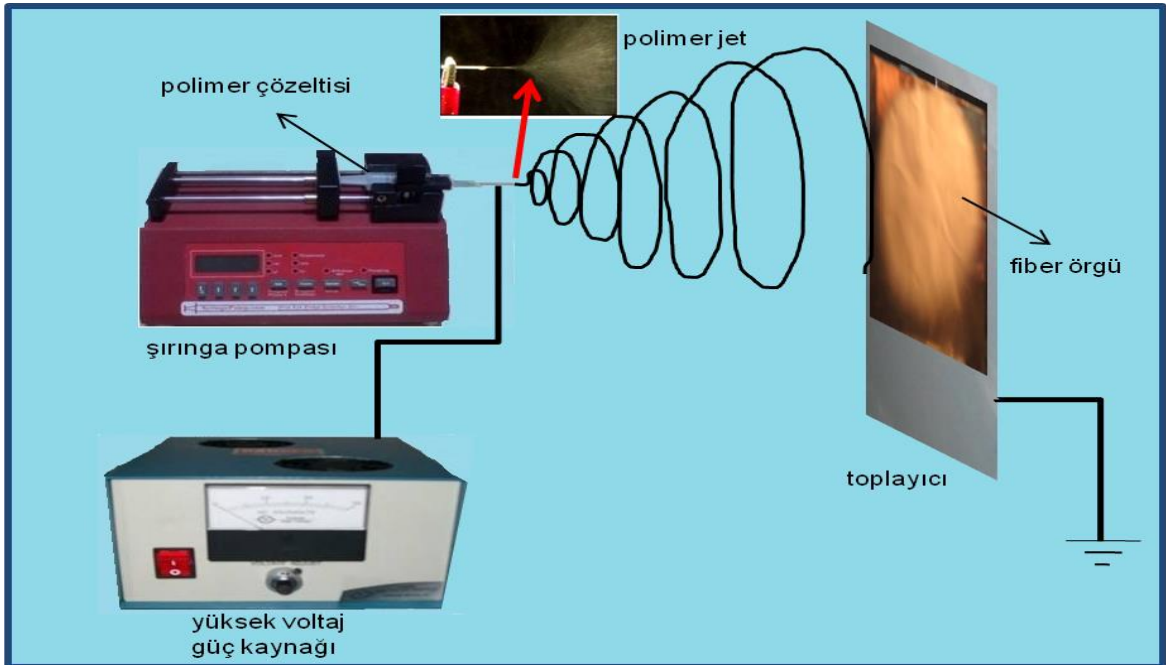
Elektroegirme yöntemi için gerekli deney düzeneği temel olarak üç önemli ana bileşenden oluşmaktadır (Şekil 2. 9). Bunlar:

1. Yüksek voltaj güç kaynağı
2. Besleme ünitesi (şırınga, metal iğne vb.) ve
3. Toplayıcı (iletken plaka, döner silindir v.b.)

olarak sıralanabilir.



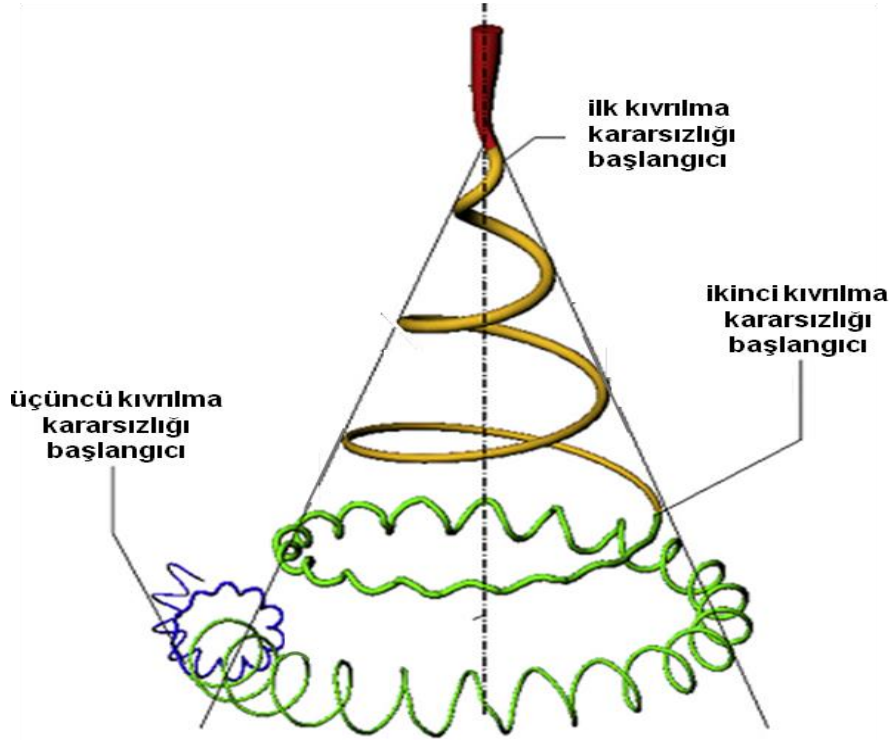
Şekil 2. 8. Taylor konisi oluşumunun zamana bağlı olarak şematik gösterimi



Şekil 2. 9. Basit bir elektroejirme düzeneği

Polimer damlası Taylor konisi halini aldıktan sonra voltajdaki çok küçük bir artışla birlikte koni ucundan fıskıran jet, toplayıcı levha ile metal iğne ucu arasında ilerlerken farklı yollar izler. Yüklenen jet Taylor konisinden çıktıktan sonra belli bir mesafede kararlı bir şekilde hareket eder. Daha sonra jet, kullanılan polimer çözeltisi veya eriyiğinin özelliğine ve sistem değişkenlerine bağlı olarak değişebilen çeşitli kararsızlık halleri gösterebilir. Klasik Rayleigh kararsızlığı olarak ifade edilen jet kararsızlığı fiberlerde boncuk oluşumunu tetikler. Elektroejirme işleminde görülen diğer bir kararsızlık hali **whipping**'dir (Şekil 2.10) ve en çok görülen kararsızlık halidir [46]. **Whipping** jet yüzeyindeki yüklerin karşılıklı olarak

birbirlerini itmesine bağı olarak yüklerin bir arada olamamalarından dolayı jette merkezden radyal bir şekilde tork oluşmasıdır. Jet, toplayıcı plakaya yaklaştığında ise ana jetten ayrılan küçük jetler meydana gelebilir. Bu küçük jetlerin oluşmasının nedeni ise radyal yüklerin birbirini itmesi sonucu ana jetten ayrılması olarak açıklanmıştır. Jet yeterince incelmediğinde ve viskoelastik kuvvetler yeterince sönümlendiğinde yeni **whipping** kararsızlıkları oluşabilir.



Şekil 2. 10. Elektroğirme işleminde oluşabilen whipping kararsızlık halleri

Elektroğirmeyi etkileyen parametreler

Elektroğirme işlemini ve fiber oluşumunu etkileyen parametreler; polimer çözeltisi ile ilgili parametreler ve işlem parametreleri olarak ikiye ayrılabilir. Bu parametrelerin anlaşılmasıyla, farklı şekillerde ve düzenlerde fiber yapıların eldesi için uygun tasarımlar yapılabilir. Ayrıca bu parametreler değiştirilerek farklı morfolojilerde fiberler üretmek de mümkündür.

i. Polimer çözeltisi ile ilgili parametreler

Polimer çözeltisinin özellikleri, elektroğirme işlemi ve elde edilen fiber morfolojisini en fazla etkileyen parametreler olup aşağıda açıklanmıştır.

- **Molekül ağırlığı, çözelti viskozitesi ve derişimi**

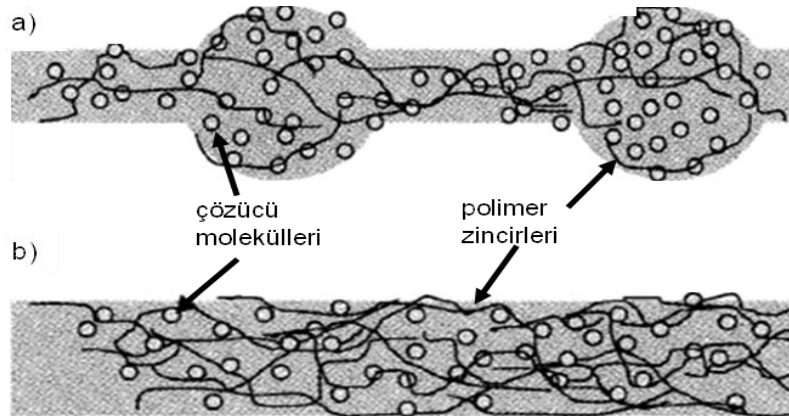
Çözeltinin viskozitesi polimerin molekül ağırlığından etkilenmektedir. Fiber elde etmek için çözelti yeterli molekül ağırlığına sahip bir polimerden oluşmalı ve aynı

zamanda çözeltinin yeterli viskoziteye sahip olması gerekmektedir. Elektroğirme işlemi sırasında polimer jeti toplayıcı tabakaya doğru ilerlerken gerilir ve uzar. Bu uzama sırasında polimer zincirlerinin birbirlerine dolanması ile jetin kopması engellenir ve böylece çözelti jetinin sürekliliği sağlanır. Çözelti viskozitesini artırmanın bir diğer yolu polimer derişimini artırmaktır. Artan polimer derişiminde molekül ağırlığının artırılmasına benzer olarak fiber oluşumu sağlanır.

Elektroğirmede fiber oluşumu polimer zincirlerinin birbirine dolanması ile gerçekleşmektedir. Bu bakımdan minimum zincir dolanması için minimum viskozite gereklidir. Fiber oluşumu belirli bir viskoziteye kadar sağlanabilir. Viskozitenin çok yüksek olması durumunda ise çözeltinin şırıngaya doğru pompalanması zorlaşacak ve aynı zamanda, çözelti şırınga ucunda elektroğirme işlemi başlamadan kuruyacaktır [47].

- **Yüzey gerilimi**

Elektroğirmenin başlaması için yüklü çözeltinin kendi yüzey gerilimini aşması gerekmektedir. Oluşan polimer jeti toplayıcıya doğru hareket ederken, yüzey gerilimi jet boyunca boncuk oluşumuna neden olabilir. Eğer çözelti içerisinde yüksek derişimde çözücü molekülleri bulunuyorsa (Şekil 2. 11 a), bu çözücü molekülleri kendi yüzey gerilimlerini azaltmak için bir araya gelerek küresel formda boncuklar oluştururlar. Çözücü moleküllerinin bu şekilde bir araya gelmesi daha fazla polimer zincirini ortama katarak, ki bu da viskozitenin artmasına neden olur, engellenebilir. Bu şekilde polimer zincirleri arasında daha az çözücü molekülleri yer alacak ve boncuk oluşumunun önüne geçilebilecektir (Şekil 2. 11 b).



Şekil 2. 11. a) Düşük viskozitede çözücü molekülleri yüzey geriliminin etkisiyle bir araya gelirler. b) Yüksek viskozitede çözücü molekülleri bir araya gelmiş polimer zincirleri arasında dağılmıştır

- **Çözelti iletkenliği**

Elektroeğirme, çözelti üzerindeki yüklerin birbirlerini itmesiyle polimer jetin gerilmesi ve uzaması prensibine dayanır. Dolayısıyla eğer çözeltinin iletkenliği artarsa, elektroeğirme jeti tarafından daha fazla yük taşınır. Çözelti iletkenliğini artırmak için çözelteye az miktarda tuz ya da polielektrolit eklendiğinde artan yükler sayesinde polimer jetin uzaması artacaktır. Bu sayede de daha düzgün fiber eldesi sağlanır. Yük artışının bir diğer etkisi de yüklerin birbirlerini itmesiyle meydana gelen bükölme kararsızlığının şırınga ucuna daha yakın bir yerde başlamasıdır. Bu nedenle fiberlerin toplayıcı üzerinde biriktirildiği alan artar [48].

Yüksek elektriksel iletkenliğe sahip çözücülerin kullanılmasıyla boncuk içermeyen düzgün fiberler elde edilirken, sıfır elektriksel iletkenliğe sahip çözeltilerde fiber oluşumu gözlenmez [49].

- **Çözücü dielektrik sabiti**

Bir çözücünün dielektrik sabiti elektroeğirme işleminde önemli bir etkiye sahiptir (Çizelge 2.2). Genellikle, yüksek dielektrik sabitine sahip bir çözücünün kullanılması boncuk oluşumunu ve elde edilen fiberin çapını azaltır [50]. Daha düzgün morfolojide fiber eldesi için polimer çözeltilerine N,N-dimetilformamid gibi dielektrik sabiti yüksek çözücüler eklenebilir [51]. Yüksek dielektrik sabitine sahip çözücüler kullanıldığında elektroeğirme jetinin bükölme kararsızlığı da artar. Bu, aynı zamanda polimer jetin kat edeceği yolu da artırarak fiberlerin çaplarını da düşürür [52].

Çizelge 2. 2. Elektroeğirmede sıklıkla kullanılan bazı çözücülere ait dielektrik sabitleri

Çözücü	Dielektrik Sabiti
Kloroform	4.8
Dimetilformamid	38.3
Hegzafloroizopropanol	16.7
Tetrohidrofurán	7.5
Trifloroetanol	27
Aseton	21
Su	80
Metanol	33
Formik asit	58
Asetik asit	6.2
Diklorometan	9.1
Etanol	24.55
Trifloroasetik asit	8.4

ii. İşlem parametreleri

Elektroegirme işlemini etkileyen diğer parametreler ise elektroegirme jetine uygulanan çeşitli dış faktörlerdir. Bu parametrelerin elde edilen fiber morfolojisi üzerinde etkileri varsa da çözelti parametrelerine göre daha azdır.

- **Uygulanan voltaj**

Polimer çözeltisine uygulanan voltaj, elde edilen fiberlerin morfolojileri ve çapları üzerinde etkilidir. Polimer çözeltisinden elektroegirme jetinin oluşabilmesi için minimum bir voltaja ihtiyaç vardır. Genellikle bu minimum voltajda elde edilen fiberlerin yapısında boncuklar bulunacağından voltajı belirli bir seviyeye kadar artırarak hem boncuk oluşumu engellenebilir, hem de fiberlerin çaplarında bir miktar düşme gözlemlenir.

- **Çözelti akış hızı**

Polimer çözeltisinin akış hızı fiber çapını ve şeklini etkilediği gibi fiber gözenekliliği üzerinde de etkilidir. Çözelti akışı şırıngayı terk eden fiber jetiyle yer değiştirecek bir hızda değilse şırınga ucundaki koninin şekli korunamadığı gibi, yüksek akış hızlarında polimer jetin tam olarak kuruyamamasına bağlı olarak fiberlerin üzerinde boncukların varlığı ve fiber yapılarının küresel formdan yassı forma geçmesi söz konusu olabilir.

- **Şırınga ucu/toplayıcı arasındaki uzaklık**

Şırınga ucu-toplayıcı arasındaki uzaklık diğer parametrelere göre daha az etkili olsa da aradaki mesafe artışı fiber çapının belirli oranda düşmesine neden olur.

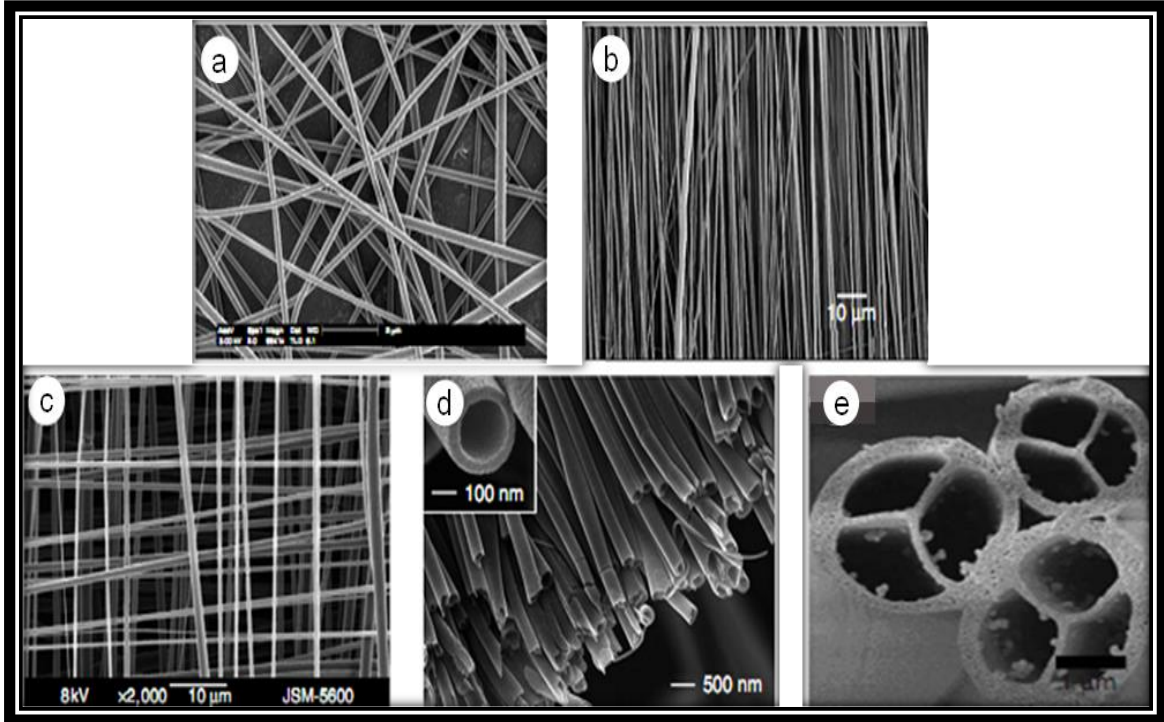
- **Kullanılan pipet/iğne çapı**

Kullanılan pipet/iğne çapı da diğer işlem parametreleri gibi ikincil önemde olsa da, fiber morfolojisi ve çapı üzerinde etkilidir. Daha küçük çapta iğne ile fiberler üzerindeki boncukların sayısında azalma gözlenir. Ayrıca iğnenin çapındaki düşüş nedeniyle daha küçük çapta fiberler elde edilir. İğne ucundaki damlacığın çapı azaldığında, damlacığın yüzey gerilimi artar. Daha büyük çaptaki iğneye uygulanan voltaj, küçük çaplı iğne ucuna uygulandığında, artan yüzey geriliminden dolayı ortaya çıkan elektriksel kuvvetin etkisi azalacağından jet hızı da azalır ve fiberlerin toplayıcıya ulaşmadan önce daha uzun bir yol katederek gerilmesi ve uzaması devam eder. Bu da fiber çapında düşüşe neden olur. Fakat çapın çok küçük olması iğne ucunda tıkanmalara yol açar ve elektroegirme işlemi gerçekleştirilemez [53].

Doku mühendisliği uygulamaları

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak hem doğal hem de sentetik polimerler ve bunların diğer malzemeler ile oluşturdukları kompozit yapıların, elektroğirme tekniği kullanılarak birkaç nanometreden birkaç mikrometreye kadar üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Elde edilen nanofiber yapıların fiziksel olarak doğal hücre dışı matris yapısına benzer özellikler göstermesi, fiberlerin hücre etkileşimi için geniş yüzey alanı sağlaması ve besin maddeleri gibi sıvıların transferine olanak sağlayan gözeneklere sahip olmaları elektroğirme yönteminin getirdiği en önemli avantajlardır [3, 7]. Elektroğirme ucuz, kullanımı kolay ve bağıl olarak basit bir teknik olarak çeşitli polimerlerden nanofiberlerin üretilmesine olanak sağlar.

Bu teknik ile çeşitli formlarda (gelişigüzel ya da doğrusal düzende) örülmemiş nano boyutta fiberlerin elde edilebilmesi mümkündür (Şekil 2.12, [1]). Elektroğirme parametrelerinin optimizasyonu ile fiber oryantasyonu ve gözeneklilik kontrol edilebilmektedir [7].



Şekil 2. 12. Elektroğirme ile elde edilmiş çeşitli formlarda fiberler. a) Gelişigüzel düzenlenmiş polivinilprolidon (PVP) nanofiberler, b) Hizalanmış PCL fiberler, c) PGA fiberler, d) Tek kanallı PVP/titanyum dioksit ve e) Çok kanallı PVP/ titanyum dioksit fiberler

Elektroegirme sagladigi avantajlar nedeni ile cok farklı uygulamalarda kullanılmak üzere nanofibröz yüzeylerin üretiminde hızlı bir şekilde kullanıma girmiştir [7]. Son 10 yıl içerisinde bu yöntem ECM yapısını taklit edebilen iskelelerin organizasyonu için mikro ve nano boyutlarda fiberlerin üretilebilmesi ile önem kazanmıştır. Elektroegirme yöntemi, iskele yapısal özelliklerinin kontrol edilebilmesi ve değişkenlerin yönlendirilmesi ile istenilen özellikte iskelelerin üretimine izin vermesi açısından kullanışlı ve esnek bir yöntemdir. Sentetik polimer kullanılan sistemlerde, polimerlerin ayarlanabilir mekanik özellikleri, protein kaplama, biyosinyal moleküllerinin kimyasal yöntemlerle bağlanması gibi uygulamalarla yüzeyin işlevselleştirilebilmesi yönünden avantajlar sunmaktadır [54]. Birçok avantajına rağmen, elektroegirme tekniği üretim koşullarının optimizasyonunun zaman alıcı olması ve özellikle tek jet ile yapılan fiber üretiminin iki boyutlu üretimden öteye geçememesi gibi dezavantajlara sahiptir. İkinci dezavantajın önüne geçmek amacıyla birçok araştırmacı çok jetli sistemler geliştirmişlerdir [55]. Doku mühendisliği için elektroegirilmiş örgülerin ve iskelelerin kullanılmasında karşılaşılan en önemli problem ise, normal pasif ekim koşulları altında düzensiz hücreyel yayılma ve iskele içine olan hücreyel göçün eksikliğidir.

Doku mühendisliği uygulamalarında elektroegirilmiş çeşitli polimerik fibröz örgüler, farklı hücre türleri kullanılarak hücreyel davranışların incelemesi amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışmalarda fibröz örgü üzerine kültüre edilmiş hücreler kaçınılmaz şekilde fiber yapılarla etkileşmiş ve sonuç olarak hücre hizalanması, yapışması, farklılaşması veya çoğalması etkilenmiştir. Literatürde bu konuda gerçekleştirilen çalışmalara ait örnekler Çizelge 2.3'de özetlenmiştir.

Elektroegirme ile nanofibröz matris üretimine yönelik çok sayıda çalışma olmasına karşın, doğrudan malzeme yüzeylerinin desenlenmesine yönelik uygulamalar son derece sınırlıdır. Shi ve ark. [56] cam yüzeylerde litografik olarak tanımlanan nanofiber desenler elde etmek amacıyla mikrokontakt baskılama ve elektroegirmeyi birleştirerek bir yöntem tasarlamışlardır. Bu yöntemde mikrokontakt baskılama, PDMS stampalarla elektroegirilmiş nanofiberleri nakletmek amacıyla kullanılmıştır. Sunulan bu tez çalışmasında ise farklı olarak, elektroegirme yöntemi polimer yüzeylerde farklı büyüklükte, hem gelişigüzel hem de hizalanmış düzende fiberler elde etmek için etkili bir yöntem olarak kullanılmıştır.

Çizelge 2. 3. Elektroeğrilmş fiber örgü yüzeylerinde oluşan hücrenel cevaplar

Polimer *	Hücre	Uygulama	Hücrenel cevap	Ref
PLGA			Sinir rejenerasyonu	[57]
PCL/Jelatin	Sinir	Sinir	Fiber yönlennmesine bağlı olarak yapışmada artış	[58]
PCL	Nöral kök hücre		Oligodendrositlere farklılaşma	[59]
CS/PEO			Hücre yapışmasında ve çoğalmasında artış	[60]
PCL	Kondrosit	Kıkırdak	Kondrositik fenotipin sürdürülmesi ve kollajen Tip IIB ekspresyonu	[61]
	MKH		Mineralize doku oluşumunun desteklenmesi	[62]
CS/PEO	Osteoblast Kondrosit	Kemik	Hücre yapışmasının teşvik edilmesi	[63]
İpek Fibroin	Keratinosit Fibroblast		Hücre yapışması ve yayılmasının desteklenmesi	[64, 65]
Dekstran/PLGA			Artmış hücre organizasyonu ve göçü	[66]
KarboksietilCS/ PVA	Fibroblast	Deri	Hücre yapışmasında ve çoğalmasında artış	[67]
PMMA			Hücre çoğalması ve göçünde fiber oryantasyonuna bağlı artış	[68]
PLGA			Hücre çoğalması ve yapışmasında artış	[69]
Col	Keratinosit		Hücre yapışmasında ve yayılmasında artış	[70]
Elastin	YKH	Damar	YKH büyümesinin desteklenmesi, fiber yönelimi boyunca çoğalma	[71]
Col/Elastin /PLGA	Endotel Kas		Hücre büyümesi, çoğalması ve olgunlaşmasının desteklenmesi	[72]
PLCL	Endotel	-	Fiber çapına bağlı olarak yapışmada ve çoğalmada artış	[73]
PA	Fibroblast	-	Aktin hücre iskeletinde <i>in-vivo</i> 'dakine benzer düzenlenme	[74]
	Epitel		Morfogenezin teşviki	
PAA		-	Fiber yönelimine bağlı olarak artmış ECM sentezi	[75]
PHBV/Col	Fibroblast	-	Kollajene bağlı olarak daha fazla yapışma ve büyüme	[76]
Elastin ve Tropoelastin	MKH	-	Hücre büyümesinin ve yapışmasının desteklenmesi	[77]
Jelatin	Osteoblast	-	Fiber çapına ve gözenek büyüklüğüne bağlı farklılaşma	[78]

* PLGA: poli (L-laktid-ko-glikolik asit), CS: kitosan, PEO: polietilen oksit, PMMA: polimetil metakrilat, Col:kollajen, YKH: yumuşak kas hücresi, PLCL: poli(L-laktid-ko-kaprolakton), PA: poliamid, PAA: poliakrilik asit, MKH: mezenkimal kök hücre, PLLA: poli(L-laktik asit), PHBV: polihidroksibütıl valerat

2.1.4. Nanotopografik Yüzey-Hücre Etkileşimleri

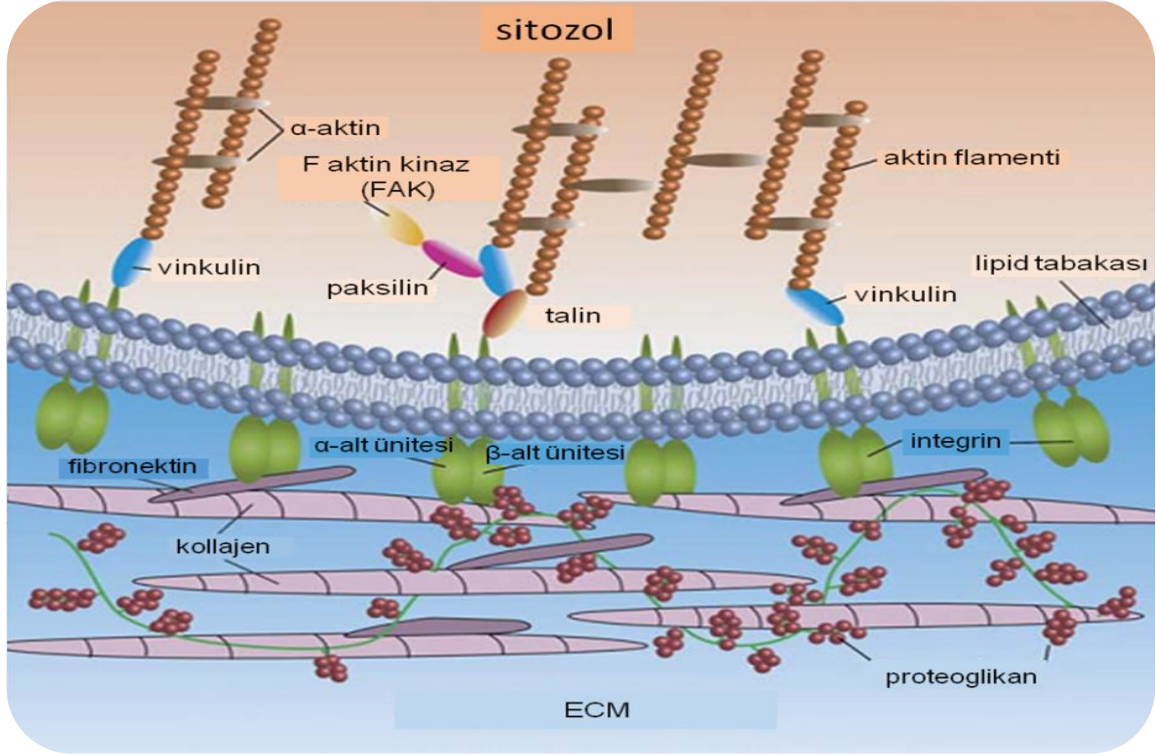
Dokular makrodan (kemiğin, ligamentlerin veya damarların şekli) mikroya (hücrelerin düzenlenmesi ve morfolojisi) ve nano ölçeğe (kollajen sarmalları, protein konformasyonu ve ligandlar) kadar değişen farklı boyutlarda topografiler sergilerler ve bunların herbirinin hücre davranışını ve işlevini etkileme potansiyeli vardır [79]. Hemen hemen 100 yıldır, hücrelerin çevresindeki topografik yüzeylerle etkileştiği bilinmektedir. 1911 yılında Carrel ve Burrows [80] hücrelerin şekilsel ayrıntılara cevap verdiğini göstermiştir. 1952 yılında Weiss ve Garber [81] ilk olarak kontak yönelim (contact guidance) ifadesini kullanmışlardır. O günden bu yana hücre yönelimi olgusu incelenmeye devam edilmektedir [82-84]. Çok sayıda farklı hücre tipinin değişik şekiller ve büyüklüklerdeki topografilere cevabı gösterilmiştir [85-88]. Araştırmacılar ilk olarak aktindeki mikrofilamentlerin oluklu yüzeylerde hizalandığı ve diğer yüzeylerde farklı organizasyonlar sergilediği hücre iskeletine odaklanmışlardır [83, 89]. Yapışma plakaları ve hücre iskeleti gelişimi sonraki hücre aktivitesi için büyük önem taşımaktadır. Malzemeye tepki olarak fokal temasların ve stress fiberlerin organizasyonu hücre farklılaşmasında uzun dönemli etkilere sahiptir [90-92]. Hücre davranışlarının mikron boyutundaki topografi ile kontrol edilebildiğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmasına karşın, nanotopografik detayların hücre üzerindeki etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır [93]. Hücre türlerindeki farklılıklar, nanoölçekli yüzeylerin ve farklı deney protokollerinin uyumsuzluğu gibi olguların hepsi derin bir analiz ortaya koymayı güçleştirmekte ve bazen de benzer topografilerdeki sonuçların birbiriyle çelişmesi durumu ortaya çıkmaktadır. Fakat yine de hücre-biyomalzeme ilişkisinde bazı genellemelere gidilebilmektedir. Bunlardan ilki yüzeydeki protein adsorpsiyonunda meydana gelen değişikliklerdir. İkincisi hücre yapışmasını ve yayılmasını düzenleyen önemli bir parametre olan nano yapıların boyutlarıdır. Üçüncüsü ise substrat yüzeyinin nanoyapıdan kaynaklanan elastikiyetinin değişimidir. Genel olarak yüzey pürüzlülüğünün artmasıyla yüzey alanının arttığı ve bu sayede protein adsorpsiyonunun ve hücre yapışmasının arttığı düşünülmektedir. Polimerik, seramik ve metal yüzeylerle yapılan çok sayıdaki çalışma protein adsorpsiyonunun nanoölçekli pürüzlülüğe sahip yüzeylerde düz yüzeylere nazaran arttığını göstermektedir [94, 95]. Polimerlerin yüzey özellikleri yığın yapı içindeki özelliklerden farklılık göstermektedir. Örneğin polimerin yüzeyinde camsı geçiş sıcaklığı büyük oranda düşer [96, 97] ve makromoleküler zincirler daha yüksek

hareketliliğe sahip olur [98, 99]. Değişen yüzey enerjisi topografik desenler boyunca protein birikmesine yol açabilmekte ve adsorbe olan proteinlerin bileşimini ve konformasyonunu etkileyebilmektedir. Bu durum da sonuç olarak farklı hücrel cevaplara neden olabilmektedir [95, 100, 101]. Nanoölçekli yüzeyler aynı zamanda yüzeyin ıslatılabilirliğini değiştirebilmekte, bu da protein adsorbsiyonunu etkileyebilmektedir [102].

2.1.4.1. İntegrinler ve integrinler aracılığı ile hücre yapışması

Çok hücreli organizmalarda, hücrelerin komşu hücrelerle ve hücre dışı matrisle olan etkileşimi hücre yapışma reseptörleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu reseptörler arasında **integrin ailesi** sayıca en fazla ve en sık rastlanan grubu oluşturmaktadır. İntegrinler, hücre farklılaşması, embriyogenez, yara iyileşmesi ve hemostaz gibi süreçlerde önemli rol oynayan reseptörlerdir. İntegrin molekülleri 8 ile 12 nm boyutunda olan ve yüzeyin nanotopografisinden etkilenebilen hareketli uzantılardır. İntegrinler α ve β olarak isimlendirilen iki transmembran alt ünitenin biraraya gelmesiyle oluşmaktadır. α ve β alt ünitelerinin birleşimi integrinin ligandlara olan eğilimini belirlemektedir [103]. En önemli matris bağlayıcı integrinler, fibronektine ($\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha5\beta3$, $\alpha\beta3$), kollajene ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$, $\alpha11\beta1$) ve laminine ($\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha7\beta1$) afinitesi olan $\beta1$ integrinleridir. Üzerinde en çok çalışılmış integrinler ise RGD dizilimini tanıyan $\alpha\beta3$ integrinleridir [104].

Bir biyomalzeme biyolojik bir sistemle temas ettiğinde ilk olarak proteinler yüzeye adsorbe olurlar. Biyomalzemenin yüzey özelliklerinden etkilenen yüzeye bağlı protein tabakası, takip eden hücre yapışmasını düzenler [105]. Biyomalzemenin geometrik ve kimyasal özellikleri hücre göçü ve çoğalması gibi hücrel fonksiyonları yönlendirir, fenotik farklılaşmayı düzenler ve hücre dışı sinyallerin cevabını değiştirir [106]. Hücrelerin yüzeyler ile olan etkileşimlerinde, yüzeye tutunma aşamasında etkin rol alan biyolojik moleküllerden en önemlisi integrinlerdir. Bununla birlikte, nanotopografinin sahip olduğu kimyasal özellikler, yüzeye adsorplanan proteinleri etkileyeceğinden, fokal temasta etkin olan integrin tipini ve dolayısıyla hücre tutunmasını farklı kılacaktır. Bunun sonucu olarak, yüzey üzerinde olan nano boyuttaki desenler, fokal yapışmanın organizasyonunda önemli etkilere sahip olacaktır. Bu durum, integrinlerin hücre çekirdeğine doğrudan bağlı olmasından dolayı, nanodesenlerin özelliği hücrelerin topografiye olan cevabı açısından önemli bir etkidir [13].



Şekil 2. 13. İntegrin molekülleri ile lipid tabakasının her iki yanında bulunan proteinlerin etkileşimini ifade eden fokal yapışmanın şematik gösterimi

İntegrinler aracılığı ile hücre yapışması birbirini takip eden dört basamakta gerçekleşmektedir. Bunlar sırasıyla; hücrenin yüzeye tutunması, hücrenin yüzey üzerinde yayılması, hücre iskeletinin organizasyonu ve fokal yapışmanın oluşmasıdır. Öncelikle, hücrenin yüzeye tutunma basamağında, hücre yüzeyle temasa geçmekte ve hücrenin hafif kayma gerilimlerine direnç göstermesini sağlayacak olan ligand bağlanması gerçekleşmektedir. İkinci aşamada, hücrenin plazma membranı yüzey üzerinde yayılır ve hücre yassı bir görünüm alır. Bu durumda hücrenin uzunlamasına büyüklüğü, yüksekliğinin 3-10 katı arasındadır. Hücrenin yüzey üzerinde yayılmasını tamamlamasıyla, üçüncü aşamada aktin organizasyonu gerçekleşir ve hücrenin yüzeye yapışmasını sağlayan lif demetleri oluşur. Son basamakta, hücre iskeletinin hücre dışı matris proteinlerine bağlandığı fokal yapışma gerçekleşir (Şekil 2. 13, [107]) Dört basamakta gerçekleşen hücrenin yüzeye yapışması olayı sırasında integrinler, bir taraftan hücre ile yüzey arasında fiziksel bir tutucu görevi görürken, bir taraftan da hücre membranından gerçekleşen sinyal iletimini sağlarlar. İntegrinler aracılığı ile sağlanan sinyal iletimi her iki yönde de gerçekleşir ve integrinlerin hücre dışı bağlanma aktivitelerini kontrol eder. İntegrinler aracılığı ile gerçekleşen hücre yayılmasının ve bunu

takiben fokal yapışmanın, yüzeye bağımlı hücrelerin yaşaması ve üremesi için gerekli olduğu kanıtlanmıştır. Yapışmanın gerçekleşmediği durumda 'anoikis' olarak bilinen hücre ölümü gerçekleşmektedir [108].

2.1.4.2. Nanotopografi-hücre etkileşimini inceleyen çalışmalar

Nanotopografinin hücreler üzerindeki etkisi fibroblastlar [107, 109], osteoklastlar [87], epitel hücreler [110, 111], makrofajlar [112, 113], osteoblastlar [114], mezenkimal kök hücreler [115, 116], endotel hücreler [117, 118], yumuşak kas hücreleri [119] ve sinir hücreleri [120, 121] gibi çok sayıdaki hücrelerle gerçekleştirilen çalışmalarda gösterilmiştir. Hücreler yüzeye tutunup yapıştıktan sonra, nanometre boyutundaki *filopodia* ve *lamellipodia* uzantıları ile buldukları yüzeyi keşfederler ve nanometre düzeyinde yüzey üzerinde hareket ederler. *Filopodia* uzantıları hücrenin bulunduğu çevreyi tanımaya çalışırken, uzantının uç noktaları hücrenin hareketi için dayanak noktalarını oluşturmaktadır. Bu yapılar 250 nm'den 400 nm'ye kadar değişen boyutta olduklarından, yüzeyde bulunabilecek nanotopografiden etkilenmeleri kaçınılmaz olacaktır [13].

Hücreler, yüzeyde bulunan topografilere membranlarındaki deformasyon ile cevap verirler. Bu durumda, yüzey topografisinde meydana gelen değişiklikler, hücre morfolojisinin değişmesine neden olmaktadır. Morfolojide meydana gelen değişim, hücre çekirdeğinde deformasyona neden olabilmekte ve hücre düz bir yüzey üzerinde bulunduğu durumdan farklı olarak, diferansiyel gerilimlere maruz kalabilmektedir. Böyle bir deformasyon, sinyal iletişimini ya da nükleer matris içindeki genlerin uyumunu etkileyeceğinden, hücre davranışının değişmesine neden olacaktır [13]. Hücrelerin nanoboyuttaki organelleri ile gerçekleştirdikleri bu etkileşimlerin tümü, hücre davranışlarının organizasyonu ile hedeflenen hücre fonksiyonların elde edilmesinde kontrollü yüzey nano topografilerinin önem taşıdığını göstermektedir.

Webster ve grubu [94] tarafından NaOH ile muamele edilerek pürüzlü PLGA yüzeyler hazırlanmış ve bu yüzeylerde fare aortik yumuşak kas hücreleri (YKH) ile endotel hücrelerinin davranışı incelenmiştir. YKH'lerde yapışma ve çoğalmada artış gözlenirken endotel hücrelerde azalma gözlenmiştir. Diğer bir çalışmada sığır akciğer atardamarı YKH'lerin 350 nm uzunluğa, 700 nm genişliğe ve 350 nm derinliğe sahip PMMA ve PDMS nanoizgaralar üzerinde hücre çekirdekleri ve iskeletleri uzamış ve hizalanmış, aynı zamanda hücre hizalanması boyunca

mikrotubulüs organizasyonu gözlenmiştir [122]. İnsan koroner atardamar YKH'lerinin gelişigüzel desenlenmiş PLCL nanofiberlere, PLCL filmlere ve polistiren Petri kabı (TCPS) kontrol grubuna göre, hizalanmış PLCL fiberler üzerinde belirgin bir biçimde daha fazla yapıştıkları ve çoğaldığı gözlenmiştir. Ayrıca YKH'lerdeki hücre iskeleti proteinlerinin yayılması ve düzenlenmesi nanofiberler yönünde paralel olmuştur [123]. Zhu ve ark. [124] polistiren nanooyuklara kültüre edilen C6 glioma hücrelerinin nanooyuklar boyunca hizalandıklarını, uzamış morfoloji ve asimetrik hücre yüzey uzantıları sergilediklerini gözlemlemişlerdir. Yang ve ark.'larının [125] elektroçirime ile elde ettiği hizalanmış mikro (1.25 μm) ve nano (250 nm) poli(L-laktid asit) fiberler üzerinde C17-2 hücreleri (multipotent sinir kök hücre (NSC) hattı) fiber çapından bağımsız olarak fiber yönelimi boyunca paralel uzama ve nörit büyümesi sergilemişlerdir. Öte yandan hücreler gelişigüzel fiberler üzerinde gelişigüzel yönelmiş nöritler oluşturmuşlardır Anderson ve ark. [111] koloidal litografi ile 60-170 nm arasında değişen çaplarda kolonlar elde ederek, pankreas epitel hücre hattı ile hücre morfolojisindeki değişimleri incelemişlerdir. Hücrelerin, topografik detayların büyüklüklerinin artmasıyla daha fazla yayıldıkları, dairesel morfolojilerinden saparak uzadıkları gözlenmiştir Aynı grup tarafından yapılan diğer bir çalışmada 40-400 nm derinliklere sahip oluklu topografiler üzerinde hücrelerin hizalanma derecesi ve uzamış hücrelerin yüzdesi sürekli oluklar üzerinde kesikli oluklara göre oluk derinliğinin artmasıyla artmıştır [126]. Pattison ve grubu [127] tarafından yapılan çalışmalarda, nano-boyutta özelliklere sahip PLGA doku iskeleleri üretilmiştir. Üretilen yapılarda, insan mesane yumuşak kas hücrelerinin davranışı incelenmiş ve hücre yapışması ve üremesinde artış gözlenmiştir. Milner ve grubu [128] tarafından yürütülen çalışmalarda, poli (L-laktik asit) filmler ile yüzeyler üzerinde 400 nm ve 700 nm boyutlarında çıkıntılar oluşturacak şekilde nanodesenler oluşturulmuştur. İnsan fibroblast hücrelerinin yüzey topografisi ile olan etkileşimi incelendiğinde, başlangıçta hücre yapışmasının en fazla 400 nm boyuttaki nanodesenlere sahip yüzeylerde gerçekleştiği, en az yapışmanın ise düz yüzeylerde gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte hücre üremesinin nanodesenli yüzeylerde azaldığı görülmüştür. Yüzeyde bulunan nanodesenlerin yüzey alanını artırması sonucu fokal kompleks oluşumu hücrelerin yüzeye tutunma noktalarında artışa neden olurken, nanodesenler varlığında fokal kompleks oluşumlar fokal yapışmaya doğru

ilerleyemediğinden ve hücre yayılması nanodesenler varlığında kısıtlandığından, nanodesenli yüzeylerde hücre üremesinde azalma gözlenmiştir. Nanotopografik özelliklere sahip biyomalzemelerle yürütülen çalışmalarda, topografik özelliklerin boyutunun, fiziksel yapısının ve düzenlenmesinin hücre davranışları üzerinde farklı etkilere sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Dalby ve grubu [93] tarafından silikon yüzeylerde yürütülen çalışmalarda, çukur ve girinti şeklindeki nanodesenlere sahip yüzeylerde L-929 fare fibroblast hücrelerinin davranışı incelenmiştir. 75 ve 120 nm derinliğe sahip yapılar üzerinde *filopodia*-nano yapı etkileşimi gözlenirken, 35 nm çapındaki girintilere hücrelerin tepki göstermediği görülmüştür. Feng ve grubu [129] tarafından yürütülen çalışmalarda, hizalanmış ve gelişigüzel yerleştirilmiş poli (L-laktik asit) nanofiberler üzerinde hepatosit hücrelerin davranışı incelenmiştir. Albümin ve üre sentezinin yanı sıra metabolik enzim aktivitesi gibi hücresel fonksiyonların hizalanmış nanofiberler üzerinde arttığı sonucuna varılmıştır.

Farklı nanotopografik detaylara hücrelerin verdiği cevapları içeren diğer çalışmalardan bazıları Çizelge 2.4'de özetlenmiştir.

Çizelge 2. 4. Nanotopografik detaylara verilen hücresel cevaplar

Şekil	Boyut (nm)	Hücreler	Hücre Cevabı	Referans
Adacık Çıkıntı	10-95	Fibroblast	Azalan yükseklikle birlikte artan yapışma, artmış hücre iskeleti organizasyonu, cDNA ifadesinde değişimler	[130]
	13-95	Endotel	Artmış fibroblast büyüme faktörü sentezi	[131]
	14-45	Osteoblast	Artmış yapışma	[132,
	15-100	MKH*		133]
	20-70	Nöron	Artmış yapışma ve hücre canlılığı	[134]
	13-95	Lökosit	Artmış CD29 ve CD54 ifadesi	[135]
Oyuk Basamak Sütun Kolon	en:100 yükseklik:160	Fibroblast	Azalmış hücre yapışması, artmış <i>filopodia</i> , artmış endosit aktivite	[136]
	30-282	Makrofaj	Artmış aktin ve fagositik aktivite	[112]
	90-500	Osteoblast	Hücre morfolojisinde ve aktin düzenlenmesinde hizalanma	[137]
	en:500 derinlik/ yükseklik:29		Artmış yapışma, FAK fosforilasyonunda artış	[138]
	en/derinlik/ yükseklik:350	MKH	Nöronal belirteçlerde artış	[139]
	derinlik/ yükseklik:550 -1150	Epitel	Desenlere paralel yapışma	[140]
Fiber	500-800	Fibroblast	Fiber yönelimine bağlı oryantasyon	[69]
	200-800	YKH*	Artmış hücre yapışması ve çoğalma	[141]
	50-500	Osteoblast	Protein adsorpsiyonunda ve yapışmada artış	[142]
	700	MKH*	Kondrojenik ve osteojenik farklılaşma, daha iyi mekanik özellikler	[143]
	760	Hepatosit	Daha küçük sferoid oluşumu ve artmış yapışma	[144]
Aşınmış topografi	50-100	YKH	Artmış yapışma ve çoğalma	[145, 146]
	50-100	Endotel	Artmış yapışma ve çoğalma (yüzey kimyasına bağlı olarak)	[94]
	20-70	Nöron	Artmış yapışma ve hücre canlılığı	[134]

*MKH: Mezenkimal kök hücre, YKH: Yumuşak kas hücresi

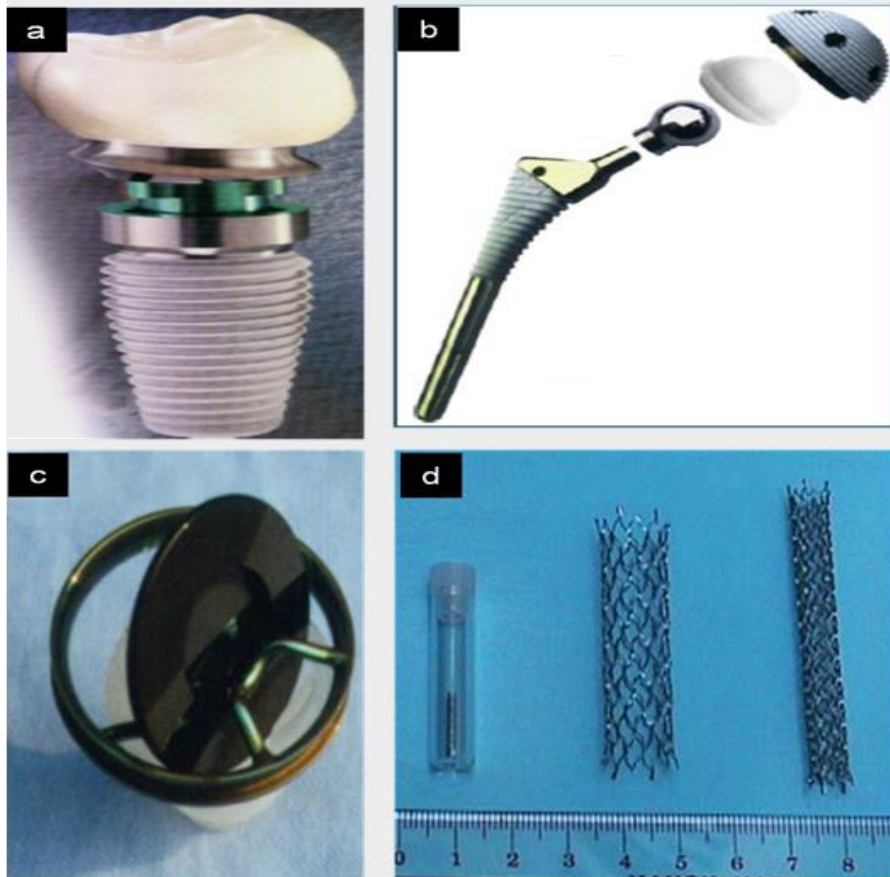
2.2. Biyomedikal İmplantlar

Biyomedikal implantlar hasar görmüş organ ve doku fonksiyonlarının yerine getirilmesi için kullanılan yapay organlar olarak tanımlanır. Metaller, seramikler ve polimerler gibi çeşitli biyomalzemelerden biyomedikal implant üretimi

gerçekleştirilmektedir. Metalik implantlar paslanmaz çelik, kobalt/kobalt alaşımlar ve titanyum/titanyum alaşımlar olarak sınıflandırılmaktadırlar [147]. Metalik malzemeler arasında titanyum (Ti) ve Ti alaşımları, diğer implantlara nazaran sahip olduğu mükemmel korozyon direnci ve doku uyumu özellikleri nedeniyle medikal uygulamalarda en fazla kullanılan malzemeler olarak göze çarpmaktadır [148].

2.2.1. Titanyum İmplantlar

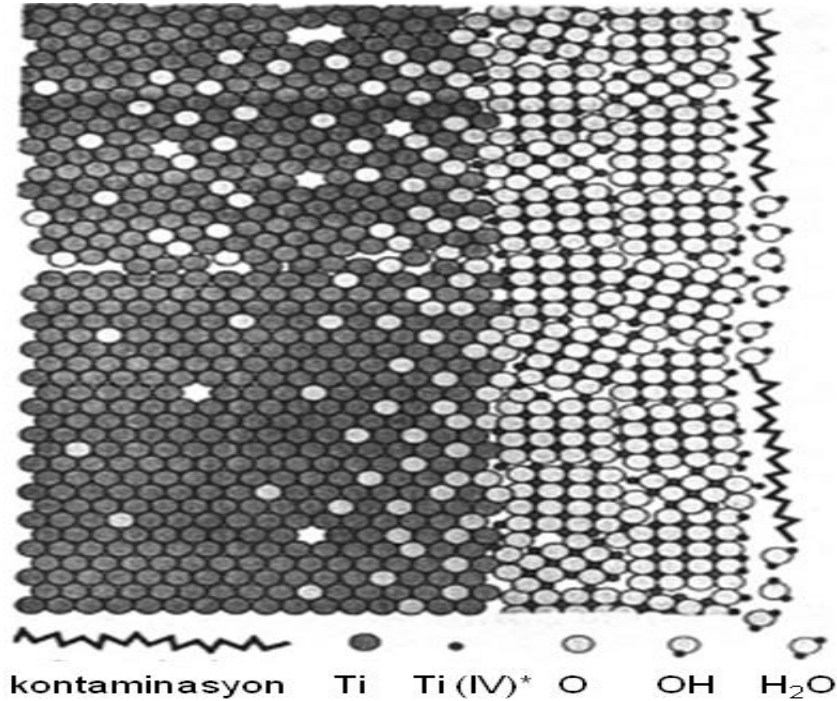
Titanyum hafif, dayanıklı, parlak, korozyona karşı dirençli ve grimsi renkte bir geçiş metalidir. Titanyumun alüminyum (Al), vanadyum (V), molibden (Mo), zirkonyum (Zr), niyobyum (Nb), paladyum (Pd) ve kalay (Sn) gibi elementler ile alaşımları hazırlanabilir. Ti ve Ti alaşımları sahip oldukları mükemmel nitelikleri (düşük elastik modülü, yüksek kuvvet/kütle oranı, iyi yorulma direnci, şekillendirilebilirliği, yüksek korozyon direnci ve biyouyumluluğu) nedeniyle ortopedik ve osteosentez cihazlarında, diş implantlarında, çene cerrahisi ve vasküler stentler gibi çok sayıdaki medikal alanlarda uygulama sahası bulmaktadır (Şekil 2. 14) [149, 150].



Şekil 2. 14. Titanyum ve alaşımlarının uygulamaları. a) Yapay diş, b) Yapay kalça protezi, c) Yapay kalp kapakçığı ve d) Yapay vasküler stentler

Titanyumun uygulamaya bağlı olarak çok sayıda alaşımı (Ti–Ni, Ti–6Al–4V, Ti–6Al–4V, Ti–6Al–7Nb, Ti–5Al–2,5Sn, Ti–2Al–2,5Zr, Ti–32Mo, Ti–Mo–Ni, Ti–Pd gibi) bulunmaktadır. Fakat en yaygın kullanılan Ti alaşımı Ti–6Al–4V (Ti-%6 Al-%4 V)'dir. İmplant malzemesi olarak Ti ve Ti alaşımlarının arzu edilen nitelikleri yüzeyinde bulunan oksit tabakasından ileri gelmektedir. Hava ile temas eden titanyum'un yüzeyinde birkaç nm kalınlığında kendiliğinden bir oksit tabakası oluşur (Şekil 2. 15, [150]). Mkemmek kimyasal inertlik, korozyon dayanımı ve hatta biyouyumluluğun titanyum oksit filmin kimyasal kararlılığından ve yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Oksit tabakası malzemeyi inert hale getirerek ve metalik iyonların difüzyonunu sınırlayarak titanyumu biyouyumlu hale getirir [148].

Sahip oldukları mkemmek özelliklerine rağmen Ti ve Ti alaşımları halen uzun dönemli klinik uygulamalar için yetersizdirler.



Şekil 2. 15. Saf titanyum yüzeyindeki oksit filmin şematik gösterimi (*Ti (IV): Çok değerlikli katyon)

2.2.1.1. Titanyum implantların kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan sorunlar

Titanyum implantların *in-vivo* uygulamalarında ortaya çıkan sorunlar:

1. Bakteriyel enfeksiyon ve
2. Protein adsorbsiyonu

olarak iki başlık altında sıralanabilir.

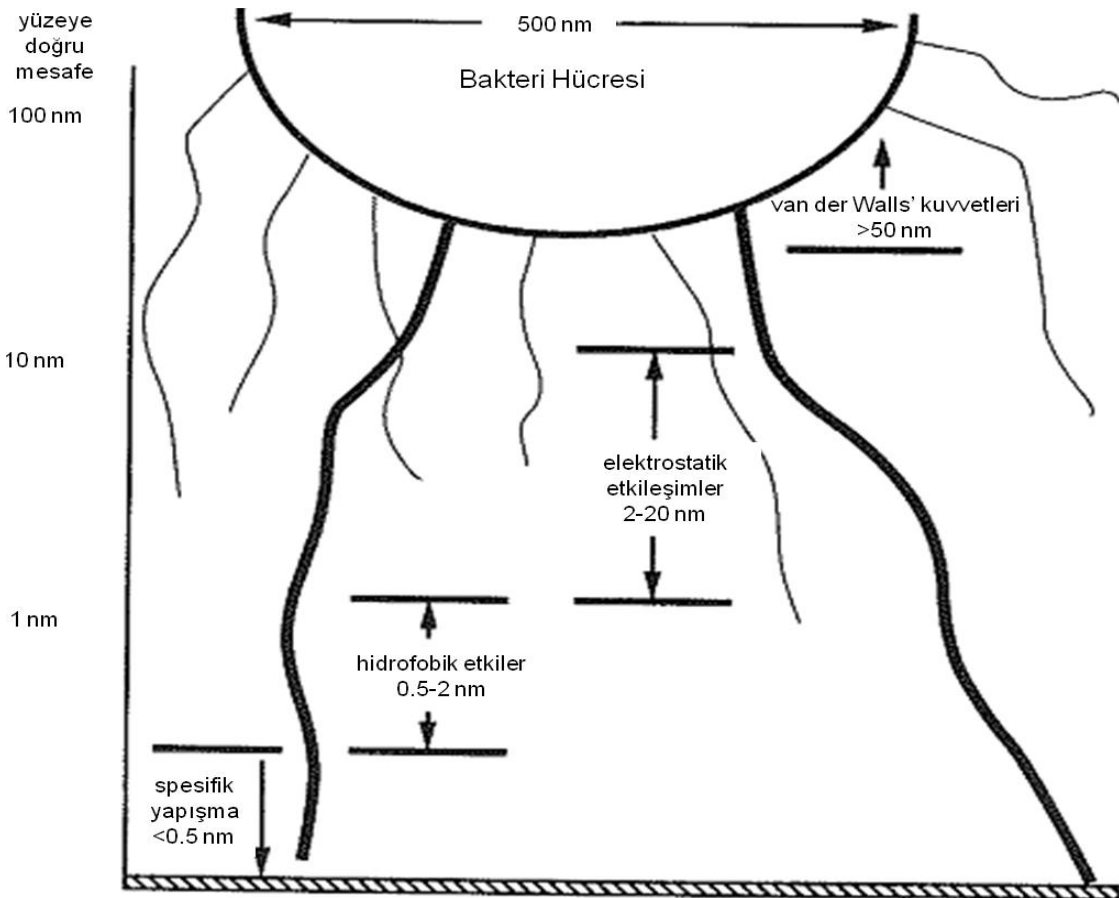
Genelde, vücut içi implant olarak kullanılan biyomalzeme yüzeyleri, bakterilerin tutunması ve kolonize olması için elverişli olup, oluşan bakteriyel biyofilm tabakası zamanla vücutta bir enfeksiyon kaynağına dönüşebilmektedir [151]. Biyofilm, değişik mikrobiyal türlerin kendilerini çevresel etkenlerden korumak ve besin kaynağını daha verimli kullanmak için oluşturdukları mikro-ekosistem olarak tanımlanabilir. İstatistiklere göre Amerika Birleşik Devletleri'nde hastane kökenli enfeksiyonların %65'inde biyofilm yapan bakteriler rol oynamakta ve bu durum yılda 1 milyar doların bu enfeksiyonların tedavisi için harcanmasına neden olmaktadır [152, 153]. İmplant bağlantılı enfeksiyonlarda en büyük paya *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) bakterilerinin sahip olduğu belirtilmektedir [154]. Bu bakteriler titanyum yüzeylere de kolaylıkla yapışır ve yayılırlar. Normal deri florasının ve mukus membranların bir parçası olan *S. epidermidis*;

- ❖ biyomalzeme takılırken
- ❖ cerrahi operasyon sırasında
- ❖ kirlenmiş antiseptiklerden
- ❖ hastanedeki diğer hastalardan
- ❖ belirsiz lokal enfeksiyonlardan

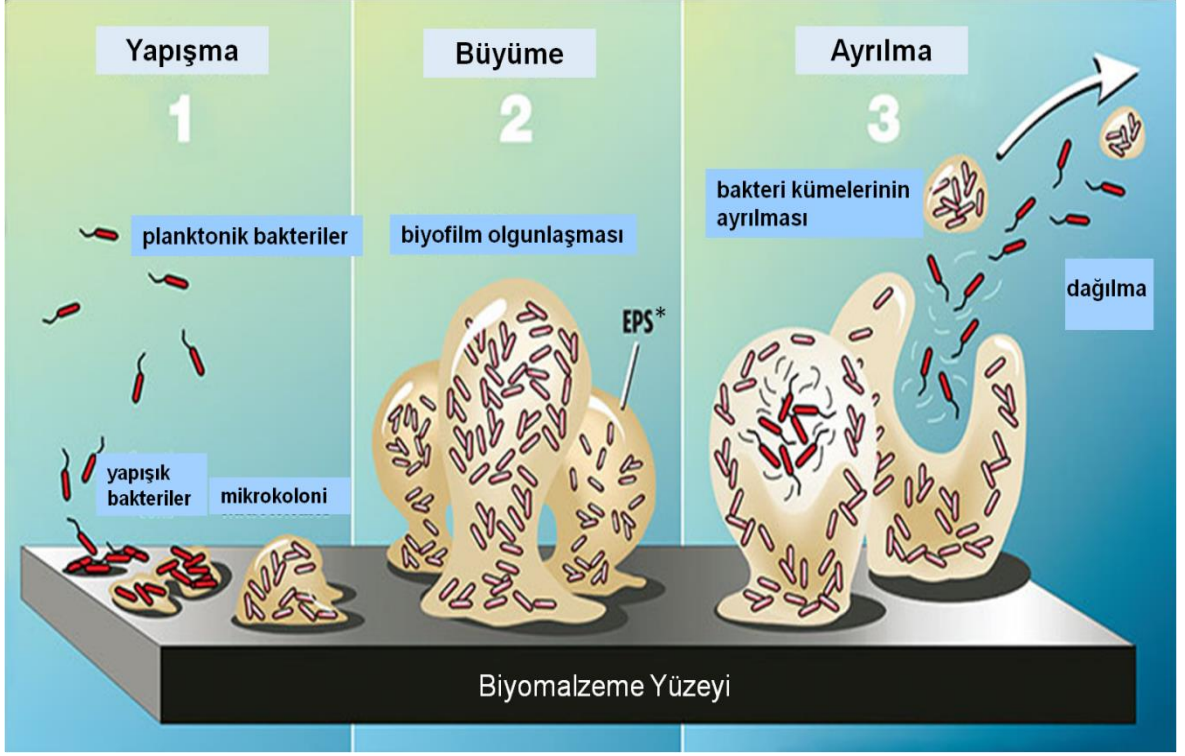
kaynaklanarak implantları etkileyebilmektedir [155].

Geçtiğimiz 20 yılda, tıbbi malzemelerin kullanımının artmasıyla *S.epidermidis*, hastane ve biyomalzeme kaynaklı enfeksiyonlarda en sık izole edilen bakteri durumuna gelmiştir [156]. Bu enfeksiyonların en önemli aşaması, bakterinin biyomalzeme yüzeylerine tutunması yani adezyondur. Bakteriyel adezyon iki aşamalı bir işlemdir; ilk aşama, çift yönlü (reversible) olup, genelde itici ve çekici fiziksel kuvvetlerin rol oynadığı tutunma aşamasıdır. Sıvı içerisinde serbest olarak Brownian hareketleri ile yer değiştiren planktonik bakteriler, van der Waals kuvvetleri, yüzey elektrostatik yükleri, hidrofobik, iyonik, dipol etkileşimi ve hidrojen bağları ile biyomalzeme yüzeyine yaklaşmakta ve yüzeye bu kuvvetli olmayan bağlarla bağlanabilmektedir (Şekil 2. 16) [153]. Fiziksel etkileşimler uzun menzilli (>50 nm) ve kısa menzillidirler (<5 nm). Bakteriler ilk olarak uzun menzilli etkileşimlerle malzeme yüzeyine hareket ederler. Bu etkileşimler hücreler ve yüzey arasında rol oynar ve spesifik değildir, mesafenin ve serbest yüzey enerjisinin bir fonksiyonudur. Daha yakın mesafede, daha baskın olan kısa menzilli etkileşimler

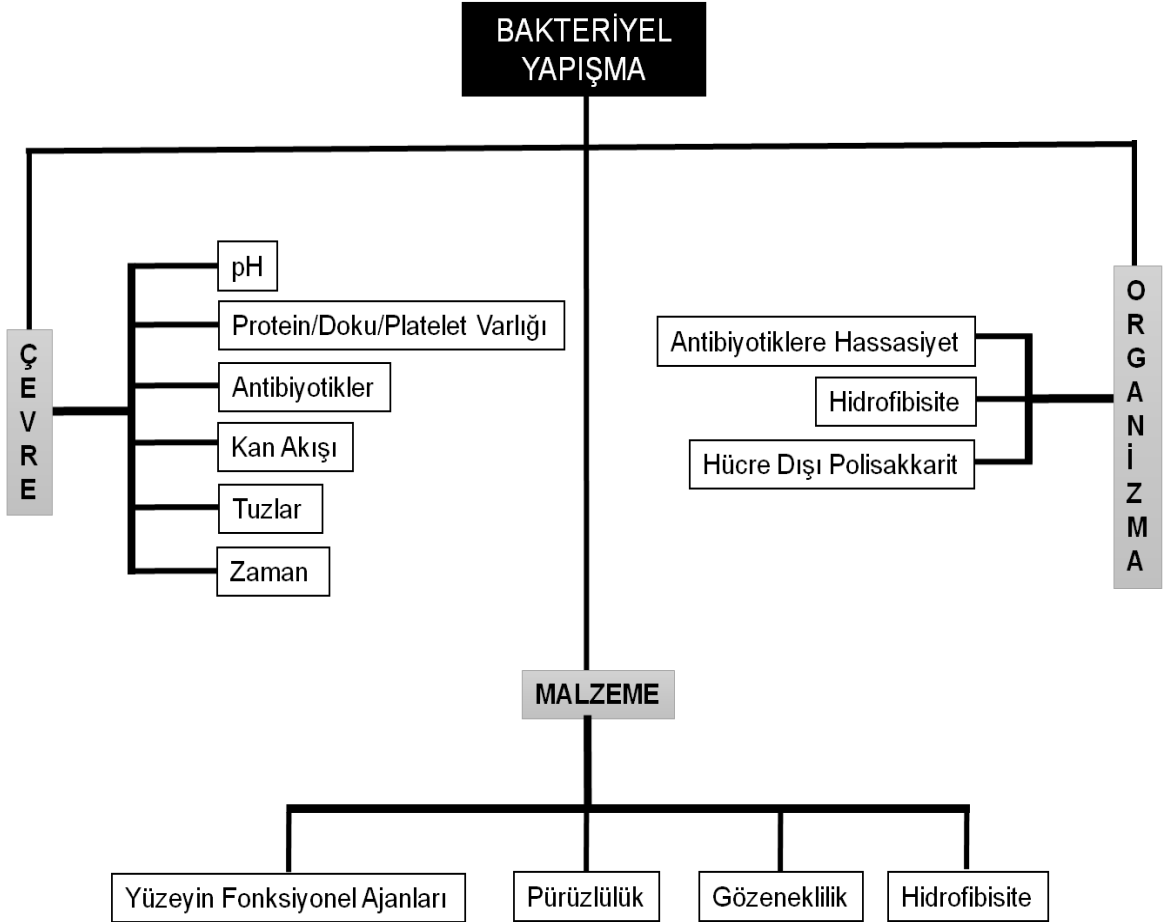
devreye girer [157]. Kısa menzilli etkileşimler hücre ve yüzey arasında meydana gelen hidrojen bağları, iyonik ve dipol etkileşimlerinin sonucu olarak ortaya çıkarlar. *S. epidermidis* bu yapışma sürecini düzenleyen birçok polisakkarit adezinlere sahiptir [158]. İkinci aşama ise zamana bağlı olup bakterilerin birbiri ile etkileşimi sonucu oluşan kuvvetli bağlarla birbirine bağlı çok katmanlı tabakaların meydana getirdiği biyofilmdir (Şekil 2. 17, [159]). Oluşan biyofilm tabakası, antibiyotiklere ve bağışıklık sistemi hücrelerine karşı koruyucu bir kalkan görevi görmekte ve bu tabaka kolaylıkla vücut içerisinden temizlenememektedir [160]. Çoğu zaman enfeksiyon kaynağı durumuna gelen biyofilm içeren biyomalzemeler, ancak vücuttan çıkarıldığı zaman tedavi başarılabilir. Bu durum ise hastayı hem maddi hem de tıbbi açıdan olumsuz etkilemektedir. Genel olarak, bakteri yapışmasını takip eden biyofilm oluşum aşamasında çevreye, malzemeye ve organizmaya bağlı birçok faktör etkili olabilmektedir (Şekil 2. 18, [161]). Fakat yapışma ve kolonileşme aşamalarının, tutunma aşamasına göre daha yavaş olduğu düşünülmektedir [162].



Şekil 2. 16. Hücre yapışmasında rol alan fizikokimyasal kuvvetler arasındaki boyutsal etkileşimler



Şekil 2. 17. Biyofilm oluşum süreci (*EPS: hücre dışı polisakkarit tabakası)



Şekil 2. 18. Bakteriye yapışmayı belirleyen faktörler

İmplantların ortaya çıkardığı bir diğer sorun da malzeme yüzeylerine proteinlerin adsorbsiyonudur. İmplant yüzeyleri vücuda yerleştirildiklerinde, ECM plazma proteinlerinin ve diğer biyomoleküllerin dahil olduğu konak plazma bileşenleri ile hızlı bir şekilde kaplanır [163]. Kanla temas eden implant yüzeyine plazma proteinlerinin adsorbsiyonu implant etrafında kan pıhtısının oluşumuna yol açan bir dizi kimyasal reaksiyonu tetikler. Protein adsorbsiyonu komplement sistemi harekete geçirerek yabancı cisim reaksiyonunu da ortaya çıkarır. Yabancı cisim reaksiyonu ile bağlantılı olan nötrofillerin ve makrofajların yapışması biyomalzeme yüzeyine yıkıcı enzimlerin, süperoksit anyonların ve hidrojen peroksitin hücum etmesine yol açar [164]. Bununla beraber protein adsorbsiyonu implant yüzeyinde bakteri kolonileşmesini de teşvik eder. Biyomalzeme yüzeyine adsorbe olan ve bakterilerin hücre membranı ile etkileşen proteinlerin (fibronektin ve fibrinojen gibi) mikrobiyal yapışma ve biyofilm oluşumu sürecinde büyük bir etkisinin olduğu gösterilmiştir [165].

2.2.2. Titanyum İmplantların Modifikasyonu

İmplantların yüzeylerinde protein yapışmasından başlayarak biyofilm oluşumuna giden sürecin önüne geçilmesi implantın başarısı açısından son derece önem arz etmektedir. Bu nedenle, en çok kullanılan implant olan titanyumun da dahil olduğu malzemelerin yüzey özelliklerinin değiştirilmesi ve geliştirilmesine yönelik bir dizi yüzey işlemleri uygulanmaktadır (Çizelge 2.5). Biyomedikal amaçlı kullanılan metallere ve alaşımlara yüzey işlemlerinin uygulanmasını gerektiren diğer nedenler de şu şekilde sıralanabilir [147]:

- Malzeme yüzeyini implantasyon öncesi kontaminasyonlardan arındırmak
- Özellikle eklem uygulamalarında, aşınma oranını düşürmek için implantın sertliğini arttırmak
- Vücut ortamına aşırı iyon salımını önlemek için pasif tabaka eklemek
- İmplantın yorulma mukavemetini arttırmak

Biyomalzemelerin yüzey özelliklerini kontrol etmek amacıyla yüzeylerin kaplanmasında organik ince filmler ve özellikle polimerler çok ilgi çekmektedir. Çünkü polimerik kaplamalar, biyomalzeme-doku etkileşimlerini kontrol etmek amacıyla yüzeye dahil edilebilen çok yönlü kimyasal gruplara ve aynı zamanda yumuşak dokulara benzer mekanik özelliklere sahiptirler. Biyomalzeme yüzeyleri sıcak daldırma ile kaplama (dip-coating), spreycaplama, döndürmeli-kaplama,

çözücü döküm ve yamalama (graft) gibi basit teknikler kullanılarak polimerlerle (polietilen glikol, selüloz asetat, polipropilen, naylon6 ve polistiren gibi) kaplanabilmektedir [166].

Çizelge 2. 5. Ti implant yüzeylerinin modifiye edilmesinde kullanılan yöntemler

Yüzey Modifikasyon Teknikleri			
Fiziksel Yöntemler	Kimyasal Yöntemler	Mekanik Yöntemler	Biyolojik Yöntemler
Termal Püskürtme	Asit Muamelesi	Makinede İşleme	Protein Adsorbsiyonu
Plazma Püskürtme	Alkalin Muamelesi	Taşlama	Biyomoleküllerin İmmobilizasyonu (enzimler, ilaçlar)
Fiziksel Buhar Biriktirme	Sol-Jel Muamelesi	Parlatma	
İyon İmplantasyonu	Anodik Oksidasyon	Kabartma	
Akkor Boşalma Plazma Muamelesi	Kimyasal Buhar Biriktirme		
Yüzey Aktif Maddeleriyle Kaplama			
Polimerlerle Kaplama			

2.2.2.1. Titanyum implantların PEO/PEG ile modifikasyonu

Polietilen oksit (PEO) veya polietilen glikol (PEG), geniş bir molekül ağırlığı aralığına sahip sentetik bir poliesterdir (Şekil 2. 19 a). $M_w < 100,000 \text{ g mol}^{-1}$ olanlar genellikle PEG olarak adlandırılırken daha yüksek molekül ağırlığında olanlar PEO olarak sınıflandırılır ve molekül ağırlığı $8.000.000 \text{ g mol}^{-1}$ değerine kadar çıkabilir. Bu polimerler amfifiliktir ve suda ve organik çözücülerde (metilen klorür, toluen, aseton, kloroform, diklorometan/dimetilformamid) çözünebilirler. Diğer suda çözünür polimerlerle karşılaştırıldığında PEO'nun lineer yapısı, iyonik olmayan karakteri ve suda çözünürlüğü eşsizdir [167, 168]. Polimer ana zincirindeki elektronca zengin oksijen su ile hidrojen bağlayıcı bir bölge sunar ve böylelikle suda çözünürlüğü önemli derecede artırır. Düşük molekül ağırlıklı ($M_w < 1,000$) PEG'ler viskoz ve renksiz sıvılarken, daha yüksek molekül ağırlıklı olanlar mum gibi veya beyaz toz şeklindedirler (Şekil 2. 19 b ve c). Düşük toksisiteye, iyi kararlılığa ve iyi kayganlaştırıcı etkiye sahiptirler. Erime sıcaklığı 65°C ve camsı geçiş sıcaklığı $-45\text{--}53^\circ\text{C}$ arasında değişmektedir. PEO'lar seramiklerde,

kozmetikte, ilaçlarda, elektronik ve diğer uygulamalarda kullanılmaktadır (Çizelge 2.6) [169]. PEO, gen tedavisi, antijenlerin maskelenmesi, omurilik hasarlarının ve motor nöronların tedavisi [170, 171] ve daha çok sayıdaki klinik uygulamalarda kullanım ve araştırma alanı bulmuştur.



Şekil 2. 19. a) PEO'nun kimyasal yapısı, b) ve c) Molekül ağırlıklarına göre değişen PEG/PEO polimerinin fiziksel görünüşleri

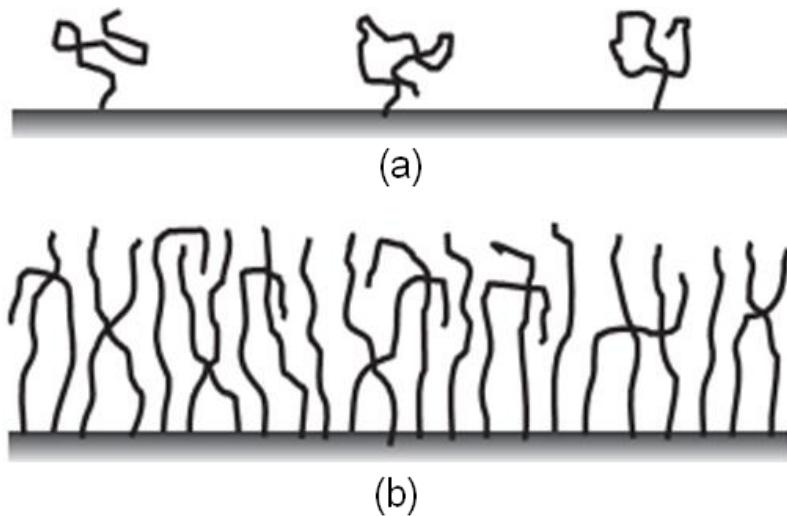
Ti implantlarda protein adsorpsiyonunu, bakteriyel yapışmayı, biyofilm oluşumunu ve ayrıca biyomalzeme yüzeylerindeki enfeksiyonları azaltma yaklaşımlarında PEG/PEO tabanlı kaplamalar gibi hidrofilik zincirlerle yüzeylerin modifikasyonu sıklıkla uygulanmaktadır [10, 172]. PEG ile yüzeylerin kaplanmasında aşağıdaki teknikler öne çıkmaktadır [166]:

- Kısa oligomerlerin SAMs (kendi kendine düzenlenen tek tabakalar)'lerinin kullanımı
- Pluronik olarak da bilinen PEO-blokpoli(propilen oksit)-blokpoli(etilen oksit) üçlü blok kopolimerlerinin adsorpsiyonu
- Yüzeye yamalanmış PEG fırçalar
- Çeşitli çapraz bağlama teknikleri kullanılarak ince film hidrojelilerin elde edilmesi

İmplant yüzeylerinin PEG ile kaplanmasında genel yöntem PEG fırçalarının kullanılmasıdır. Düşük yoğunluktaki PEO zincirleri mantar etkisiyle, yüksek yoğunluktaki PEO zincirleri ise fırça etkisi ile yüzeyi etrafındaki ortamdan korur (Şekil 2.20).

Çizelge 2. 6. PEO'nun bazı uygulama alanları

Biyomedikal Uyg.	Kimyasal Uyg.	Kozmetik ve Diğer Uyg.
Protein ilaçların kaplanmasında	Gaz kromatografisinde polar durağan faz olarak	Vücut kremlerinde
Sulu/susuz ortamlardaki yüzeyler için kayganlaştırıcı kaplama olarak	Elektronik test cihazlarında ısı transfer sıvısı olarak	Diş macunlarında dağıtıcı olarak
<i>In-vivo</i> kullanımlarda siRNA'nın paketlenmesinde	Lityum polimer hücrelerinde ayırıcı ve elektrolit çözelti olarak	Gıdalarda köpüklenmeyi önlemek amacıyla
Gen terapi vektörlerinin immün sistem tarafından tanınmaması için kaplanmasında	Denizden çıkarılan enkazların korunmasında	
Monoklonal antikor üretiminde B-hücreleri ile myeloma hücrelerinin kaynaşmasında		
Oral uygulamalar (göz damlalarında kayganlaştırıcı)		
Plazmid DNA izolasyonunda ve proteinlerin kristalizasyonunda çöktürücü olarak		
Virüslerin çoğaltılmasında çöktürücü olarak		
Eczacılık ürünlerinde (kayganlaştırıcı, kaplama maddesi, tablet bağlayıcı vb olarak)		



Şekil 2. 20. Polimer zincirlerinin a) Mantar etkisi ve b) Fırça etkisini ifade eden şematik gösterim

2.2.2.2. PEO kaplı titanyum implantlarda bakteriyel yapışma

PEO ve türevleri protein ve hücre yapışmasına karşı doğal dirençlidirler [173, 174]. PEO, aynı zamanda, bakteriyel yapışmayı da engeller. İmplant yüzeyine kaplanan PEO'nun polimer zincirleri sterik bir itme ile yüksek bariyer görevi görerek yüzeyi protein ve bakteri/hücre adsorbsiyonuna karşı korumaktadır. Ayrıca PEO'nun su molekülleriyle oluşturduğu çok sayıdaki hidrojen bağı osmotik bir itmeye yol açarak yüksek miktarda itici kuvvet ortaya çıkarmakta ve bu sayede yapışma kısıtlanmaktadır. Bu ortam biyolojik sistemlerin içinde bulunan tipik koşulları taklit etmektedir. Hidrofilik kaplı implantların biyoyumluluklarına da en büyük katkıyı bu durumun sağladığı düşünülmektedir [175]. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin yapışmasının yüzeylere immobilize edilen PEG ve oligo(etilen glikol) tarafından önemli ölçüde azaltıldığı ifade edilmiştir [176, 177]. Bakteri yapışmasının azalma derecesi bakteri türüne, *in-vitro* kültür ortamına ve özellikle PEO'nun molekül ağırlığı, zincir yoğunluğu ve PEO zincirlerinin uçlarına bağlı fonksiyonel grupların türü gibi yüzey karakteristiklerine bağlı olarak değişmektedir. PEG'e dayalı kaplamaların, protein adsorbsiyonuna direnci de çok sayıda çalışmayla gösterilmiştir [178-180]. Farklı polimer ağlarına sahip iskelelerin kullanıldığı bir çalışmada, protein adsorbsiyonunun, *S. epidermidis* ve platelet yapışmasının PEG'in molekül ağırlığının ve miktarının artması ile %90'a kadar azaltıldığı belirlenmiştir [181]. Cam yüzeylere kovalent olarak immobilize edilen PEO fırçalarının *S. epidermidis*'in de dahil olduğu birçok bakteri ve maya türü üzerindeki yapışmayı engelleyici etkisi incelenmiş ve PEO fırçalarla kaplanmış cam yüzeylerin kaplanmamışlara göre %98 oranında yapışmayı engellediği gösterilmiştir. Cam yüzeylere göre PEO kaplı yüzeylerin, yüzey ve mikroorganizmalar arasındaki Lifshitz–Van der Waals çekimini yedi kat azalttığı hesaplanmıştır [182]. Diğer bir çalışmada, üç boyutlu baskılama ile üretilmiş PLGA/PEO doku iskelelerinde artan PEO derişimine bağlı olarak fare osteoblast hücrelerinin yapışmasının, çoğalmasının ve göçünün azaldığı belirtilmiştir [183].

2.2.2.3. PEO kaplı titanyum implantların dokuyla entegrasyonu

Bakteri ve proteinlerin yanında PEO gibi hidrofilik yüzeylerin hücresel yapışmayı da engellemesi Ti implantların başarısında önleyici bir sorun teşkil etmektedir. İmplantların biyolojik olarak kabulünü arttırmak ve implant sonrası iyileşmeyi ve

entegrasyonu geliştirmek için, metalik implant malzemesi ve konak hücreler arasındaki spesifik bağlanma etkileşimlerini arttırmak gerekmektedir. Bu bakımdan ek modifikasyonlara ihtiyaç vardır. Bu amaçla ECM proteinlerinin kullanılması sıklıkla kullanılan bir teknik olarak öne çıkmaktadır. Yüzeyler üzerinde integrin reseptörleri aracılığıyla yapışma ve çoğalmanda etkili olan fibronektin veya fibrinojen gibi proteinlerin kullanılması, birçok bakterinin de bu proteinler vasıtasıyla implant yüzeyine yapışmasına yol açmaktadır [9, 165, 184]. Örneğin, *S. aureus* and *S. epidermidis* fibronektine doğrudan bağlanan tanıyıcı bölgelere sahiptir [185, 186]. Bununla birlikte, fibronektin ve fibrinojen gibi birçok proteinde yer alan RGD motifinin, hücre yüzey integrin reseptörleriyle özel olarak etkileştiği bilinmektedir. Bu motif *S. aureus* and *S. epidermidis* bakterileri tarafından tanınmaz [187]. Böylece RGD motifi ile yüzeylerin fonksiyonel hale getirilmesi osteoblastların fonksiyonlarını arttırırken bakteriyel yapışmayı sağlamaz. Harris ve ark. [9, 187] RGD ile modifiye edilen polilisin-graft-PEG (PLL-g-PEG) polimerlerini titanyum substratlara adsorbe etmişler ve bakteriyel yapışmanın PLL-g-PEG yüzeylerde ve RGD içeren PLL-g-PEG yüzeylerde önemli ölçüde engellendiğini gözlemişlerdir. Bunun yanında, RGD ile modifiye edilen yüzeylerde fibroblast ve osteoblast hücre yapışması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Polimetakrilik asit fırçalarla ve ipek serisinle modifiye edilen titanyum yüzeyler, *S. aureus* and *S. epidermidis* yapışmasını azaltıcı etki gösterirken, osteoblast yapışmasını, çoğalmasını ve ALP aktivitesini arttırmıştır [188]. PEG fırçalar kemik ve diş implantlarının osteobütünleşmesini teşvik etmek için hücre yapıştırıcı proteinlerle işlevselleştirilmiştir [189]. Diğer bir çalışmada Ti üzerine kaplanan kitosan ve hyaluronik asitin polielektrolit çoklu tabakalarının yüksek derecede antimikrobiyal etki gösterdiği, fakat kemik hücrelerinin yapışmasının normal titanyumlara göre daha zayıf olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte tabakalara RGD motifinin eklenmesi ile osteoblast yapışması önemli ölçüde artmıştır [8].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiş olan deneysel çalışmalar ile ilgili bilgiler verilmiştir. Deneysel çalışmalar iki ana bölümde incelenmiştir. İlk bölümde, kitosan (CS) ve polikaprolakton (PCL) membranların üretimleri ve bunların elektroğirilmiş CS, PCL ve PCL/kollajen (PCL/Col) nanofiberler ile çeşitli düzende (gelişigüzel ve düzgün hizalanmış) desenleme çalışmalarına yer verilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları ile uygun koşulların belirlenmesinin ardından, desenlenmiş yüzeylerde MC3T3-E1 preosteoblast ve Madine Darby Bovine Kidney (MDBK) hücreleri ile durgun koşullarda yürütülen hücre kültür çalışmalarına ve nanotopografinin hücre davranışlarına olan etkisini incelemeye yönelik çalışmalara değinilmiştir.

İkinci bölümde ise, elektroğirme ile polietilen oksit (PEO) nanofiberlerin üretilmesine ve çapraz bağlanmasına yönelik çalışmalar açıklanmıştır. Uygun koşulların belirlenmesinin ardından bu koşullarda PEO nanofiberler ile titanyum (Ti) yüzeylerin kaplanması gerçekleştirilmiştir. Son aşamada ise, PEO fiberlerle kaplı Ti yüzeylerle MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri ve biyofilm oluşturan *S. epidermidis* bakteri suşu kullanılarak durgun koşullarda yürütülen kültür çalışmalarına yer verilmiştir.

3.1. Kitosan ve PCL Membranların Elektroğirilmiş PCL ve PCL/Kollajen Nanofiberlerle Desenlenmesi, Karakterizasyon ve Hücre Kültür Çalışmaları

Sunulan tez çalışmasının bu kısmında, CS ve PCL membranların elde edilmesine, nanofiber üretimine, membranların desenlenmesi çalışmalarına ve desenlenmiş yüzeylerin karakterizasyonuna yönelik çalışmalara yer verilmiştir. Ayrıca desenlenmiş yüzeylerdeki hücresel davranışların incelenmesine yönelik olarak gerçekleştirilen deneysel çalışmalar açıklanmıştır.

3.1.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

CS membranların hazırlanmasında kullanılan ve %75-85 aralığında deasetilasyon derecesine sahip olan kitosan (medium M_w), asetik asit, CS membranların kararlı hale getirilmesinde ve çapraz bağlanmasında kullanılan sodyum hidroksit (NaOH) ve epiklorohidrin (ECH) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. PCL membranların hazırlanmasında ve nanodesenleme çalışmalarında kullanılan polikaprolakton (M_n : 70-90 kDa, $M_w/M_n < 2$), kollajen (Tip I, katalog no: C9791), tetrahidrofuran (THF), hekzafloroizopropanol (HFIP) Sigma-Aldrich (Almanya),

trifloroasetik asit (TFA) ise Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), fetal sığır serum (FBS), tripsin ve Dulbecco's phosphate buffer (DPBS) Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Minimum Essential Medium- α (α -MEM) Hyclone (İngiltere) firmasından temin edilmiştir. Hücre üremesinin takibinde kullanılan 3-[4, 5-dimetilthiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT), izopropanol ve tripan mavisi Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücrelerin SEM ile morfolojik analizleri için kullanılan hekzametil disilazan (HMDS) ve glutaraldehit (GA) Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Konfokal Mikroskop incelemesi için gerekli olan Triton-X 100 ve propidyum iyodür Sigma (Almanya) firmasından, Alexa Fluor 488 Phalloidin ise Invitrogen (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Kültür çalışmalarının gerçekleştirileceği polistiren kültür kapları (Orange Scientific, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Çapraz Bağlı Kitosan Membranların Hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan gözeneksiz CS membranlar çözücü döküm yöntemiyle hazırlanmıştır. Asetik asit çözeltisinde (%2'lik, v/v) çözülen CS (%2'lik w/v) polistiren Petri kaplarına dökülmüş ve oda sıcaklığında kurutularak CS membranlar elde edilmiştir. Elde edilen bu membranlar 1 gece süreyle 1N NaOH (%50 v/v distile su/etanol) içerisinde bekletilerek kararlı hale getirilmişlerdir. Saf su ile yıkanan membranlar çapraz bağlama işlemi için 0.067 M NaOH (pH: 10) içeren 0.01 M epiklorohidrin çözeltisi içerisinde 2 saat boyunca 50°C sıcaklıkta bekletilmişlerdir. Saf su ile yapılan yıkama işleminin ardından kurutulan membranlar desikatörde muhafaza edilmiştir.

3.1.3. Kitosan Membranların Elektroeğirme ile Desenlenmesi

Çapraz bağlı CS membranların üzerindeki desenleme çalışmaları elektroeğirme ile üretilmiş CS, PCL ve PCL/Col fiberler ile yürütülmüştür. Bu amaçla laboratuvarımızda mevcut, Şekil 2. 9'da şematik olarak gösterilen elektroeğirme düzeneği kullanılmıştır. Uygun çözücülerde çözünen polimerlerden fiberlerin elde edilebilmesi için çözücü türü, derişim, uygulanan voltaj, şırınga-toplayıcı mesafesi ve akış hızı parametrelerinin optimizasyonuna yönelik çalışmalar yapılmıştır. Elektroeğirme tekniği ile elde edilen nanofiberler CS membranlar üzerinde toplanarak desenlenmiş CS yüzeyler elde edilmiştir.

3.1.3.1. Kitosan membranların kitosan nanofiberler ile desenlenmesi

Kitosan nanofiberlerin elde edilmesi amacıyla yapılmış olan çalışmalar ve çalışma koşulları Çizelge 3.1'de belirtilmiştir. CS fiberlerin üretilebilmesi amacıyla Çizelge 3.1'de belirtilen oranlarda CS çözücüyeye eklenmiş ve oluşan karışımın manyetik karıştırıcıda bir gece süreyle çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işleminin ardından, çözelti 0.8 mm çapında metal iğneye sahip 2.5 mL'lik plastik şırıngaya (Ayset Plastik, Türkiye) çekilerek fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. CS membranlar elektroöğirme düzeneğindeki sabit toplayıcıya yerleştirilerek üzerleri gelişigüzel düzendeki CS fiberler ile desenlenmiştir. Elektroöğirme işlemi oda koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 1. Kitosan nanofiberlerin üretimi için incelenen sistem parametreleri

Polimer/ Desen Türü	Çözücü	Derişim (w/v)	Voltaj (kV)	Toplayıcı Mesafesi (cm)	Akış Hızı (mL sa ⁻¹)
Kitosan/ Gelişigüzel Düzen	HFIP	%1.0	10	8.0	0.50
	TFA	%2.0	15; 17; 19; 20; 21; 22	10.0	1.20
		%2.7	20; 21; 22; 23; 24	6.4	0.20
					0.50
					0.70
					1
					1.2
	TFA/DCM (70/30, v/v)	%5.0	15	10.0	0.15
TFA/DCM (80/20, v/v)	%10.0	16	12.0	0.20	

3.1.3.2. Kitosan membranların polikaprolakton nanofiberler ile desenlenmesi

Gelişigüzel ve hizalanmış düzende PCL nanofiberlerin elde edilmesinde en uygun koşulların belirlenmesi için incelenen sistem parametreleri Çizelge 3.2'de verilmiştir. PCL nanofiberlerin üretilebilmesi amacıyla Çizelge 3.2'de belirtilen oranlarda PCL pelletler çözücüyeye eklenmiş ve oluşan karışımın manyetik karıştırıcıda bir gece süreyle çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işleminin ardından, çözelti plastik şırıngaya çekilerek fiber üretimi gerçekleştirilmiştir.

Gelişigüzel düzendeki PCL fiberlerin toplanması CS fiberlerin üretiminde kullanılan sabit toplayıcıda gerçekleştirilmiştir, hizalanmış düzendeki fiberler ise Şekil 4. 10 a'da gösterilen tekerlek tipi toplayıcıya sabitlenmiş CS membranlara toplanmıştır. Elektroçirime işlemleri oda koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 2. PCL nanofiberlerin üretimi için incelenen sistem parametreleri. a) Gelişigüzel düzende ve b) Hizalanmış düzende desenleme parametreleri

a.

Polimer/ Desen Türü	Çözücü	Derişim (w/v)	Voltaj (kV)	Toplayıcı Mesafesi (cm)	Akış Hızı (mL sa ⁻¹)
PCL/ Gelişigüzel Düzen	DCM/DMF (50/50, v/v)	12	22.5	35	2.0
	HFIP	8	12	10	0.1
			11; 12; 13		2.0
		10	8	6; 10; 14; 18; 22	0.6
			10		
			12		
			14		
			18	20; 22	
			20; 22	22	
			8; 10; 11; 12; 13 14; 15; 20; 22	6; 7; 8; 10; 14; 18 20; 22	2.0
		22	20	4.0	
		20	20; 25; 35		
		22.5	35		

b.

Polimer/ Desen Türü	Çözücü	Derişim (w/v)	Voltaj (kV)	Toplayıcı Mesafesi (cm)	Akış Hızı (mL sa ⁻¹)	Toplayıcı Dönüş Hızı (rpm)
PCL/ Hizalanmış Düzen	HFIP	10	11	10	0.1	2,400
			18	18	1.5	
			11	10	2.0	2,000
			15	12		2,400
			18	18		
				20		

3.1.3.3. Kitosan membranların polikaprolakton/kollajen nanofiberler ile desenlenmesi

Elektroğirme tekniği ile gelişigüzel ve hizalanmış düzende PCL/Col nanofiberlerin elde edilmesi amacıyla, sistem parametrelerinin optimizasyonu için yapılan çalışmalar izelge 3.3'te verilmiştir. PCL/Col fiberlerin üretilebilmesi amacıyla, 10 mL HFIP özücüsü içerisine 0.55 g PCL ve 0.25 g Col eklenerek bir gece süreyle karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Çözünme işleminden sonra, yukarıda belirtilen şekilde gelişigüzel ve hizalanmış düzende fiber üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 3. PCL/Col nanofiberlerin üretimi için incelenen sistem parametreleri

Polimer-Desen Türü	Voltaj (kV)	Toplayıcı Mesafesi (cm)	Akış Hızı (mL sa ⁻¹)	Toplayıcı Dönüş Hızı (rpm)
PCL/Col-Gelişigüzel Düzen	20	20	0.5	-
	12	13	0.75	
	15		2.0	
			3.0	
	20	10	3.0	
PCL/Col-Hizalanmış Düzen	20	20	0.5	2,400
	11	10	0.1	
	15	13	3.0	

3.1.4. Polikaprolakton Membranların Hazırlanması

PCL membranların hazırlanmasında çözücü döküm yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla 10 g ağırlığındaki PCL pelletler 100 mL THF'de bir gece süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, sonrasında oluşan çözelti cam Petri kaplarına dökülerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmışlardır. Kurutulan membranlar, Petri kaplarından alınarak desikatörde muhafaza edilmiştir.

3.1.5. Polikaprolakton Membranların Polikaprolakton Nanofiberler ile Desenlenmesi

PCL membranların PCL nanofiberlerle desenleme için CS membranların gelişigüzel düzende desenlenmesinde kullanılan 12 mL sa⁻¹, 22.5 kV ve 35 cm koşulları ve düzgün hizalanmış düzende desenlenmesinde kullanılan 0.1 mL sa⁻¹, 11 kV ve 10 cm koşulları kullanılmıştır.

3.1.6. Kitosan ve Polikaprolakton Yüzeylerin Karakterizasyonu

Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS ve PCL membranların yüzey morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, FEI Quanta 200 FEG, USA) ile analiz edilmiştir. Desenlerin fiziksel yapısının (çap ve düzenlenmesi) incelenmesi amacıyla yapılan analizlerde, örneklerin yüzeyi altın-paladyum tabakası ile kaplandıktan sonra SEM görüntüleri alınmıştır. SEM çalışmalarının sonuçlarına göre hücre kültür uygulamalarında kullanılacak desenlenmiş membranların hazırlanması için gerekli koşullar belirlenmiştir. Fiberlerin ortalama çapları ImageJ yazılımı (NIH, Bethesda, MD, USA) ile SEM görüntülerinden hesaplanmıştır. Çaplar, ortalama±standard sapma olarak belirtilmiştir.

Fiberlerin kimyasal yapılarının ve kollajenin PCL yapısına katılımının belirlenebilmesi amacıyla, Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış kızılötesi spektroskopisi (FTIR-ATR, Nicolet-iS10 FTIR spectrophotometer, Thermo Scientific, MA, ABD) kullanılmıştır. Spektrumlar 4 cm^{-1} çözünürlükte, $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ dalga frekansı aralığında kaydedilmiş ve Thermo Electron Corporation, Omnic yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.1.7. Hücre Kültür Çalışmaları

Bu bölümde, desenlenmiş CS ve PCL membranlar üzerinde hücre davranışlarının incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarına yer verilmiştir.

3.1.7.1. Çalışmalarda kullanılan hücre hatları

Hücre kültür çalışmaları iki farklı morfolojiye sahip hücre türü ile yürütülmüştür. Şap Enstitüsü Hücre Kültür Koleksiyonu'ndan (HÜKÜK) sağlanan epitel morfolojiye sahip Madine Darby Bovine Kidney (MDBK, HÜKÜK, Türkiye No: 95121801, ikilenme süresi: 22 saat) hücreleri için %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin içeren DMEM besi ortamı kullanılmıştır. Fibroblastik morfolojiye sahip MC3T3-E1 hücreleri için (No: RCB1126 Riken Hücre Bankası, Japonya, ikilenme süresi: 36 saat) ise %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin içeren α -MEM besi ortamı kullanılmıştır. Hücreler 37°C 'de %5 CO_2 içeren etüvde (Heraeus Instruments, Almanya) inkübe edilmiştir.

3.1.7.2. Kitosan ve polikaprolakton yüzeyler ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları

Tez kapsamında hazırlanan desenlenmiş membranlar Parafilm kaplı 24-gözlü Petri kaplarına yerleştirildikten sonra 15 dakika UV altında, ardından 1 saat süre

ile %70 etanol içerisinde sterilizasyon işlemine tabii tutulmuştur. Steril membranlar bir gece boyunca koşullandırılmış ortamda bekletilmiştir. Üretildikleri kültür kaplarından tripsinizasyon ile ayrılan hücreler, besi ortamı içerisinde 5×10^4 hücre mL^{-1} derişiminde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonundan 1'er mL alınarak steril CS membranların bulunduğu Petrilere aktarılmıştır. Desenlenmemiş membranlar kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Hücre yapışmasının ve üremesinin incelenmesi

Hücrelerin desenlenmiş ve desenlenmemiş CS ve PCL membranlara yapışmasının incelendiği çalışmalarda, 2., 4., 8. ve 24. saatte membranların üzerindeki hücre süspansiyonu uzaklaştırılmış ve yüzeye yapışmayan hücrelerin tripan mavisini boyama yöntemi ile *Neubauer* hücre sayım lamı kullanılarak sayımı yapılmıştır. Elde edilen sayım değeri başlangıç hücre sayısından çıkartılarak yüzeye yapışan hücre sayısı bulunmuştur.

MC3T3-E1 ve MDBK hücrelerinin membranlar üzerindeki üreme davranışlarının incelendiği çalışmalarda ise, hücre üremesi MTT analizleri ile takip edilmiştir. Deneyler Parafilm kaplı 24-gözlü Petri kaplarında steril membranlar ile gerçekleştirilmiştir. Besi ortamı içerisinde 5×10^4 hücre mL^{-1} derişiminde hazırlanan hücre süspansiyonundan 1'er mL alınarak membranların bulunduğu Petrilere aktarılmıştır. Üreme deneyleri 37°C 'deki %5 CO_2 içeren etüvde gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (24, 48 ve 72 saat) besi ortamı uzaklaştırılarak yüzeylere 600 μL MTT çözeltisi (%10 MTT, 5 mg mL^{-1} derişiminde) eklenmiş ve örnekler 37°C 'de, 3 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, her bir örneğin üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve örnekler başka bir 24 gözlü kültür kabına aktarılmıştır. Oluşan formazan kristallerini çözmek amacıyla her bir göze CS membranlar için 400 μL izopropanol+100 μL sodyum dodesil sülfat, PCL membranlar için ise 500 μL DMSO eklenmiştir. Elde edilen çözelti 96-gözlü ELISA kabına (200 μL /göz) aktarılmış ve mikropilaka okuyucu (ASYS Hitech UVM 340 Plate Reader, Avusturya) kullanılarak 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans ölçümü yapılmıştır.

Hücre morfolojisinin SEM ile analizi

Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS ve PCL membran yüzeylerinde hücrelerin morfolojisini ve organizasyonunu incelemek amacıyla 2., 12. ve 24. saatlerde SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Belirlenen sürelerde membranların üzerindeki besi

ortamı uzaklaştırılarak DPBS ile 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. SEM analizi öncesinde hücrelerin yüzeylere sabitlenmesi için membranlar %2.5 GA çözeltisinde 30 dakika süreyle bekletilmiştir. Daha sonra membranlar dehidrasyon işlemi için bir dizi etanol çözeltisi içerisine yerleştirilmiştir. Membranlar sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %96 etanol çözeltilerinde 2'şer dakika bekletildikten sonra HMDS içerisinde 5 dakika süreyle bekletilmiştir. Membranlar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra SEM analizi öncesinde altın-palladyum ile kaplanmıştır.

Hücre iskeletinin konfokal mikroskopu ile analizi

Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS ve PCL membran yüzeylerde hücre iskeleti organizasyonu konfokal mikroskopu ile değerlendirilmiştir. Hücre ekimi sonrasındaki 12. saatte membranların üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış, membranlar DPBS ile yıkanmış ve %2.5 GA çözeltisinde hücrelerin sabitlenmesi için 10 dakika süreyle bekletilmiştir. Membranlar, sabitleme işleminin ardından %0.1 Triton-X 100 ile 5 dakika süreyle muamele edilerek hücre membran geçirgenliği artırılmıştır. Hücrelerin iskeletsel filamentöz aktinleri (F-aktin), BSA/PBS çözeltisi içerisinde hazırlanmış %2.5'lik (v/v) Alexa Fluor 488 Phalloidin ile 20 dakika süreyle muamele edilerek boyanmıştır. Ardından hücre çekirdeklerinin boyanması için membranlar 5 dakika süreyle 200 µL propidyum iyodür ile muamele edilmiştir. Membranlar %1 BSA içeren DPBS ile yapılan yıkama işleminin ardından Konfokal Lazer Taramalı Mikroskopu (CLSM, Zeiss LSM 510, Almanya) kullanılarak incelenmiştir.

3.1.8. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonuçları Graph-Pad Software InStat programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için *Tukey-Kramer Multiple Comparison Test* kullanılmış ve $p < 0.05$ olduğu durum istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.2. Polietilen Oksit Nanofiberler ile Titanyum Yüzeylerin Kaplanması ve Hayvansal Hücre/Bakteri Kültürleri

Tezin bu basamağında, elektroçirime ile polietilen oksit (PEO) nanofiberlerin üretilmesine, UV ile çapraz bağlanmasına, çapraz bağlı fiberler ile titanyum (Ti) yüzeylerin kaplanmasına ve son olarak kaplanmış yüzeylerde MC3T3-E1 hücrelerinin ve *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) bakterilerinin yapışma

ve üreme açısından davranışlarını incelemeye yönelik deneysel çalışmalara yer verilmiştir.

3.2.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

PEO fiberlerin üretilmesinde kullanılan iki farklı molekül ağırlığındaki (M_v :400,000 ve 600,000 g mol⁻¹) PEO, PEO fiberlerin çapraz bağlaması amacıyla kullanılan glutaraldehit (GA), glioksal (GO), benzofenon (Bp) ve pentaeritritol triakrilat (PETA) çapraz bağlayıcı ajanları Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Ultraviyole ışın (UV) varlığında çapraz bağlama işlemi için 300 Watt'lık 280-420 nm aralığında ışımaya yapan UV kaynağı (UV300) Osram (Almanya) ve 12 Watt'lık 366 nm dalga boyunda ışımaya yapan UV kaynağı (UV12) ise GLT Gase-und Labortechnik (Almanya) firmasından sağlanmıştır. Çözücü olarak kullanılan diklorometan (DCM) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından, dimetilformamid (DMF) ise Merck (Almanya) firmasından alınmıştır. Çapraz bağlayıcı çözeltilerinin hazırlaması için kullanılan metanol Sigma-Aldrich (Almanya) ve etanol Colony Sugar Mills Ltd. (Pakistan) firmasından temin edilmiştir. %99.98 saflıkta 0.2 mm kalınlığındaki titanyum şeritler BAĞ-SAN Titanyum Metal (Türkiye) firmasından temin edilmiş ve 1 cm²'lik kareler şeklinde kesilmişlerdir. Karşılaştırma amacıyla titanyumların bir kısmının yüzeyi 180 numara kâğıt zımpara ile pürüzlendirilmiştir.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan MC3T3-E1 fare preosteoblast hücre hattı, α -MEM, FBS, tripsin, DPBS, MTT, izopropanol, tripan mavisi, HMDS, GA ve TCPS Bölüm 3.1.1'de belirtilen firmalardan alınmıştır. Bakteri kültürü çalışmalarında kullanılan bakteri suşu *S. epidermidis* (ATCC 35984-biyofilm oluşturan tür) Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünden (Ankara, Türkiye), tryptic soy broth (TSB) sıvı besi yeri ise Merck (Almanya) alınmıştır.

3.2.2. PEO Nanofiberlerin Üretimi ve Çapraz Bağlanması

Deneysel çalışmalarda kullanılmak amacıyla, istenilen çap dağılımına ve morfolojisine sahip PEO nanofiberlerin üretimi elektroçirime yöntemiyle gerçekleştirilerek üretim için en uygun koşullar belirlenmeye çalışılmıştır. PEO fiberlerin üretimi Çizelge 3.4'de belirtilen koşullarda, CS ve PCL membranların gelişigüzel desenlenmesinde kullanılan sabit toplayıcı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Eğirme işlemi için 10 mL çözücü bulunan behere Çizelge 3. 4'de belirtilen oranlarda PEO ilave edilerek, elde edilen karışımın bir gece süreyle çözünmesi sağlanmış ve sonrasında oda koşullarında fiber üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 4. PEO nanofiberlerinin üretimi için incelenen parametreler

M_v (g mol ⁻¹)	Çözücü	Derişim (w/v)	Akış Hızı (mL sa ⁻¹)	Voltaj (kV)	Toplayıcı Mesafesi (cm)
400,000	Distile Su	8	0.25	10	15
			0.5	12	
			1.0	14	
		6	0.3	16	
			1.0	18	
			0.5	20	
600,000		7	0.5	25	15
		5		10; 15; 20; 25; 30	
		4		10; 15	

Elde edilen fiberler kültür çalışmalarında kullanılacağından sulu ortamda çözünmemesi amacıyla çapraz bağlama deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler

i. Kimyasal yolla ve

ii. UV ile çapraz bağlama

olarak iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir.

i. Kimyasal yolla çapraz bağlama: Bu gruptaki deneyler iki şekilde yürütülmüştür. İlk olarak, %4'lük PEO çözeltisine elektroçirime öncesi her deneme için Çizelge 3.5'de belirtilen oranlarda çapraz bağlayıcı ilave edilip, 1 saat süreyle karanlık ortamda karıştırma işlemi uygulanmıştır. Sonrasında çapraz bağlayıcı içeren çözelti ile 18 kV, 15 cm ve 0.5 mL sa⁻¹ koşullarında nanofiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen fiberler Çizelge 3.5'de ifade edilen farklı sıcaklık programlarına tabi tutulmuşlardır. İkinci yaklaşım olarak, aynı koşullarda PEO nanofiber üretimi gerçekleştirildikten sonra, fiber örgüler yine Çizelge 3.5'de belirtilen sıcaklık programında çapraz bağlayıcı çözeltisinde karanlık ortamda reaksiyona sokulmuşlardır. Fiberlerin sulu ortamda hemen çözünmelerinden dolayı, çapraz bağlayıcı çözeltileri hem etanolde hem de metanolde hazırlanmıştır. Reaksiyon sonrasında kurutulan fiberler işlemin başarılı olup olmadığını tespit etmek amacıyla, distile su ile muamele edilmişlerdir.

Çizelge 3. 5. PEO nanofiberlerin kimyasal yolla çapraz bağlanması için incelenen parametreler

Çapraz Bağlayıcı	Çapraz Bağlayıcı Derişimi (% w/w)	Çapraz Bağlama Koşulları (Süre (sa); Sıcaklık (°C))
GA	1.5	24 sa; oda sıcaklığı
	3.0	
	5.0	2 sa; oda sıcaklığı/37°C/45°C
		4 sa; oda sıcaklığı/37°C/45 °C
		22 sa; oda sıcaklığı/37°C/45°C
GO	1.5	24 sa;oda sıcaklığı
	3.0	1.5 sa; 40°C
	8.0	2 sa; oda sıcaklığı/37°C/45°C
		4 sa; oda sıcaklığı/ 37°C/45°C
		22 sa; oda sıcaklığı/37°C/45°C

ii. **Foto çapraz bağlayıcılar ile UV varlığında çapraz bağlama:** Çapraz bağlama çalışmalarında diğer yöntem olarak, Bp ve PETA foto çapraz bağlayıcıları kullanılarak UV300 ve UV12 varlığında çapraz bağlama deneyleri yapılmıştır. Öncelikle UV300 ve Bp ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Uygun çapraz bağlayıcı oranının belirlenebilmesi için şişme çalışmalarının daha kolay yapılabilmesinden dolayı, çapraz bağlanma işlemi çözücü döküm yöntemiyle üretilen membranlarla yapılmıştır. Bu amaçla, Çizelge 3.6 a'da belirtilen çözücülere 100 mL için 4 g PEO ilave edilerek oluşan karışımın bir gece süreyle çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işleminin ardından, Çizelge 3.6 a'da belirtilen oranlarda Bp çözeltiye ilave edilmiş ve karanlık ortamda 1 saat daha karıştırılmıştır. Bp içeren çözelti polistiren Petri kaplarına dökülerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan membranlara Çizelge 3.6 a'da belirtilen reaksiyon süreleri ve UV uygulama mesafeleri koşullarında UV300 ile çapraz bağlama işlemi uygulanmıştır. İşlemin başarıya ulaşip ulaşmadığının belirlenmesi amacıyla örnekler distile su ile muamele edilmişlerdir. Benzer çalışmalar, Çizelge 3.6 b'de belirtilen koşullar kullanılarak Bp içeren PEO fiberler ile de gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 6. Bp içeren örneklerin UV300 ışık kaynağı ile çapraz bağlanabilmesi için incelenen parametreler. a) Membran formda ve b) Fiber formda incelenen parametreler

(a)	Çözücü	Çapraz Bağlayıcı Oranı (% , w/w)	Reaksiyon Süresi (dakika)	UV Uygulama Mesafesi (cm)
Membran Form	Distile Su/Etanol	5	2; 3; 4; 5; 10	7
		10		
		15		
	DCM	5	40	20
	DCM/DMF 30/70 (v/v)	5; 10; 15	1; 2; 5	6
				8
			1; 5; 10	15
			1; 5; 10; 20; 30 40; 50; 90	20

(b)

Fiber Form	DCM/DMF 30/70 (v/v)	5; 10	60	25	
		15	4; 8	20	
	DCM/DMF 40/60 (v/v)	5	10	60	25
				4; 8	20
		15	30	10; 20	25
				20	28
				70	
				30	35
		30	3; 5; 10; 45	25	
		DCM/DMF 50/50 (v/v)	10	40	25

UV ile çapraz bağlama deneylerinin diğer basamağında UV12 kaynağı ile 2 farklı çapraz bağlayıcı (Bp ve PETA) varlığında işlemler gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlama işlemleri hem membran formdaki hem de fiber formdaki yapılarla Çizelge 3.7’de belirtilen koşullarda yürütülmüştür. Membranlar çözücü döküm yöntemiyle üretilmiştir. PEO fiberlerin üretimi ise elektroçizme ile gerçekleştirilmiştir. Bu

amaçla distile suda bir gece süreyle karıştırılarak hazırlanan %4'lük PEO'ya (w/w) eğirme öncesi Çizelge 3.7'de belirtilen derişimlerde çapraz bağlayıcı ilave edilip, karanlık ortamda bir saat süreyle karıştırma işlemi uygulanmıştır. Son aşamada, çapraz bağlayıcı içeren çözeltiyle karanlık ortamda, 18 kV, 23 cm ve 0.4 mL sa⁻¹ koşulunda elektroegirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen fiber örgüler bisturi yardımıyla 1 cm²'lik kareler şeklinde kesilerek folyo yüzeyinden kaldırılmışlar ve çalışmalarda kullanılabilecek kadar plastik Petri kaplarında karanlık ortamda saklanmışlardır. UV12 varlığında çapraz bağlanma reaksiyonu öncesi fiber örgülerin bir bölümü oda sıcaklığında, diğer bir bölümü oda sıcaklığındaki vakum altında ve bir başka bölümü ise 37°C'de 8 güne kadar kurumaya alınmışlardır. Kuru membranlar ve her bir çapraz bağlayıcı derişimine karşılık her bir kuruma süresinin sonundaki fiber örgüler 4 cm mesafeden UV12 ile muamele edilmiştir. Çapraz bağlanma işlemi oda koşullarında ve karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Fiziksel yapılarındaki derişimleri karşılaştırmak amacıyla PETA içeren bir grup fiber örgüye de aynı kurutma programı uygulanmış fakat bu süreç sonunda fiber yapılar UV12 ile muamele edilmemişlerdir.

Çizelge 3. 7. PEO membranların ve fiberlerin Bp ve PETA varlığında UV12 ışık kaynağı ile çapraz bağlanabilmesi için incelenen parametreler

	Çözücü	Çapraz Bağlayıcı	Çapraz Bağlayıcı Oranı (% w/w)	Uygulama Süresi (dakika)
Membran Form	Distile Su	PETA	10.0	10
	DCM/DMF 40/60 (v/v)	Bp		30
				40
Fiber Form	Distile Su	PETA	1.0	15; 25; 35; 50; 90
			2.5	
			5.0	
			7.5	
			10.0	
	DCM/DMF 40/60 (v/v)	Bp	10.0	10
				30
				40

3.2.3. Çapraz Bağlı PEO Nanofiberler ile Şişme Deneyleri

PEO nanofiberlerin başarılı bir şekilde çapraz bağlanıp bağlanmadıklarının anlaşılması ve en uygun çapraz bağlayıcının tespiti amacıyla şişme deneyleri gerçekleştirilmiştir. En uygun koşulların belirlenebilmesi amacıyla incelenen parametreler Çizelge 3.8'de verilmiştir. Gravimetrik tayin yöntemi ile yürütülen dinamik şişme deneyleri 37°C sıcaklıkta ve fosfat tampon çözeltisinde (PBS, pH: 7.4) gerçekleştirilmiştir. Her bir çapraz bağlayıcı derişimi için her bir kurutma süresinin (24, 72, 144, 192 sa) sonunda 4 cm mesafeden 50 dakika süreyle UV12 ile muamele edilmiş ve edilmemiş örnekler şişme öncesi analitik terazide (Precisa 205 A SCS; duyarlılığı ±0.0001 g, İsviçre) tartıldıktan sonra, PBS içeren Petri kaplarına alınarak sabit sıcaklık ortamında (Nüve ES) şişme deneyi başlatılmıştır. Uygun aralıklarla ortamdaki uzaklaştırılan örneklerin yüzey nemi alınmış ve analitik terazide tartıldıktan sonra tekrar şişme ortamına konulmuştur. Belirli zaman aralıklarında fiber jellerin ağırlığındaki değişimler kaydedilmiş ve % su içeriği; başlangıçta ölçülen kuru ağırlıkla, herhangi bir zaman değerinde şişen hidrojelin ağırlık farkından hesaplanmıştır (Eşitlik 3.1). Bu işlem örnekler denge şişme değerine ulaşana kadar sürdürülmüştür. Şişme deneyleri her grup için üçer paralel örnek ile gerçekleştirilmiştir.

$$\% \text{ Su İçeriği} = [(yaş \text{ ağırlık} - \text{kuru ağırlık}) / \text{kuru ağırlık}] \times 100 \quad (3.1)$$

Çizelge 3.8'de belirtilen her bir PETA oranında kuruma süresi 24, 72, 144 ve 192 saat olduğunda, PBS'deki şişme süresi 10 dak, 24, 48, 72, 96 ve 120 saate kadar değiştirilmiştir.

Çizelge 3. 8. PETA içeren PEO nanofiberlerin UV12 öncesi ve sonrasında şişme davranışlarının belirlendiği koşullar

PETA Oranı (%, w/w)	Kurutma Süresi (saat, 37°C)	PBS'de Şişme Süresi (saat)
1.0	24; 72; 144; 192	0.17
2.5	24; 72; 144; 192	1.0
5.0	24; 72; 144; 192	24.0
7.5	24; 72; 144; 192	48.0
10.0	24; 72; 144; 192	72.0
		96.0
		120.0

3.2.4. Çapraz Bağlı PEO Nanofiberlerin Karakterizasyonu

Çapraz bağlı PEO nanofiberlerin yüzey morfolojileri ve fiziksel yapıları SEM (Zeiss Evo 50, Almanya) ile analiz edilmiştir. Görüntüleme öncesi örneklerin yüzeyi altın tabakası ile kaplandıktan sonra SEM görüntüleri alınmıştır. Bu görüntüler değerlendirilerek hücre ve bakteri kültürü uygulamalarında kullanılacak fiberlerin hazırlanması için gerekli koşullar belirlenmiştir. Fiberlerin ortalama çapı ImageJ yazılımı ile SEM görüntülerinden hesaplanmıştır. Çaplar, ortalama±standard sapma olarak belirtilmiştir.

Çapraz bağlayıcının fiber yapısındaki varlığının belirlenmesi ve çapraz bağlanmanın hangi gruplar üzerinden yürüdüğünün tespit edilmesi amacıyla PEO fiberler FTIR-ATR ile analiz edilmişlerdir.

3.2.5. PEO Nanofiberler ile Titanyum Yüzeylerin Kaplanması

Yukarıda açıklanan deneysel çalışmaların sonucunda çapraz bağlanma özellikleri açısından optimum özellikleri sağlayan koşul belirlenerek (%10'luk (w/w) PETA içeren %4 PEO (w/v) çözeltisi, 18 kV, 23 cm ve 0.4 mL sa⁻¹), bu koşulda Ti yüzeylerin PEO nanofiberler ile kaplanması gerçekleştirilmiştir. Kaplama işlemi karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Kaplama işleminin ardından örnekler 8 gün süreyle 37°C'de bekletilmişler ve sonrasında 4 cm mesafeden UV12 ile 50 dakika boyunca muamele edilmişlerdir. Daha sonra fiber kaplı titanyumlar sonraki uygulamalar için ağızları kapalı Petri kaplarında karanlık ortamda saklanmışlardır.

3.2.6. Titanyum Yüzeylerin Karakterizasyonu

PEO nanofiberler ile kaplanmış veya kaplanmamış Ti yüzeylerin morfolojileri SEM ile analiz edilmiştir. Uygun kaplama süresinin ve fiberlerin fiziksel yapısının incelenmesi amacıyla yapılan analizlerde örneklerin yüzeyi altın tabakası ile kaplandıktan sonra SEM görüntüleri alınmıştır.

Fiber kaplı Ti yüzeylerin topografilerinin belirlenmesi amacıyla, Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM, Vecoo Multi Mode V-AS-12) ile yüzeylerin iki ve üç boyutlu görüntüleri elde edilmiştir. Tıklatma modu (tapping mode) ile yapılan analizler sonucu, belirli boyutlardaki karesel alanlar taranarak yüzeylerin morfolojisi belirlenmiştir.

Kaplanmamış olan titanyum implantların yüzey pürüzlülükleri pertometre (Mahr, M2, ABD) ile ölçülmüştür.

PEO fiber kaplanmış ve kaplanmamış Ti yüzeylerin statik su temas açısı ölçümleri, Kruss DSA 100 (Almanya) marka cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Su temas açısı değerleri, oda sıcaklığında, asılı damla (sessile drop) yöntemi [190] ile belirlenmiştir.

3.2.7. Hücre ve Bakteri Kültürü Çalışmaları

Bu kısımda, PEO nanofiberlerle kaplı 1 cm²lik Ti yüzeylerdeki hücre ve bakteri tutunabilirliğinin incelenmesine yönelik çalışmalara değinilmiştir. Bu çalışmalar kapsamında, hücre kültüründe yalın titanyum (Ti-y), pürüzlendirilmiş titanyum (Ti-p), PEO fiber kaplı Ti-y (Ti-y/PEO-f), PEO fiber kaplı Ti-p (Ti-p/PEO-f) ve kontrol grubu olarak TCPS kullanılmıştır. Bakteri kültüründe ise Ti ve Ti-y/PEO-f yüzeyler ile çalışılmıştır.

3.2.7.1. Hücre yapışmasının ve üremesinin incelenmesi

Hücre kültürü çalışmaları, MC3T3-E1 fare preosteoblast hücre hattı ile gerçekleştirilmiştir. Kültür çalışmalarına başlamadan önce, 1.5 cm çapında kesilip %96'lık (v/v) mutlak etanol içerisinde bekletilen Parafilm diskler, laminar akışlı kabinde (Bioair, Tip II Laminar Akışlı Kabin, İtalya) etanolün tamamen uzaklaşmasını sağlamak amacıyla bir gün süreyle bekletilmiş ve sonra 15 dk süreyle UV ışığa maruz bırakılmışlardır. TCPS kontrol grupları dışında, hücrelerin TCPS yüzeyine tutunmasını engellemek amacıyla 24-gözlü hücre kültür kaplarının her bir gözü bu Parafilm disklerle kaplanmıştır. Sonraki aşamada, hücre kültürü çalışmaları için analiz öncesinde arkalı önlü 30 dk süreyle UV altında bekletilerek steril edilen örnekler, yüzeyi Parafilm ile kaplanmış steril 24-gözlü kültür kaplarına yerleştirilmiştir. Her bir örnek yüzeyine, %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren α -MEM ortamında hazırlanan ve 5×10^4 hücre mL⁻¹ derişimdeki hücre süspansiyonu eklenmiştir. Kültür kapları %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava karışımı sağlayan inkübatöre (Heraus Instruments, Almanya) kaldırılmıştır.

MTT analizi

Örneklerin üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığı, kültür süresince 4. saat, 24. saat ve 48. saatlik zaman periyotlarında MTT testi ile kantitatif olarak takip edilmiştir. MTT yöntemi Bölüm 3.1.7.2'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

SEM analizi

MC3T3-E1 hücrelerinin Ti plakalar üzerindeki morfolojileri, 4 saatlik inkübasyon sonunda SEM ile incelenmiştir. Kültür ortamının uzaklaştırılmasının ardından,

plakalar nazikçe PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra, Bölüm 3.1.7.2'de açıklandığı şekilde SEM analizi için hazırlanmışlardır.

İstatistiksel analiz

Gruplar arasındaki istatistiksel anlam farklılıkları 3.1.8'de belirtilen şekilde değerlendirilmiştir.

3.2.7.2. Bakteriyel yapışmanın incelenmesi

Yüzeyi pürüzlendirilmemiş Ti-y plakalar elektroçirme yöntemi kullanılarak PEO nanofiberler ile modifiye edilmiş ve yüzeydeki fiberler UV12 ile çapraz bağlanmışlardır. Yüzeylerdeki *S. epidermidis* bakterilerinin tutunabilirliğinin incelenmesi amacıyla, 30 dk UV ile sterillenen örnekler 24 gözlü steril kültür kabına yerleştirilmiştir.

121°C'de 15 dk sterillenen TSB içerisindeki ve 1×10^6 cfu mL⁻¹ derişimdeki bakteri suşlarından 50 µL hacmindeki bakteri süspansiyonu örnek yüzeylerine yüzeyden taşma yapmayacak şekilde bırakılmış ve örnekler, 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyona alınmışlardır. İnkübasyon sonunda kültür kabından kaldırılan örnekler yüzeye tutunmayan bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla steril PBS ile 3 kez yıkanmış ve SEM ile görüntüleme işlemi için hazırlanmıştır.

SEM analizi

PBS ile yıkanan Ti yüzeyler %2.5 (v/v) GA ile 20 dk süreyle muamele edilerek fiksasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından örnekler, her bir derişimde 15 dk bekletilmek üzere artan derişimlerde hazırlanan etanol serisinden (%30, %50, %70, %90 ve %96 (v/v)) geçirilmiştir. HDMS ile yıkandıktan sonra kurutulan örnekler altın ile kaplamanın ardından SEM ile incelemeye alınmıştır.

4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Tezin bu bölümünde, ilk olarak hücresele etkileşimlerde kullanılacak nanofiberlerle desenlenmiş ve desenlenmemiş polikaprolakton (PCL) ve kitosan (CS) membranların üretim ve karakterizasyonu ile ilgili sonuçlar sunulmuştur. En uygun koşulların belirlenmesinin ardından, desenlenmiş ve desenlenmemiş membranlardaki MC3T3-E1 ve MDBK hücrelerinin davranışlarını incelemeye yönelik olarak gerçekleştirilen deneysel çalışmaların sonuçlarına değinilmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde; nanotopografinin hücre davranışlarına olan etkisine yönelik tartışmalar yapılmıştır.

Tezin ikinci kısmında ise, PEO nanofiber kaplı Ti yüzeyler üzerinde hücresele ve bakteriyel davranışların incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, PEO nanofiberlerin üretilmesine, çapraz bağlanmasına ve karakterizasyonuna yönelik sonuçlar sunulmuştur. Karakterizasyon çalışmaları ile en uygun koşulların belirlenmesinin ardından nanofiber kaplanmış yüzeyler üzerindeki hücresele tutunabilirliğe yönelik bulgulara değinilmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda, PEO nanofiberlerin hücresele/bakteriyel yapışmaya olan etkisine yönelik tartışmalar gerçekleştirilmiştir.

4.1. PCL ve PCL/kollajen Nanofiber Desenli Yüzeyler ve Nanotopografi-Hücre Etkileşiminin İncelenmesi

Mikron-altı topografik özelliklerin hücre yapışması, çoğalması, morfolojisi, yayılması ve hücre iskeletinin organizasyonu gibi hücresele davranışlara etkisi literatürde gösterilmiştir [13]. İstenen hücresele davranışların sağlanması için farklı mimarilerdeki topografik özelliklerin oluşturulmasında çeşitli teknikler kullanılmaktadır [13, 41]. Bu çalışmada, çok yönlülüğü, kullanım kolaylığı ve uygun maliyeti nedeniyle elektroçizme tekniği kitosan ve polikaprolakton yüzeylerde fiber formda desenlerin oluşturulması amacıyla kullanılmıştır. Elde edilen desenlenmiş membranların karakterizasyonu inverted mikroskop (i-mikroskop), SEM, AFM ve FTIR-ATR çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir.

Desenleme için kullanılan elektroçizme tekniğinin en büyük zorluklarından biri fiber üretim koşullarının optimizasyonudur. Uygulanan voltaj, akış hızı, şırınga uc-toplayıcı arasındaki mesafe, polimer derişimi ve polimer çözeltisinin iletkenliği gibi parametreler, elektroçizme tekniği ile elde edilen fiberlerin fiziksel yapısında önemli değışimlere neden olmaktadır. Diğer bir nokta ise, fibröz matrisler

üretirken toplama süresi çok daha uzun olduğundan, fiber toplama süresinin sonunda güç kaynağının ve şırınganın açılması ve kapatılması aşaması fiber örgüde topografik değişmelere yol açmamaktadır. Fakat hedef desenleme olduğunda çok az miktarda fiber toplanacağından, özellikle hizalanmış düzende fiberlerin elde edilmesinde, fiberlerin istenilen morfolojiden sapması desenlemeyi etkileyecektir. Elektroğirme sisteminde, fiber üretimi için öncelikle ya şırınga açılıp arkasından güç kaynağı açılmakta ya da tam tersi sıra izlenmekte ve Taylor konisinin oluşup fiber jetin açığa çıkması ve fiberlerin kararlı hale gelmesi biraz zaman almaktadır. Bu süreçte toplayıcı yüzeyinde istenmeyen türde fiberler ortaya çıkabilmektedir. Fiber toplama süresinin bitiminden sonra ise güç kaynağı ve şırınganın kapatılması sonrasında fiber jet hemen sönmülmemekte ve bu aşamada da istenmeyen türde fiberler yüzeye ulaşabilmektedir. Bu yüzden, her iki problemin de önüne geçebilmek amacıyla, başlangıçta jet kararlı hale gelene kadar, sonunda ise jet bütünüyle sönene kadar toplayıcı ile şırınga arasında toplayıcı ile çok yakın mesafede bir perde görevi görecek harici bir yüzey kullanılmıştır. Bu yüzey sisteme hızlı bir şekilde dahil edilip yine hızlı bir şekilde çekilerek fiber toplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca yüzeyler üzerinde toplanan fiberlerin membran yüzeyinde kararlı bir yapı oluşturması, yüzeye tutunarak hücre kültür ortamında yüzeyden ayrılmaması gerekmektedir.

Fiberlerin toplanma süresi, hücre etkileşimi için membran yüzeyinde yeterli fiberler arası boşluk sağlamak amacıyla, elektroğirme işlemi sırasında ayarlanmıştır. Böylelikle hücrelerin yüzey topografisi ile mi yoksa membran yüzeyi ile mi etkileştiğini anlamak mümkün olmuştur.

4.1.1. Çapraz Bağlı Kitosan Membranların Hazırlanması, Elektroğirme Tekniği ile Desenlenmesi ve Karakterizasyon Çalışmaları

Kitosan, poli-[β -(1,4)-2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoz] kimyasal yapısına sahip hidroksil ve amin grupları içeren bir polimerdir. Bu reaktif gruplar kolayca kimyasal modifikasyona uğrayabilmekte ve kitosanın mekaniksel ve fiziksel özellikleri ile çözünürlüğünü değiştirmektedir. Çözünürlüğü inorganik çözücülerde düşük olan CS asetik asit, formik asit ve laktik asit gibi organik asitlerde çözünebilmektedir, ancak kararlı kristalin yapısından dolayı normalde pH:7'nin üzerindeki sulu ortamlarda çözünmezdir. Fakat seyreltik asitlerde serbest amino gruplarının protonlanması ile oluşan katyonik yapısı sayesinde pH<6 ortamında kolayca

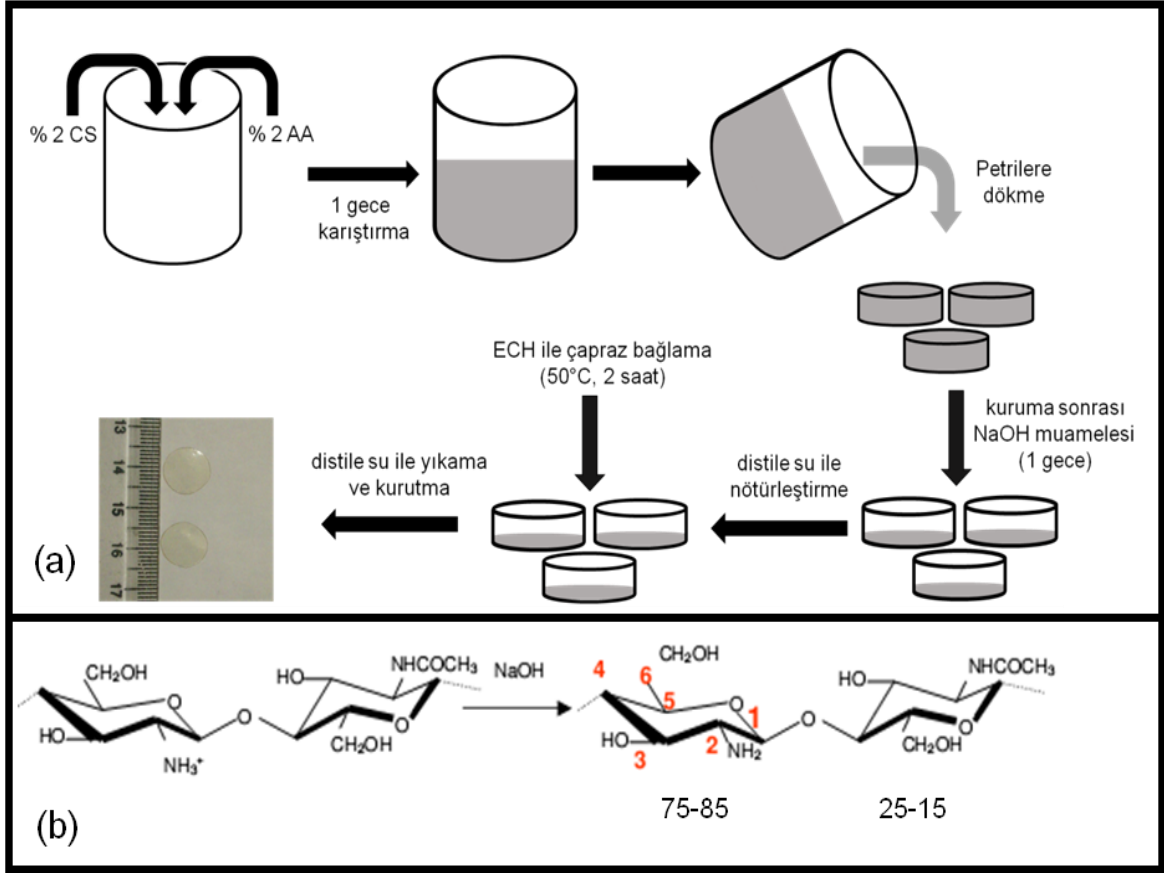
çözünmektedir. Asidik ortamda NH_2 grubu $-\text{NH}_3^+$ şeklinde bulunmakta ve ortamdaki anyonik gruplarla elektrostatik olarak etkileşime girebilmektedir. CS'nin çözünürlüğü film veya fiber gibi kullanımları açısından da oldukça önemli bir parametredir. Yapılan araştırmalar iyi bir çözünürlük için CS'nin en az % 75-80 deasetilasyon derecesine sahip olması gerektiğini göstermiştir. CS'nin molekül ağırlığı kaynağına ve hazırlanma yöntemine bağlı olarak 1×10^5 - 5×10^5 Da arasında değişebilmektedir [15].

CS'nin biyomalzeme olarak kullanımının temel nedeni onun katyonik yapısı ve çözeltideki yüksek yük yoğunluğudur. Yük yoğunluğu kitosanın, suda çözünür anyonik polimerlerle, çözünmez iyonik kompleksler oluşturmasına izin verir. CS katyonik yapısı nedeni ile başlıca anyonik glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve diğer negatif yüklü moleküller ile elektrostatik etkileşimde bulunabilmektedir. Bu özelliği doku mühendisliği uygulamalarında büyük ilgi kaynağı olmuştur [14]. CS'nin toksik özellikte olmaması, çevreye zarar vermeden biyolojik olarak parçalanabilir özellikte olması ve vücut içerisinde, tamamen zararsız ürünlere (amino şekeri) parçalanmasından ötürü herhangi bir yan etkisi de bulunmamaktadır [191]. Kolay işlenebilirliği nedeni ile CS membran, kaplama, kapsül, fiber, sünger ve iskele olarak birçok formda hazırlanabilmektedir. Literatürde CS jellerin 5 farklı yaklaşımla hazırlandığı yaklaşımlar mevcuttur. Bu yaklaşımlar: 1. Çözücü döküm yöntemi, 2. Nötralizasyon yöntemi, 3. Çapraz bağlama yöntemi 4. İyonotropik jelleştirme yöntemi ve 5. Dondurarak kurutma yöntemi olarak sıralanabilir [192].

4.1.1.1. Çapraz bağlı kitosan membranların hazırlanması

Sunulan çalışmada, CS, özellikleri göz önüne alınarak doku mühendisliği için yüzey modifikasyonu gerçekleştirilecek malzeme olarak seçilmiştir. Desenlenecek yüzeylerin elde edilebilmesi amacıyla membran formda CS yüzeyler üretilmiştir. Çalışmada kullanılan %75-85 deasetilasyon derecesine sahip kitosandan elde edilen membranların üretiminde kolay, ucuz ve tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntem olarak çözücü döküm tekniğinden yararlanılmıştır. Bu teknik, uygun çözücü/çözücüler kullanılarak hazırlanan polimer çözeltisinin Petri kaplarına dökülmesi ve ardından uygun ortam koşullarında çözücünün buharlaşmasıyla membran formunda malzemelerin hazırlanması işlemidir (Şekil 4. 1 a) [35, 193]. Kurutma işlemi sonrası NaOH ile muameleye bağlı olarak kitosanın $-\text{NH}^{+3}$ grupları

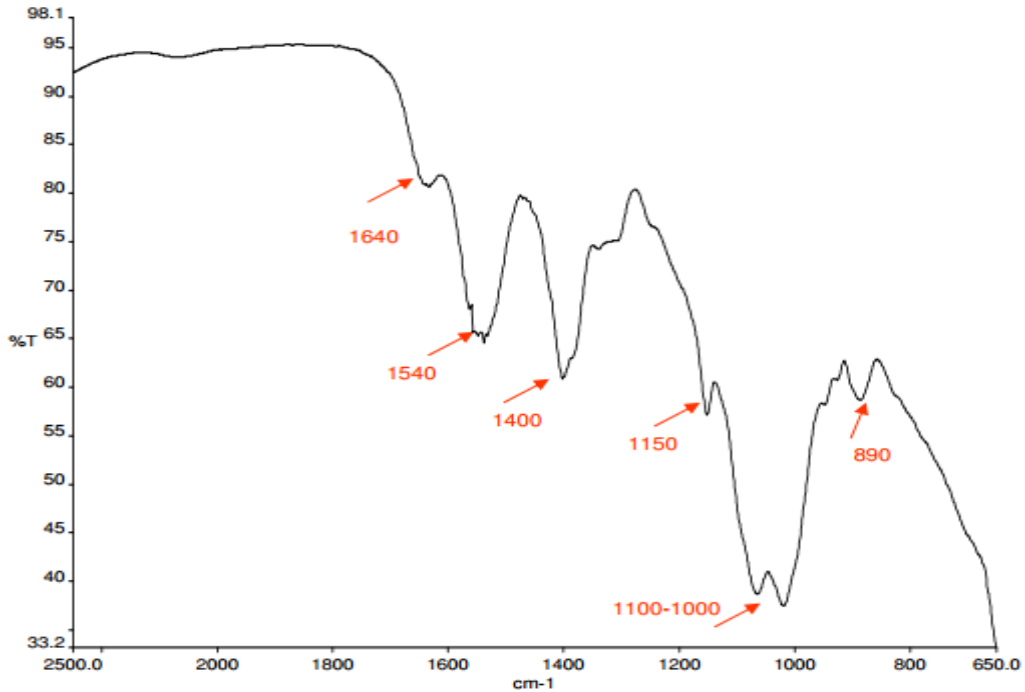
-NH₂ gruplarına dönüştürülerek kararlılığı artırılmış (Şekil 4. 1 b) ve ardından ECH ile OH grupları üzerinden çapraz bağlanarak sulu ortamda çözünmez hale getirilmiştir.



Şekil 4. 1. a) Kitosan membranların üretim şeması ve b) Kitosandaki grupların NaOH ile muamelesi sonrasındaki durumu

Çalışmada kullanılacak çapraz bağlı CS membranlar kültür ortamında bir miktar şişeceklerinden, membran yüzeylerinin şişme sırasında deforme olmaması, yüzey özelliklerinin değişmemesi açısından önemlidir. Bu bakımdan membranlar minimum bir kalınlığa sahip olmalıdır ki bu kalınlık da ~ 100 µm olarak belirlenmiştir. Yüz mikrometrenin altında üretilen membranların kararlı bir şişme davranışı göstermediği ve şeklinin bozulduğu gözlenmiştir. CS membran üretimindeki önemli noktalardan diğeri de, cam Petri kapları kullanıldığında membranların yüzeye yapışmalarından dolayı yüzeyden kaldırılamamasıdır. Bu gibi durumlarda yüzeyin yapışabilirliğini azaltıcı bazı ek malzemelere (Sigmacote^R gibi) ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada CS çözeltisi cam Petriyer yerine plastik Petri kaplarına dökülmüş ve yüzeyden kaldırma işlemi ek işleme gerek duyulmadan gerçekleştirilmiştir. Başka bir önemli nokta ise, hücre kültür

çalışmalarında kullanılmak amacıyla hazırlanan çapraz bağlı membranların kuruma sırasındaki deformasyonu sorunudur. Kuru membranlar katı ve sert bir yapıya sahip olduklarından bu aşamada katlanmakta ve daha sonra düzgün bir yüzey haline getirilmeleri mümkün olamamaktadır. Bu bakımdan çapraz bağladıktan sonra distile suyla yıkanan CS membranlar, yıkama işleminden hemen sonra iki yönlü düz yüzeylerin (cam, fayans vs.) arasında baskılanarak kurutulmuştur. Kurutulan membranlar ağızları kapalı Petri kaplarında deneysel çalışmalarda kullanılmak amacı ile saklanmıştır. Çapraz bağlı CS membrana ait FTIR-ATR grafiği Şekil 4. 2'de verilmiş ve elde edilen spektruma ait veriler ise Çizelge 4.1'de değerlendirilmiştir.



Şekil 4. 2. Çapraz bağlı kitosan membrana ait FTIR-ATR spektrumu

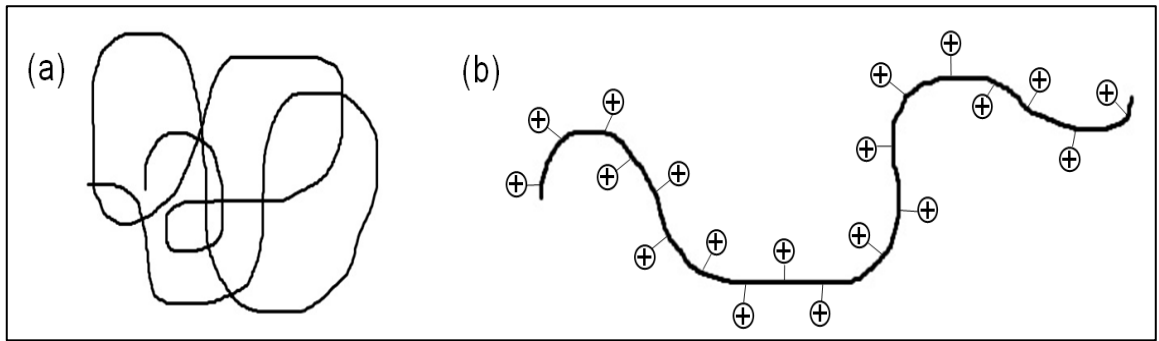
Çizelge 4. 1. Çapraz bağlı kitosan membrana ait FTIR-ATR spektrum verileri ve değerlendirmesi

Dalgaboyu (cm ⁻¹)	Açıklama
1640 m	-C=O gerilmesi (N-asetil grubu)
1540 s	-N-H eğilmesi (-NH ₂ grubu)
1400 s	-C-H eğilmesi (-CH ₂ grubu)
1150 sh	-C-O-C gerilmesi (siklik eter)
1100-1000 b	-C-N gerilmesi (-C- NH ₂)
890 m	-N-H eğilmesi

Kısaltmalar: s: Güçlü (strong), m: Orta (medium), w: Zayıf (weak), sh: Omuz (shoulder), b: Geniş (broad)

4.1.1.2. Kitosan membranları kitosan nanofiberler ile desenlenmesi

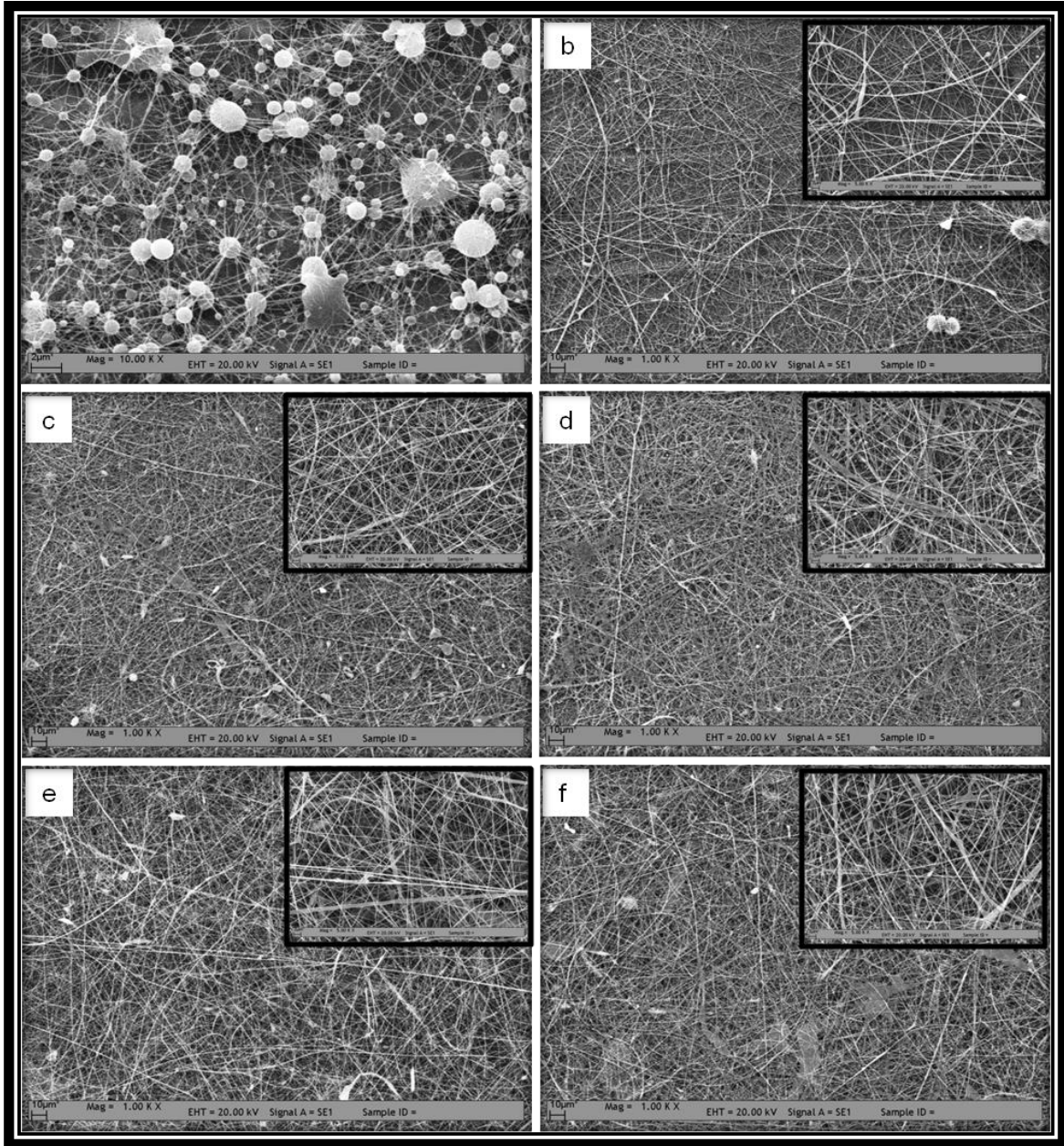
Kitosanın katı D-glukozamin yapısı, yüksek kristalinitesi ve hidrojen bağı oluşturma yeteneği organik çözücülerde çözünmesini sınırlandırmaktadır. CS katyonik yapıda ve sulu çözeltilerde polielektrolit etkiye maruz kalan bir polimerdir. CS'nin normalde birbirine dolanmış polimer sarmalları asidik ortamda polimer zincirlerinde oluşan yüklü grupların varlığından dolayı birbirlerini itip uzayarak ortamda daha fazla yer kaplar ve eğer çözeltilere eklenmiş elektrolitler yoksa bu durum çözeltiyi daha viskoz yapar (Şekil 4. 3). Bu özellikleri elektroçirme için uygun viskoziteye sahip CS tabanlı çözeltileri elde etmeyi zorlaştırmaktadır. Ayrıca elektroçirme işlemi sırasında uygulanan elektriksel alanın etkisiyle CS yapısında bulunan iyonik gruplar arasında oluşan itici kuvvetler, düzenli ve devamlı fiber yapıların elde edilmesini engellemektedir [194]. Yapılan literatür incelemesinde, elektroçirme tekniği ile CS fiber elde edilebilmesi için en uygun çözücünün trifloroasetik asit (TFA) olduğu sonucuna varılmıştır. TFA, CS yapısında bulunan amino grupları ile tuz oluşturarak katyonik gruplar arasındaki etkileşimi engellemekte ve gruplar arası itici kuvvetlerin azalmasını sağlamaktadır [194-196].



Şekil 4. 3. a) Gelişigüzel sarmal şeklinde dolanmış polimer molekülü ve b) Polielektrolitin çözücü ortamındaki durumu

Yürütülmüş olan tez kapsamında, yapılan literatür incelemesi doğrultusunda, Çizelge 3.1'de belirlenen tüm koşullar için elektroçirme tekniği ile CS nanofiberlerin üretilmesine çalışılmıştır. TFA içerisinde hazırlanan %2'lik (w/v) CS çözeltisine 15-22 kV voltaj aralığında, 10 cm toplayıcı mesafesi ve 1.2 mL sa⁻¹ akış hızında elektroçirme işlemi uygulanmış ve yoğun boncuk oluşumu içeren fiber yapılar elde edilmiştir (Şekil 4. 4 a). % 2.7 (w/v) CS derişimde, 20-24 kV aralığında, 6.4 cm ve 1.2 mL sa⁻¹ koşullarında gerçekleştirilen çalışmalarda bir önceki çalışmaya göre boncuk oluşumunda azalma kaydedilmesine rağmen

istenilen özelliklere sahip fiberler elde edilememiştir. Voltajın 20 kV'dan 24 kV'a aşama aşama çekilmesi sırasında fiberlerdeki boncuk oluşumunun azaldığı, fakat fiberlerin fiziksel olarak bozulmaya başlayarak hem fiber kalınlıklarının çok değişken olduğu, hem de şerit benzeri fiber yapıların ağırlık kazandığı gözlenmiştir (Şekil 4. 4 b-f). Bu ve benzeri sorunlar çalışılan tüm koşullarda ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elektroğirme tekniği ile saf CS çözeltisinden düzgün fiber yapı elde etmek mümkün olmamıştır.



Şekil 4. 4. 1.2 mL sa⁻¹ akış hızında üretilen CS fiberlerin CS membrandaki SEM görüntüleri. (a) %2 (w/v) CS, 10 cm, 22 kV (10 KX); %2.7 (w/v) CS, 6.4 cm b) 20 kV, c) 21 kV, d) 22 kV, e) 23 kV ve f) 24 kV (1 KX, sağ üst görüntüler 5 KX)

Literatürde, saf CS çözeltilerinden elektroçizme tekniği ile fiber üretiminde karşılaşılan zorlukların giderilmesi amacıyla, PEO veya PVA varlığında CS'nin elektroçizilmesine yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Her iki polimer de esnek lineer zincirlere sahiptir ve aynı zamanda sulu çözeltilerde kolay eğilirler. Ayrıca PEO ve PVA, CS ile hidrojen bağı yapabilmektedir [197]. CS/PEO çözeltilerinde PEO, CS makromoleküllerinin oryantasyonunu ve akışını kolaylaştıran bir plastikleştirici rolü oynayarak kararlı polimer jetlerinin ve fiberlerin üretilmesine izin verir [197]. Ayrıca kitosanın moleküler zincirleri arasındaki güçlü hidrojen bağlarını azaltarak çizme işlemini kolaylaştırır. Ohkawa ve grubu [198] tarafından yürütölen çalışmalarda, PVA'nın yapıya katılması ile ortalama 330 nm çapına sahip CS/PVA nanofiberlerin elektroçizme tekniği ile elde edilmesi mümkün olmuştur. Bhattarai ve grubu [63] tarafından yürütölen diğer bir çalışmada ise, CS yapısına PEO katılması ile çapları 40 nm'ye kadar düşebilen nanofiberler üretilmiştir.

Yürütölmüş olan tez kapsamında, elde edilmesi planlanan CS nanofiberlerin kimyasal yapısı da önem taşımaktadır. CS membran üzerinde CS nanofiberlerin desenlenmesindeki amaç, membran ile aynı kimyasal yapıya sahip nanodesenlerin hücre davranışı üzerinde etkilerini incelemektir. Fiberlerin yapısında CS dışında bulunacak bileşenler, hücrelerin nanofiberler üzerindeki davranışlarını etkileyebileceğinden, elektroçizme işlemi sırasında PVA ya da PEO gibi yapıların CS çözeltilisine eklenmesinin uygun olmayacağına karar verilmiştir. Bu bakımdan, aynı amaç doğrultusunda, PCL nanofiberler ile desenlenmiş PCL membranlar ile çalışılmasına karar verilmiştir.

4.1.1.3. Kitosan membranların polikaprolakton nanofiberler ile desenlenmesi

PCL 1930 yılında Carother ve grubu [199] tarafından sentezlenen ilk polimerlerdendir. İyi çözünebilirliği, düşük erime sıcaklığı (59-64 °C) ve kopolimer uyumluluğu onu biyomedikal alanda geniş çaplı araştırma konusu yapmıştır [200]. Çok çeşitli polimerlerle kolaylıkla kopolimerleşebilen PCL çeşitli polimerik iskelelerin yapımında ilgi çekmektedir. PCL türevli iskeleler deri, sinir, karaciğer, kalp-damar gibi doku mühendisliği alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

CS membranlar üzerinde biyolojik tanıma bölgelerinden yoksun PCL nanofiberler ile yapılan 2 farklı tür desenlenme (gelişigüzel ve hizalanmış) çalışmalarında, çeşitli sistem parametreleri incelenmiş ve hücre kültür çalışmalarında kullanılacak gruplar belirlenmiştir.

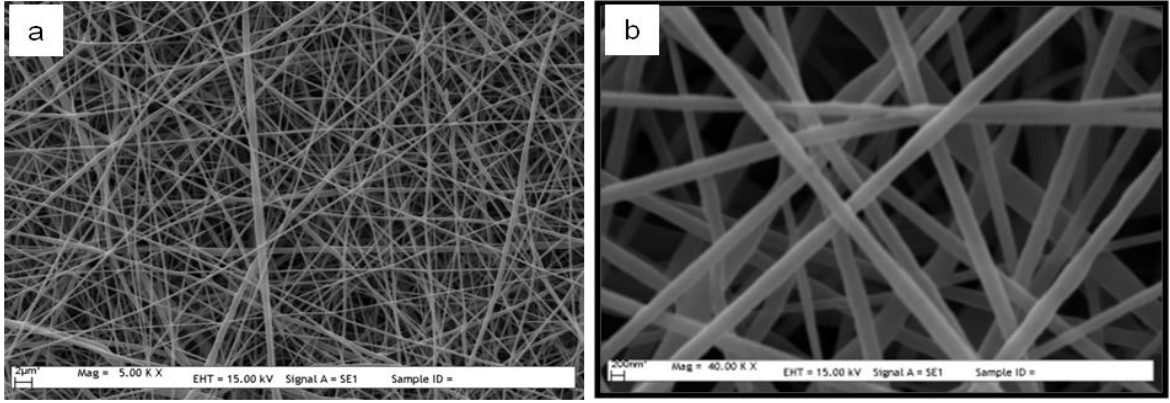
i. Kitosan membranların polikaprolakton nanofiberler ile gelişigüzel düzende desenlenmesi

CS membranlara desenlenecek, istenilen özellikteki fiberlerin elde edilmesi çalışmaları çoğunlukla fiberlerin lameller üzerinde toplanması şeklinde yürütülmüştür. Elektroçirime koşullarının optimize edilmesi amacıyla çok sayıda deneme yapıldığı için, tüm koşulların SEM ile değerlendirilmesi mümkün olamamıştır. Bu yüzden, lamellerde toplanan fiberler i-mikroskopta incelenmiş ve daha sonra belirlenen en iyi koşullardaki fiberler membranlara toplanarak SEM ile analiz edilmiştir.

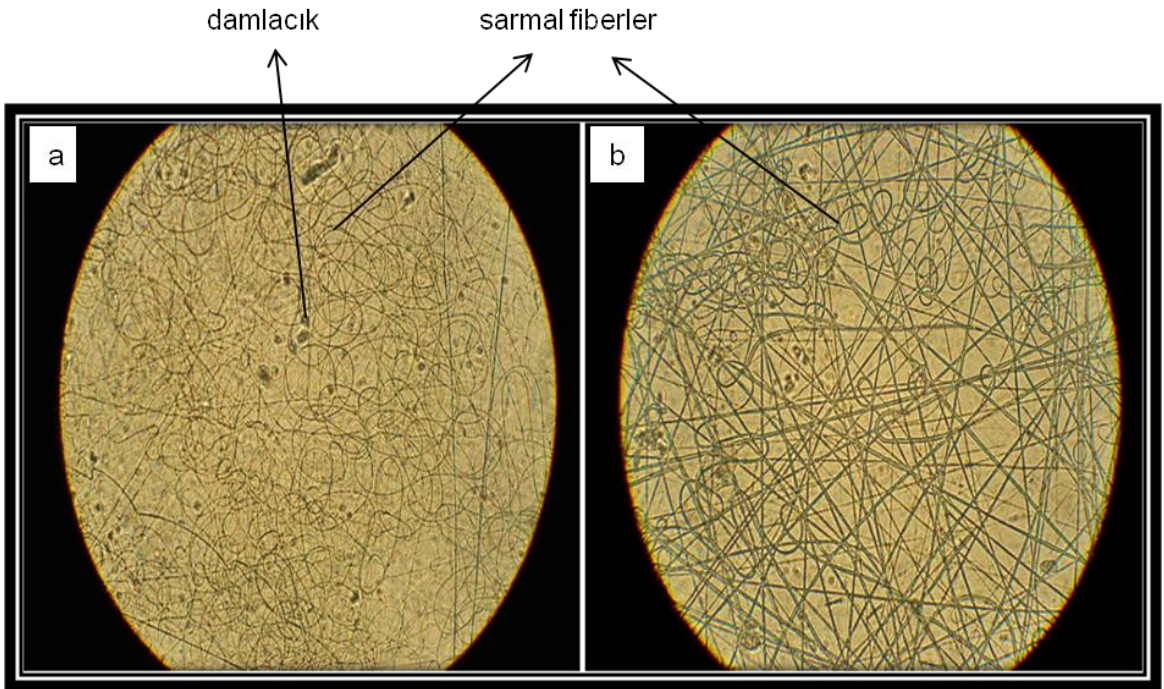
CS membranların PCL fiberler ile gelişigüzel düzende desenlenmesi için yapılan çalışmalarda, PCL nanofiberlerin eldesi için öncelikle DMF/DCM (50/50, v/v) içerisinde %12'lik PCL (w/v) çözeltisi kullanılmıştır (Çizelge 3.2 a). Belirlenen voltaj ve mesafede yapılan elektroçirime işleminin ardından, CS membranlar üzerinde gelişigüzel düzende 284 ± 48 nm çapına sahip fiberlerden oluşan desenler elde edilmiştir (Şekil 4. 5) [36]. Nanofiberlerin CS membran yüzeyinde kararlı bir yapı oluşturup oluşturmadığını kontrol etmek amacıyla, membranlar sırasıyla PBS (pH:7.4) ve hücre kültür besisi ortamı (DMEM) içerisine alınmıştır. Yapılan mikroskopik incelemede, nanofiberlerin membran yüzeyinden sıyrılarak ayrıldıkları görülmüştür. Bu durumun nanofiber eldesinde kullanılan çözücünden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. DMF/DCM çözücü ortamı ile düzgün PCL nanofiberler elde edilebilmesine karşın, bu çözücüler CS için uygun olmadığından, CS membran ile fiber etkileşimi, fiberlerin yüzeye tutunması için yeterli olmamaktadır. Bu sonuçlar doğrultusunda PCL nanofiberlerin eldesinde, PCL ve CS için ortak çözücü olan HFIP'nin kullanılmasına karar verilmiştir. HFIP'nin, hidroksil gruplara sahip CS ile etkileşimini olanaklı kılan güçlü hidrojen bağlama özelliğinin olduğu bilinmektedir [201].

Gelişigüzel düzendeki fiberlerin üretilmesi amacıyla Çizelge 3.2 a'da belirtilen diğer koşullar kullanılmıştır. HFIP içerisinde hazırlanan %8'lik PCL (w/v) çözeltisi ile 12 kV voltaj değerinde, 10 cm toplayıcı mesafesinde ve 0.1 mL sa^{-1} akış hızında yapılan çalışmalarda elde edilen fiberlerin düzgün yapıya sahip olmadıkları, sarmal yapıların fazla olduğu, fiber yapılarda devamsızlık olduğu ve damlacık oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4. 6 a). Akış hızı 2 mL sa^{-1} değerine çıkarılarak yapılan elektroçirime işlemi sonrasında ise boncuk oluşumunda

azalma meydana gelmesine karşın sarmal yapılar düzleşme görülmemiştir (Şekil 4. 6 b). Voltaj değeri 11 kV ve 13 kV olarak değiştirilerek işlem tekrarlanmış fakat istenilen yapıda fiber elde edilememiştir. Bu durumun düşük PCL derişiminden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, fiberlerin kararsız ve düzensiz yapıda elde edilmelerine karşın, PBS (pH: 7.4) ve hücre besi ortamı DMEM'de bekletildiklerinde CS membran yüzeyinden ayrılmadıkları gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda PCL nanodesenlerin elde edilmesi için HFIP çözücüsü ile devam edilmesine ve derişimin arttırılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4. 5. %12 PCL (w/v, DCM/DMF, 50/50) çözeltilisinden elde edilen PCL fiberlerin SEM görüntüleri. a) 5 KX ve b) 40 KX

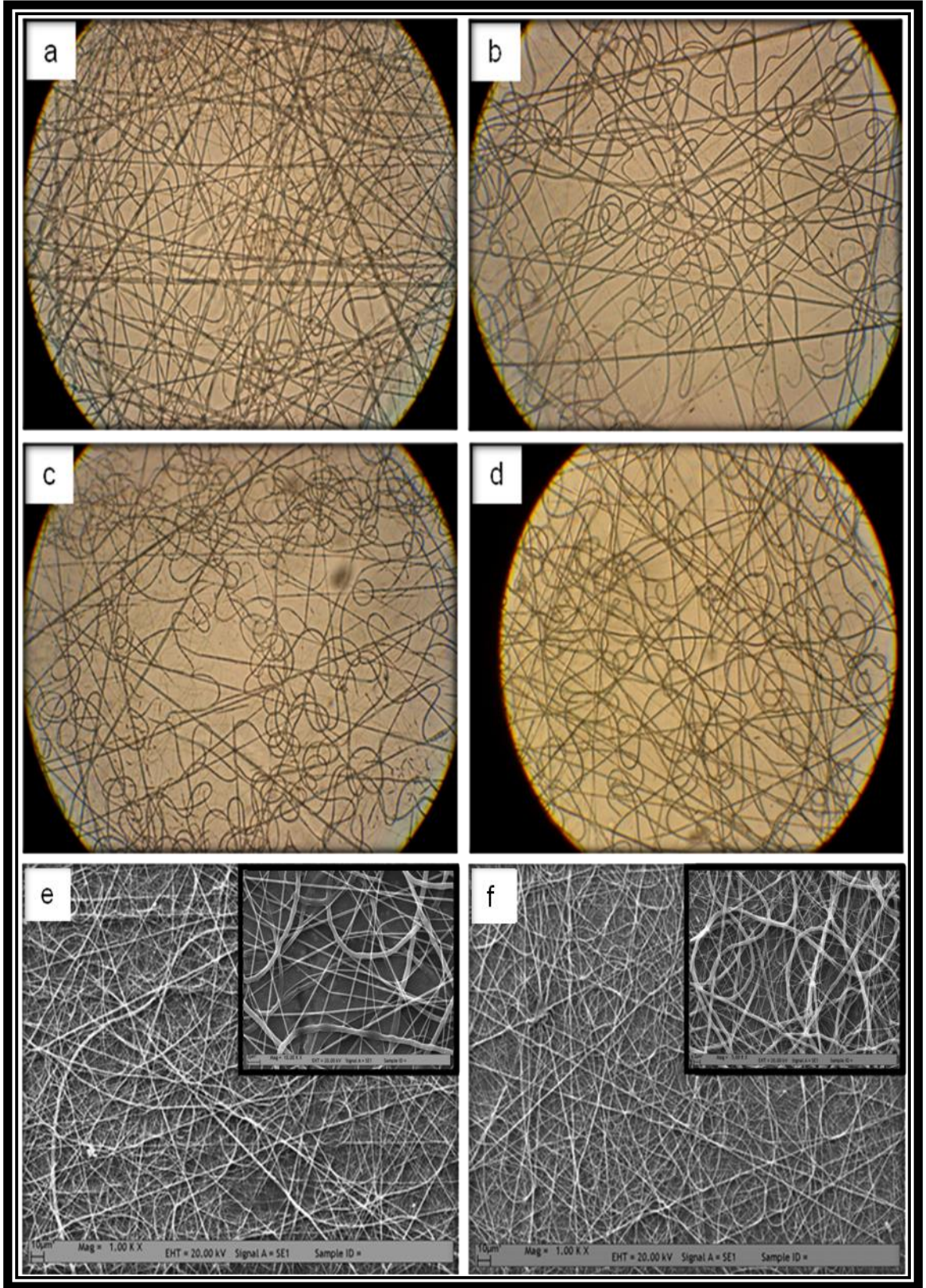


Şekil 4. 6. %8 PCL (w/v, HFIP) derişiminden farklı akış hızlarında üretilen fiberlerin lameldeki i-mikroskop görüntüleri (40X). 12 kV, 10 cm a) 0.1 mL sa⁻¹; b) 2 mL sa⁻¹

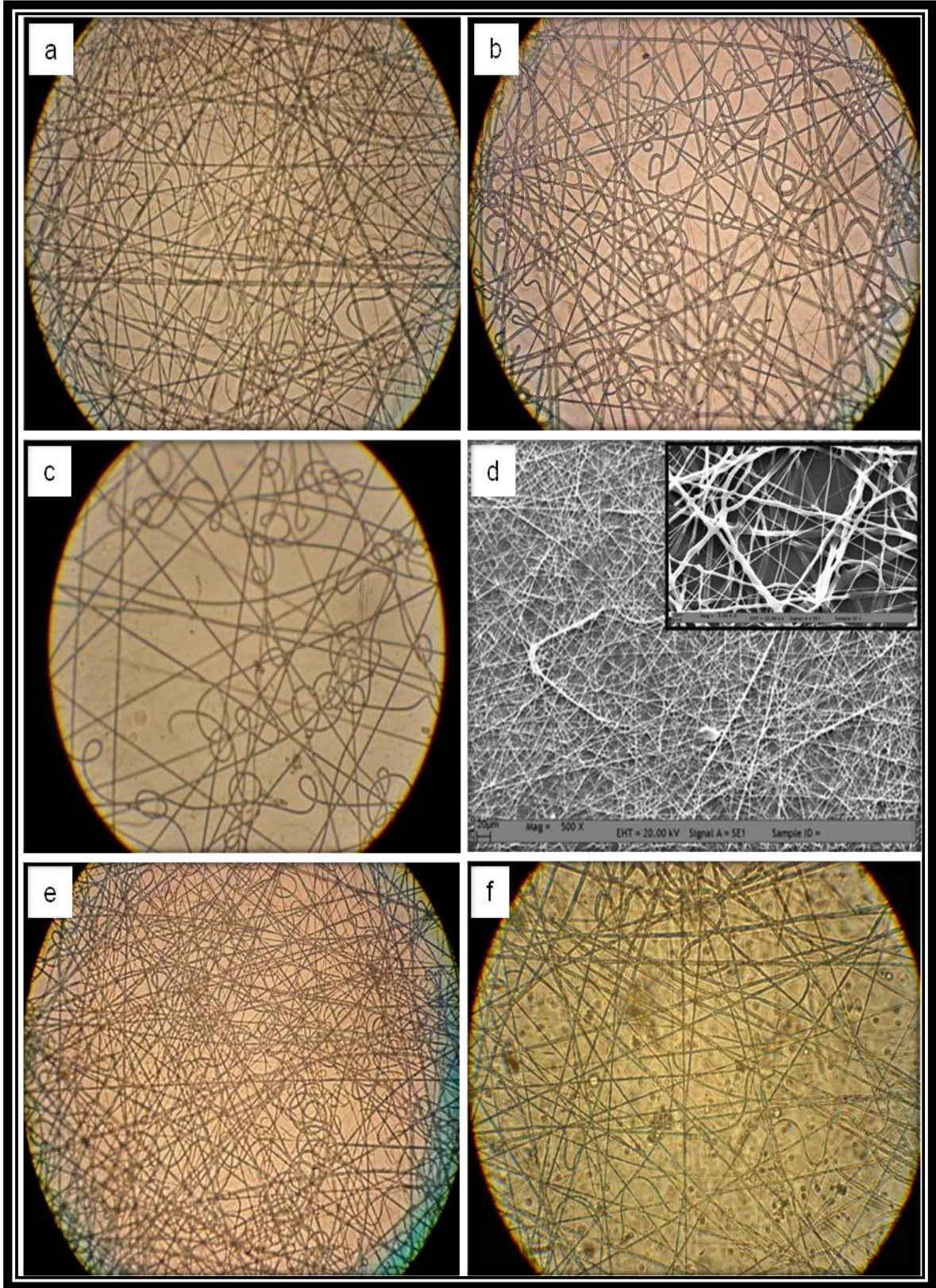
HFIP içerisinde %10 PCL (w/v) derişimi ile yürütölen elektroğirme çalışmalarında, sırasıyla 0.6, 2.0, 4.0 ve 12.0 mL sa⁻¹ akış hızlarında çalışmalar yapılmıştır (izelge 3.2 a). 0.6 mL sa⁻¹ akış hızında gerçekleştirilen çalışmalarda, uygulanan voltaj değeri 8 kV ile 22 kV aralığında değiştirilmiştir. Her bir voltaj değeri için toplayıcı mesafesi 6 cm ile 22 cm arasında değiştirilerek farklı voltaj değerlerinde toplayıcı mesafesinin etkisi incelenmiştir. Elde edilen fiberlerde boncuklanma olmadığı ve damlacık oluşmadığı gözlenirken, bu akış hızında sarmal fiber yapıların miktarının arttığı görölmüştür (şekil 4. 7). Toplayıcı mesafesinin değiştirilmesinin fiber yapıların düzgün bir şekilde elde edilmesinde olumlu bir etkisi olmamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda akış hızının arttırılmasına karar verilmiştir.

2 mL sa⁻¹ akış hızında yapılan çalışmalarda voltaj değeri 8-22 kV aralığında, toplayıcı mesafesi 6-22 cm aralığında değiştirilmiştir izelge (3.2 b). 6-8 cm arasındaki mesafede yapılan çalışmalarda, fiberlerin sarmalanmış yapılar sergiledikleri gözlenmiş ve ayrıca toplama mesafesinin yakın olmasından dolayı özöcünün jetten uzaklaşamaması nedeniyle düzensiz fiber benzeri yapılar oluşmuştur (şekil 4. 8 a ve b). 10 cm toplayıcı mesafesinde ve 6-15 kV aralığında elde edilen fiberlerde, düşük voltajların lüleenmeye yol açtığı (şekil 4. 8 c), 11 kV'tan itibaren düzgün fiber yapısı elde edilmesine karşın, fiber yapılarıdaki devamsızlığın düzelmemesi ile birlikte kalın fiberlerin oluştuğu (>2µm) gözlenmiştir (şekil 4. 8 d). 15 kV'dan itibaren ise elde edilen fiberlerin tekrar bozulmaya başladığı belirlenmiştir (şekil 4. 8 e). Toplayıcı mesafesinin 10-22 cm aralığındaki değerlerinde yapılan çalışmalarda fiberlerde çözelti atmaları ve sarmal davranış gözlenmiştir (şekil 4. 8 f). Fiberlerde yukarıda belirtilen sorunların giderilmesi amacıyla 4 mL sa⁻¹ akış hızında çalışılmasına karar verilmiştir.

4 mL sa⁻¹ akış hızında gerçekleştirilen çalışmalarda boncuk oluşumunu, çözelti atmalarını önlemek ve fiber yapısının devamlılığını sağlamak amacıyla, önceki çalışmaların ışığında 22 kV voltaj ile çalışmalara başlanmıştır. 20 cm toplayıcı mesafesinde yapılan denemelerde fiberlerde azalan oranda kopmalar meydana geldiği gözlenmiştir. Uygulanan voltaj değeri 20 kV'ye düşürölerek 20, 25 ve 35 cm toplayıcı mesafesi ile fiberler elde edilmiştir. 20 kV voltaj ve 20 cm toplayıcı mesafesinde elde edilen fiberlerde, sarmalanmanın minimum düzeyde olduğu ve boncuk oluşumunun gözlenmediği sonucuna varılmıştır (şekil 4. 9 a ve b).

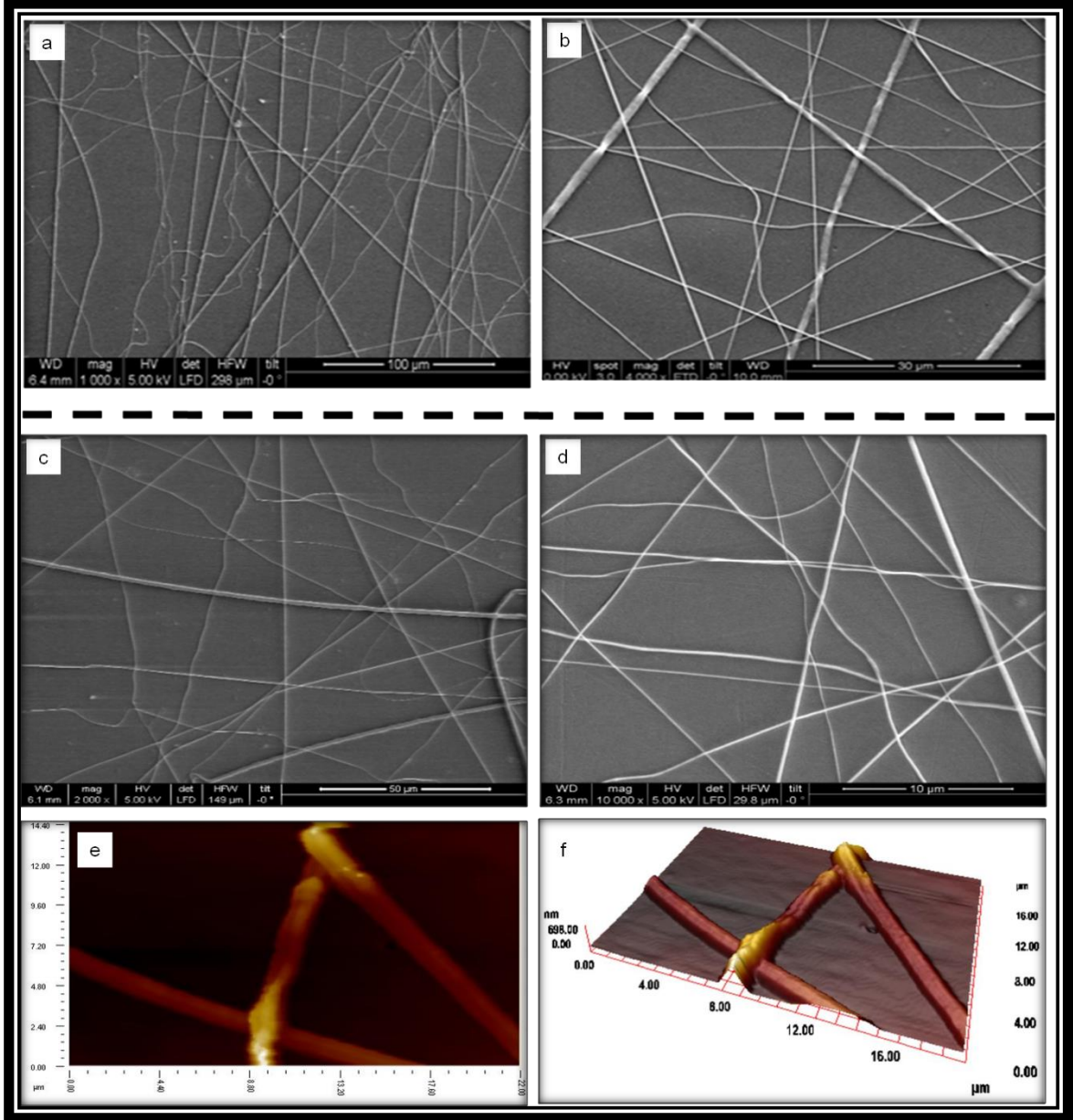


Şekil 4. 7. %10 PCL (w/v, HFIP) derişiminden 0.6 mL sa⁻¹ akış hızında üretilen fiberlerin lameldeki i-mikroskop görüntüleri (40X). 8 kV a) 6 cm, b) 10 cm, c) 20 cm, d) 22 cm. CS membrandaki SEM görüntüleri; 22 cm e) 18 kV (1 KX, sağ üst görüntü 10 KX) ve f) 20 kV (1 KX, sağ üst görüntü 5 KX)



Şekil 4. 8. %10 PCL (w/v, HFIP) derişiminden 2 mL sa⁻¹ akış hızında üretilen fiberlerin lameldeki i-mikroskop (40X) ve SEM görüntüleri. a) 6 cm, 8 kV; b) 7 cm, 13 kV; 10 cm c) 7 kV, d) 11 kV (500X, sağ üst görüntü 5 KX), e) 15 kV; f) 20 cm, 20 kV

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, CS membranların PCL fiberler ile gelişigüzel düzende desenlenmesi için %10 PCL (w/v, HFIP) derişimi, 4 mL sa⁻¹ akış hızı, 20 kV voltaj ve 20 cm toplayıcı mesafesi ile çalışılmasına karar verilmiştir. Şekil 4. 9 (a ve b)'de verilen SEM görüntüleri incelendiğinde elde edilen desenlerin gelişigüzel düzenlenmiş düzende fiberlerden oluştuğu görülmektedir. Elde edilen fiberlerin çapları 550±190 nm olarak hesaplanmıştır.

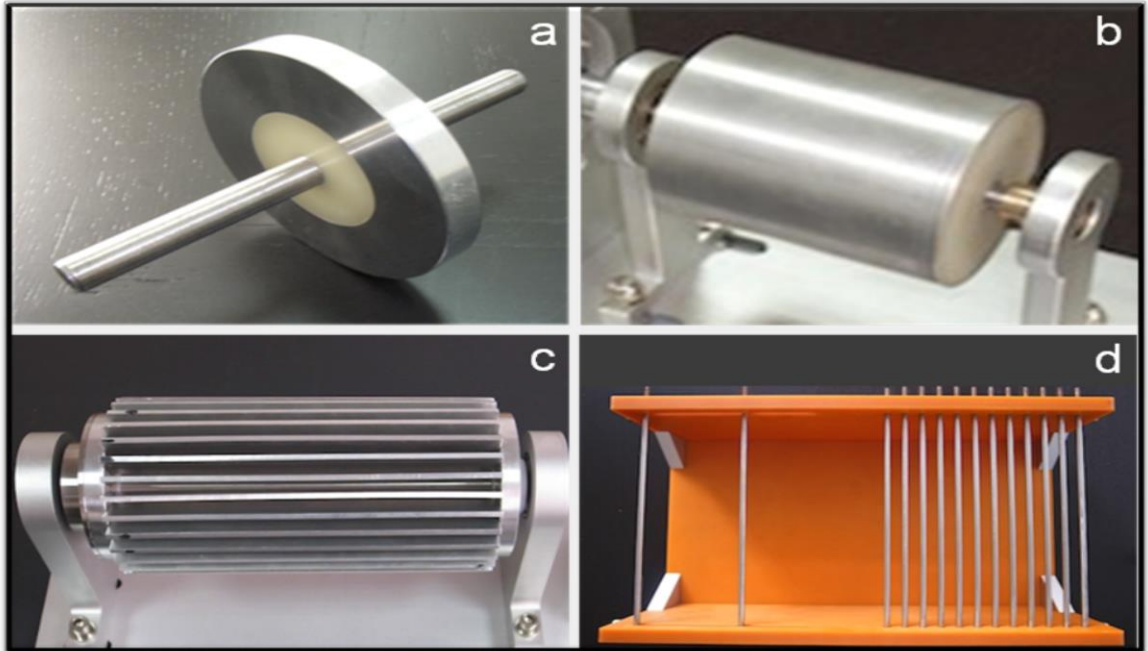


Şekil 4. 9. %10 PCL (w/v, HFIP) derişiminden, 4 mL sa⁻¹, 20 cm ve 20 kV koşuluyla elde edilen gelişigüzel düzende fiberlerin CS membrandaki SEM görüntüleri, a) 1 KX, b) 2 KX; 12 mL sa⁻¹, 35 cm, 22.5 kV koşulundaki SEM ve AFM görüntüleri c) 2 KX, d) 10 KX, e) 2-boyutlu f) 3-boyutlu

CS membranların aynı kimyasal yapıda fakat farklı boyutta nanofiberler ile desenlenmesi amacıyla, %10'luk PCL (w/v, HFIP) çözeltisinden farklı elektroçirme koşullarında fiber elde edilmesi için çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, daha önce elde edilen sonuçlar doğrultusunda, Bölüm 4.1.1.3 'de belirtilen %12'lik PCL çözeltisinden nanofiber eldesi için uygulanan koşul kullanılmıştır. 22.5 kV voltaj değerinde, 35 cm toplayıcı mesafesinde ve 12 mL sa⁻¹ akış hızında yapılan desenlenme çalışmasında, CS membranlar üzerinde 205±65 nm fiber çapına sahip gelişigüzel düzende PCL nanodesenler elde edilmiştir (Şekil 4. 9 c-f).

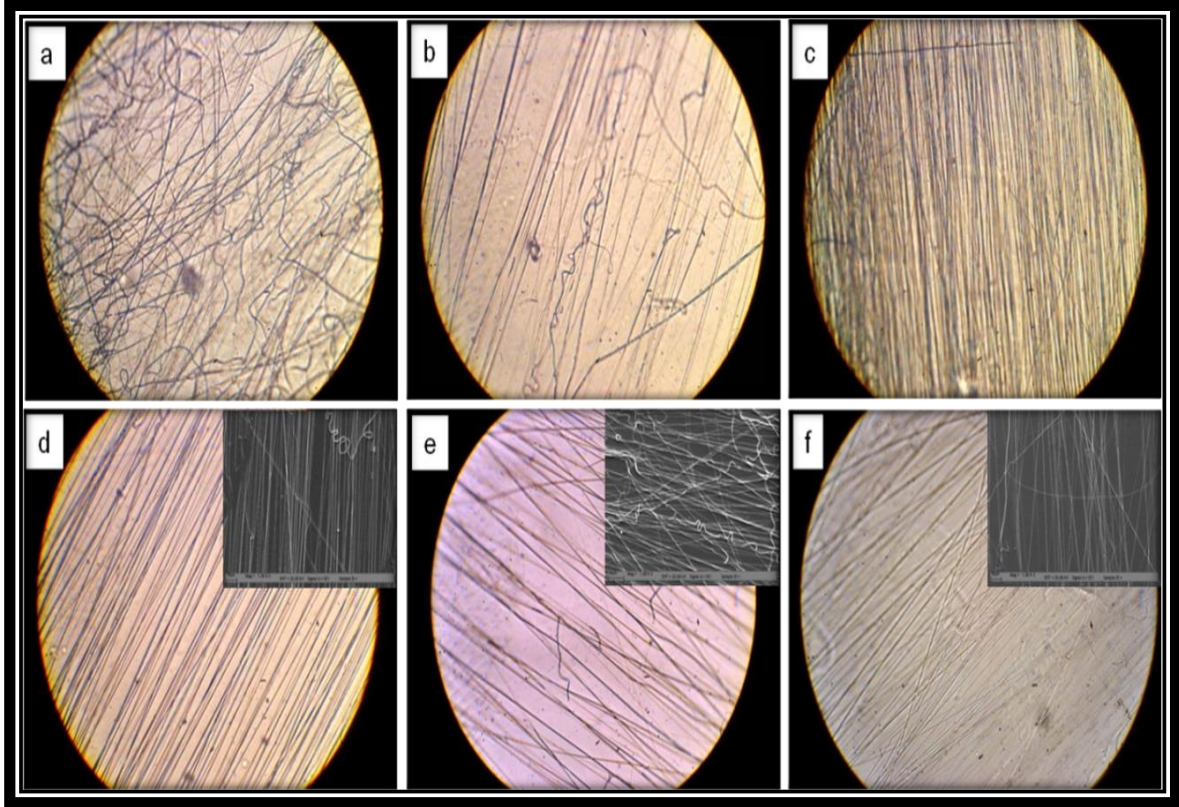
ii. Kitosan membranların polikaprolakton nanofiberler ile hizalanmış düzende desenlenmesi

CS membran yüzeylerde farklı desen özelliklerinin hücre davranışlarına olan etkisini incelemek amacıyla hizalanmış fiberlerin üretimine yönelik optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Hizalanmış düzende fiberlerin elde edilebilmesi için farklı türlerde toplayıcılar kullanılmaktadır (Şekil 4. 10, [202]). Bu çalışmada, üzerinde hizalanmış yapıya sahip nanodesenlerin elde edilmesi amacıyla, PCL fiberler örneklere uygunluğu açısından tekerlek tipi döner toplayıcıya sabitlenmiş CS membranlar üzerine toplanmıştır (Şekil 4. 10. a).



Şekil 4. 10. Hizalanmış düzende fiberlerin üretiminde kullanılan toplayıcılara örnekler. a) Tekerlek tipi, b) Silindirik, c) Paralel ızgaralı döner toplayıcı ve d) Paralel elektrodlu toplayıcı

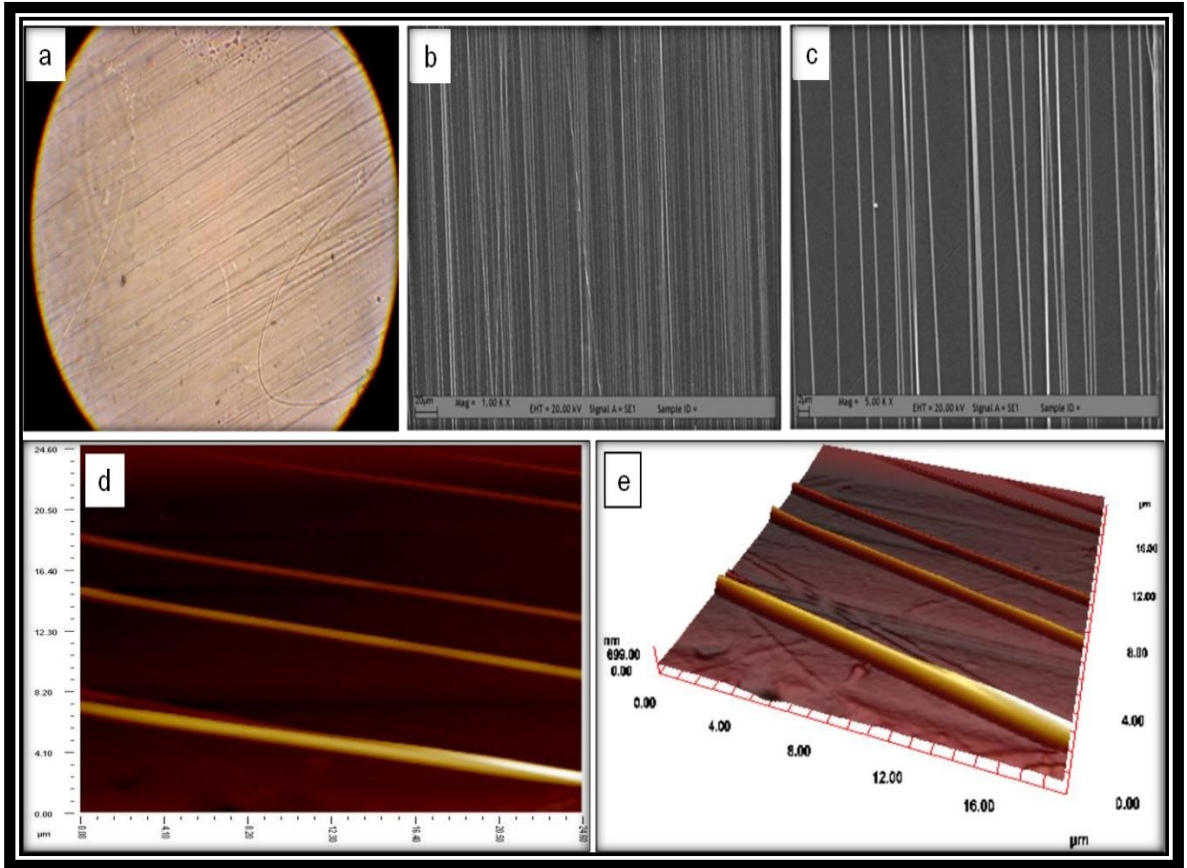
%10'lük derişime sahip PCL çözeltilisinden 0.1 mL sa⁻¹ ile 2.0 mL sa⁻¹ arasında değişen akış hızlarında, 11-18 kV aralığındaki voltaj değerlerinde ve 10-20 cm arasındaki toplayıcı mesafelerinde elektroğirme ile fiberler elde edilmiştir (Çizelge 3.2. b). 2,000 ve 2,400 rpm toplayıcı dönüş hızları karşılaştırdığında, toplanan fiberlerin en iyi 2,400 rpm'de hizalandığı belirlenerek çalışmalar bu hızda sürdürülmüştür (Şekil 4. 11 d ve e).



Şekil 4. 11. %10 PCL (w/v, HFIP)'den üretilen hizalanmış düzendeki fiberlerin lameldeki i-mikroskop (40X) ve CS membrandaki SEM görüntüleri. 2 mL sa⁻¹, 18 kV a) 20 cm, b) 18 cm; c) 15 kV, 12 cm; 11 kV, 10 cm d) 2,400 rpm, e) 2,000 rpm; 1.5 mL sa⁻¹ f) 18 kV, 18 cm (2,400 rpm, sağ üst görüntüler 1 KX)

2 mL sa⁻¹ akış hızında, 18 kV voltajda, 20 cm mesafede yapılan çalışmalarda mikrometre boyutunda hizalanmamış fiberler elde edilmiştir (Şekil 4. 11 a). Toplayıcı mesafesi 18 cm'ye düşürüldüğünde hizalanmış düzende fiberlerde artış olmasına karşın fiberlerin istenilen düzeyde olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4. 11 b). 15 kV ve 12 cm mesafede elde edilen fiberlerde hizalanmanın daha da düzgün olduğu fakat fiberlerin yine kalın olduğu belirlenmiştir (Şekil 4. 11 c). Voltaj 11 kV'ye ve mesafe 10 cm'ye düşürüldüğü zaman bu akış hızında en iyi hizalanma elde edilmesine rağmen fiberlerdeki çap sorununun halen devam ettiği

gözlenmiştir (4. 11 d). 2 mL sa⁻¹ akış hızında mesafenin ve uygulanan voltajın azalması fiberlerin hizalanmasını iyileştirirken, istenilen boyutta fiber üretimi sağlanamamıştır. Bu bakımdan akış hızının düşürülmesine karar verilmiştir. 1.5 mL sa⁻¹ akış hızında, 18 kV ve 18 cm toplayıcı mesafesinde fiberlerin hizalanması istenilen düzeyde olmamakla birlikte, fiberlerin inceldiği saptanmıştır (Şekil 4. 11 f). Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda akış hızının düşürülmesine karar verilmiştir. Akış hızı 0.1 mL sa⁻¹ değerine düşürüldüğünde, 11 kV voltaj ve 10 cm toplayıcı mesafesi ile gerçekleştirilen çalışmalarda, CS membran üzerinde 385±62 nm çapında doğrusal düzende hizalanmış nanofiberlerden oluşan istenilen özellikte desenler elde edilmiştir (Şekil 4. 12 a-e). Elde edilen bu sonuç doğrultusunda, CS membranların hizalanmış doğrusal düzende PCL nanofiberler ile desenlenmesi çalışmalarında, 0.1 mL sa⁻¹ akış hızı, 11 kV voltaj, 10 cm mesafe ve 2,400 rpm toplayıcı dönüş hızı koşulunun kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4. 12. %10 PCL (w/v, HFIP), 0.1 mL sa⁻¹, 11 kV, 10 cm (2,400 rpm) koşulundan elde edilen hizalanmış düzendeki fiberlerin lameldeki i-mikroskop ve CS membrandaki SEM ve AFM görüntüleri. a) 40X, b) 1 KX, c) 5 KX; d) 2-boyutlu ve e) 3-boyutlu

4.1.1.4. Kitosan membranların polikaprolakton/kollajen nanofiberler ile desenlenmesi

Kitosan membranlar üzerinde farklı kimyasal yapıya sahip nanodesenlerin elde edilmesi amacıyla, PCL ile doğal bir polimer olan ve hücre yapışmasını desteklediği bilinen Tip I kollajen (Col) kullanılarak kompozit yapıya sahip nanofiberler üretilmiştir.

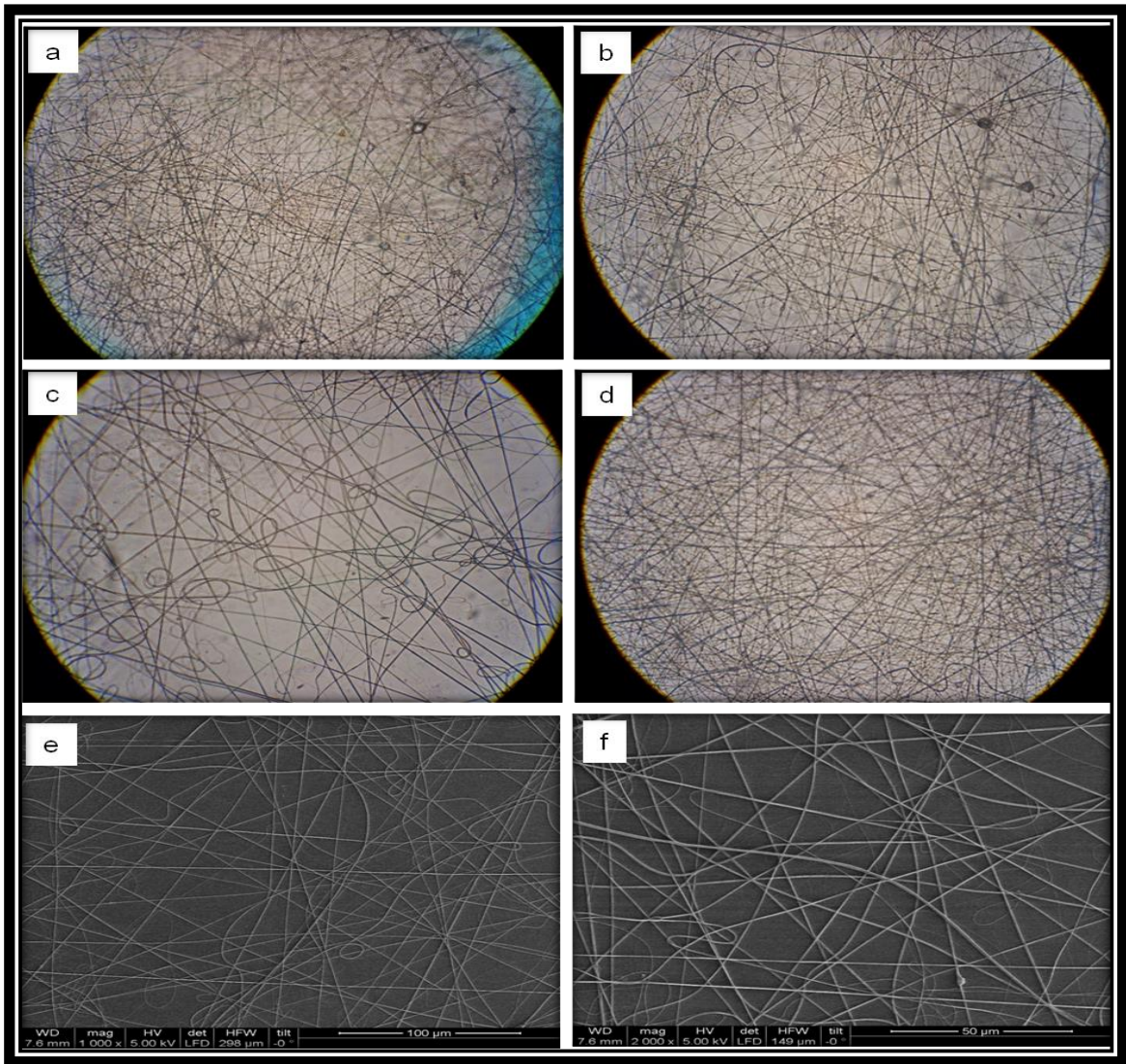
Kitosan membranların polikaprolakton/kollajen nanofiberler ile gelişigüzel düzende desenlenmesi

Kitosan membranlar üzerinde gelişigüzel düzende PCL/Col nanofiberlerin elde edilmesi amacıyla HFIP içerisinde %8'lik (w/v, %5.5 PCL, %2.5 Col içeren) PCL/Col çözeltisi hazırlanarak Çizelge 3. 3'de belirtilen koşullarda fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Literatürden edilen bilgilerin ışığında 20 kV voltaj değerinde, 20 cm toplayıcı mesafesinde ve 0.5 mL sa⁻¹ akış hızında gerçekleştirilen elektroçirme işlemi sonrasında CS membranlarda toplanan fiberlerin yer yer sarmal yapıda olduğu ve damlacıklar içerdiği görülmüştür (Şekil 4. 13 a). 0.75 mL sa⁻¹, 12 kV ve 13 cm koşullarında elde edilen fiberlerde damlacık oluşumu azalmakla beraber sarmal fiberler varlığını sürdürmüştür (Şekil 4. 13 b). Mesafe sabit tutularak 2 mL sa⁻¹ akış hızına çıkıldığında, 15 kV voltajda sarmal fiberlerin oluşmaya devam ettiği fakat fiberlerin kalın olmakla birlikte benzer kalınlığa sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4. 13 c). Uygulanan akış hızı 3 mL sa⁻¹ değerine çıkarıldığında sarmal yapıların azaldığı, fakat elde edilen fiberlerin çaplarında artış olduğu gözlenmiş, uygulanan voltajın artırılmasına karar verilmiştir (Şekil 4. 13 d). Voltaj 20 kV'ye yükseltildiğinde, 3 mL sa⁻¹ akış hızı ve 10 cm toplayıcı mesafesinde elde edilen fiberlerin istenilen düzeyde gelişigüzel düzende yapıya sahip oldukları ve fiber çap dağılımının dar bir aralıkta olduğu görülmüştür. Nanofiberlerin çapı 480±20 nm olarak hesaplanmıştır (Şekil 4. 13 e ve f).

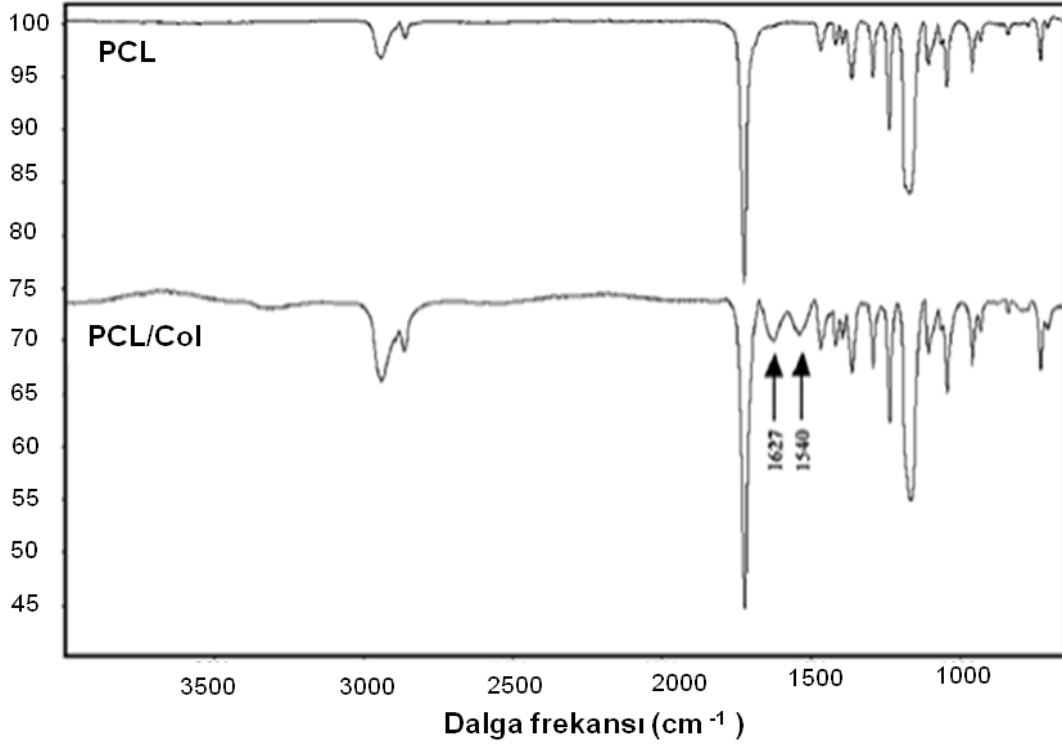
Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda, CS membranların PCL/Col ile gelişigüzel düzende desenlenmesi için 20 kV voltaj, 10 cm toplayıcı mesafesi, 3 mL sa⁻¹ akış hızı koşulunun uygun olduğuna karar verilmiştir.

PCL ve PCL/Col nanofiberlerin yüzey karakterizasyonları, FTIR-ATR spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4. 14'de verilen, PCL ve PCL/Col nanofiberlere ait FTIR-ATR spektrumunda görüldüğü gibi; simetrik CH₂ gerilmesine bağlı 2866 cm⁻¹, asimetrik CH₂ gerilmesine bağlı 2943 cm⁻¹, C=O

gerilmesine bağlı 1721 cm^{-1} , C-C ile C-O gerilmesine bağlı 1294 cm^{-1} ve asimetrik C-O-C gerilmesine bağlı 1239 cm^{-1} dalga boylarındaki pikler PCL'in karakteristik pikleri olarak tanımlanmaktadır. PCL/Col fiber içerisinde, kollajen proteininin varlığını kanıtlayan karakteristik pikler ise; yine Şekil 4. 14'deki spektrumda görülen Amid-I ve Amid-II bağlarında meydana gelen gerilme nedeniyle ortaya çıkan ve sırasıyla 1627 cm^{-1} ile 1540 cm^{-1} dalga boylarında konumlanan piklerdir. Sonuç olarak; PCL ve PCL/Col spektrumları karşılaştırdığında kollajenin başarılı bir Şekilde PCL yapısına katıldığı spektrumda beliren Amid-I ve Amid-II piklerinden net bir Şekilde anlaŐılmaktadır.



Şekil 4. 13. %8 PCL/Col (w/v, HFIP)'den üretilen gelişigüzel düzende ki fiberlerin lameldeki i-mikroskop (40X) ve CS membrandaki SEM görüntüleri. a) 0.5 mL sa^{-1} , 20 cm, 20 kV; b) 0.75 mL sa^{-1} , 13 cm, 12 kV; c) 2 mL sa^{-1} , 13 cm, 15 kV; d) 3 mL sa^{-1} , 13 cm, 15 kV; e) 2 KX ve f) 5 KX

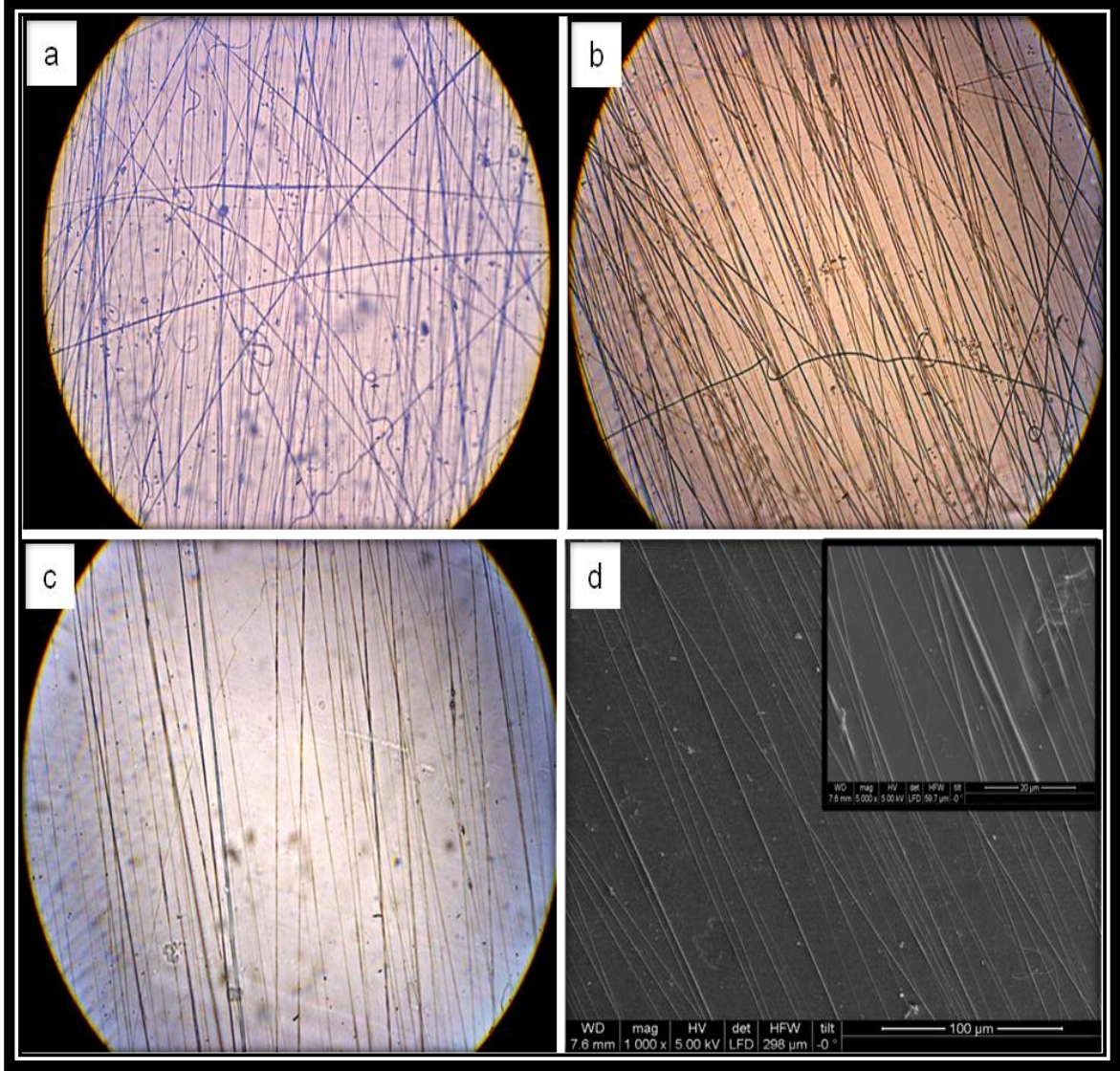


Şekil 4. 14. PCL ve PCL/Col fiberlere ait FTIR-ATR spektrumu

Kitosan membranların hizalanmış düzende polikaprolakton/kollajen nanofiberler ile desenlenmesi

Kitosan membranlar üzerinde hizalanmış düzende PCL/Col nanofiber desenlerin elde edilmesi amacıyla, fiberler 2,400 rpm hızında dönen tekerlek tipi toplayıcı üzerine sabitlenmiş CS membranlar üzerine toplanmıştır. %8'lik derişime sahip çözeltiden hizalanmış düzende nanofiberlerin elde edilmesi için gerekli deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3. 3 b). Gelişigüzel düzendeki PCL/Col fiberlerin üretiminde kullanılan 15 kV, 13 cm, 3 mL sa⁻¹ üretim koşulunda hizalanma istenilen düzeyde olmamakla beraber damlacık oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4. 15 a). 20 kV, 20 cm, 0.5 mL sa⁻¹ koşulunda ise hizalanmada düzelme gözlenmiş, fakat fiberlerin istenilen düzeyden daha kalın oldukları gözlenmiştir (Şekil 4. 15 b). Toplayıcı türünün değişmesi ile aynı koşullarda toplanan gelişigüzel fiberlere göre hizalanmış fiberlerde bir iyileşme gözlenmiştir. Bu düzelmenin, fiberlerin dönen toplayıcıda toplanması sırasında toplayıcının kendisine ulaşan fiberleri gererek, hem fiberlerde çapın azalmasına hem de sarmal yapıları engellemesine yol açarak sağlanabildiği yorumu yapılabilir. Uygun çapa sahip fiberlerin üretilebilmesi amacıyla akış hızı azaltılarak bölüm 3.1.3.2'de açıklanan PCL nanofiberler için elde edilen koşullar doğrultusunda, 11 kV, 10 cm, 0.1 mL sa⁻¹ koşullarında eğirme işlemi yapılarak istenilen düzeyde

nanofiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar altında elde edilen nanofiberlerin çapı 276 ± 105 nm olarak hesaplanmıştır (Şekil 4. 15 c ve d).



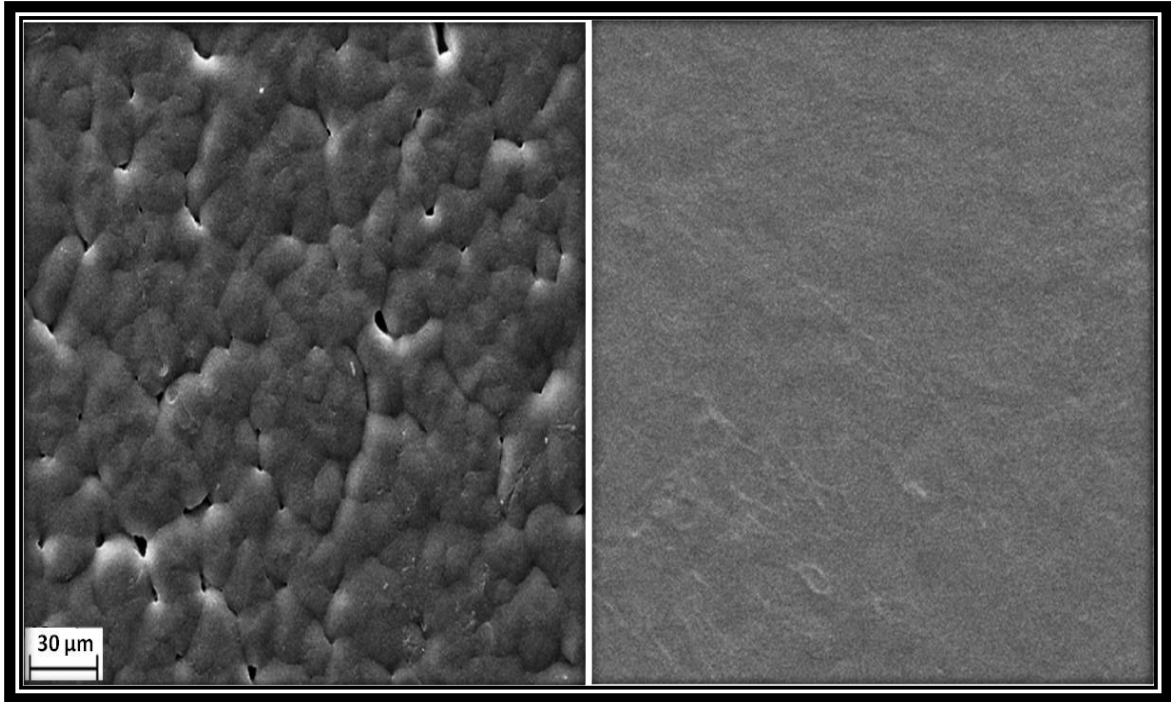
Şekil 4. 15. %8 PCL/Col (w/v, HFIP) çözeltisinden üretilen hizalanmış düzende ki fiberlerin lameldeki i-mikroskop ve CS membrandaki SEM görüntüleri (2,400 rpm). a) 3 mL sa^{-1} , 13 cm, 15 kV (40X); b) 0.5 mL sa^{-1} , 20 cm, 20 kV (40X); 0.1 mL sa^{-1} 10 cm, 11 kV c) 40X, d) 1 KX (sağ üst görüntü 5 KX)

4.1.2. Polikaprolakton Membranların Hazırlanması, Elektroğirme ile Desenlenmesi ve Desenlenmiş Yüzeylerin Karakterizasyonu

Membran yüzeyi ile aynı kimyasal yapıya sahip nanofiberlerden oluşan desenlerin hücre davranışlarına etkisini incelemek amacı ile PCL membranlar hazırlanmış ve membranlara PCL nanofiber ile gelişigüzel ve hizalanmış düzende desenleme çalışmaları yapılmıştır.

4.1.2.1. Polikaprolakton membranların hazırlanması

Desenlenecek yüzeylerin elde edilebilmesi amacıyla membran formda PCL yüzeylerin (kalınlık: ~ 60 µm) üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, kullanılacak membranların üretiminde CS membranlarda olduğu gibi çözücü döküm tekniğinden yararlanılmıştır. PCL membranların CS membranlar gibi yüzeye yapışma sorunu olmadığından membranlar cam Petrilere dökülerek elde edilmiştir. CS membranlardan farklı olarak, PCL membranların Petri ile temas eden yüzeyleri havaya bakan yüzeylerinden farklı bir morfolojiye sahip olduğundan PCL membranların desenlenecek yüzeyi önem arz etmektedir. Membranların Petri kapları ile temas etmeyen (havaya bakan) yüzeyleri öbek öbek ve öbekler arası boşluklar içerirken (Şekil 4. 16 a), Petri ile temas eden yüzeyi düz formda kalmaktadır (Şekil 4. 16 b). Bu bakımdan hücrelerin fiber desenler dışındaki unsurlardan etkilenmesini minimuma indirmek amacıyla PCL yüzeylerin Petri ile temas eden yönleri desenlenecek bölge olarak seçilmiştir.



Şekil 4. 16. PCL membranlara ait SEM görüntüleri. a) Membranın havaya bakan yüzü ve b) Membranın Petri'ye bakan yüzü (2 KX)

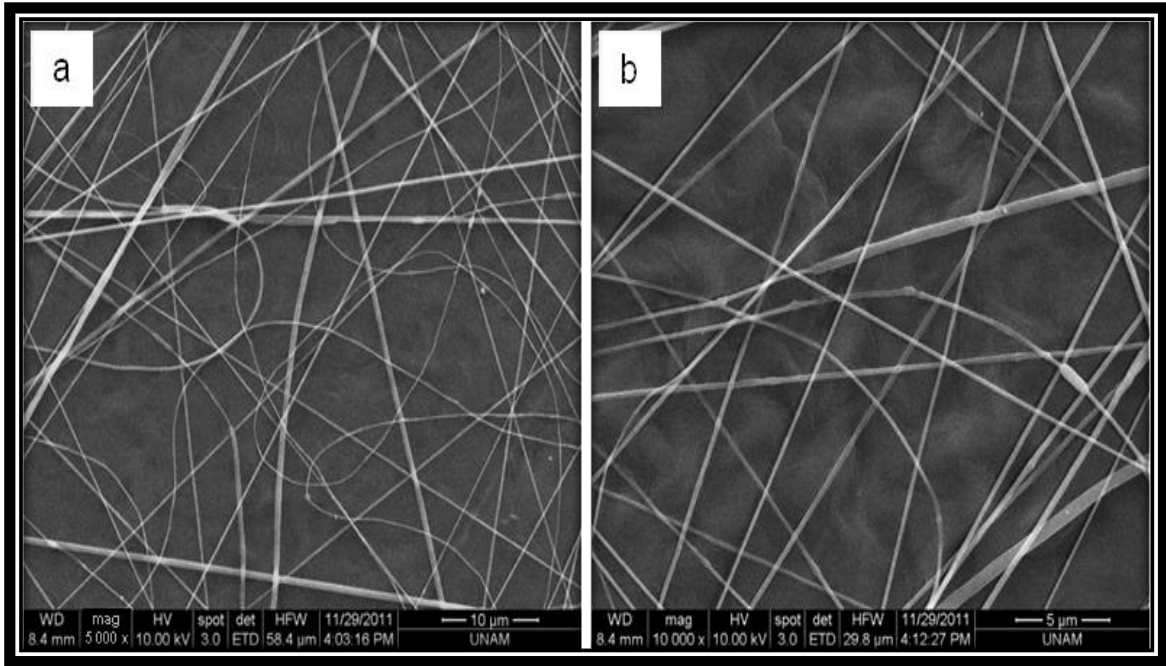
4.1.2.2. Polikaprolakton membranların polikaprolakton nanofiberler ile desenlenmesi

Hücre kültür çalışmalarında hem PCL ile desenlenmiş CS yüzeylerle membran kimyasının etkisini karşılaştırmak hem de desenlenmenin türünün etkisini

incelemek amacıyla PCL membranlar PCL nanofiberler ile gelişigüzel ve hizalanmış düzende desenlenmişlerdir. Desenlenmiş yüzeylerin karakterizasyonu SEM ile gerçekleştirilmiştir.

i. Polikaprolakton membranların polikaprolakton nanofiberler ile gelişigüzel düzende desenlenmesi

PCL membranların PCL nanofiberler ile gelişigüzel düzende desenlenmesi için yapılan çalışmalarda, membran kimyasının etkisini incelemek amacıyla gelişigüzel desenlenmiş PCL membranlardaki nanofiber desenlerin CS membrandakilerle benzer olması gerekmektedir. Bu bakımdan HFIP içerisinde %10'luk PCL (w/v) çözeltilisinden CS membranların desenlenmesinde kullanılan 12 mL sa⁻¹, 22.5 kV ve 35 cm koşulları ile desenleme gerçekleştirilmiştir (Şekil 4. 17). Desenleme çalışmalarında elde edilen nanofiberlerin çapları SEM görüntülerinden 211±70 nm olarak hesaplanmıştır.

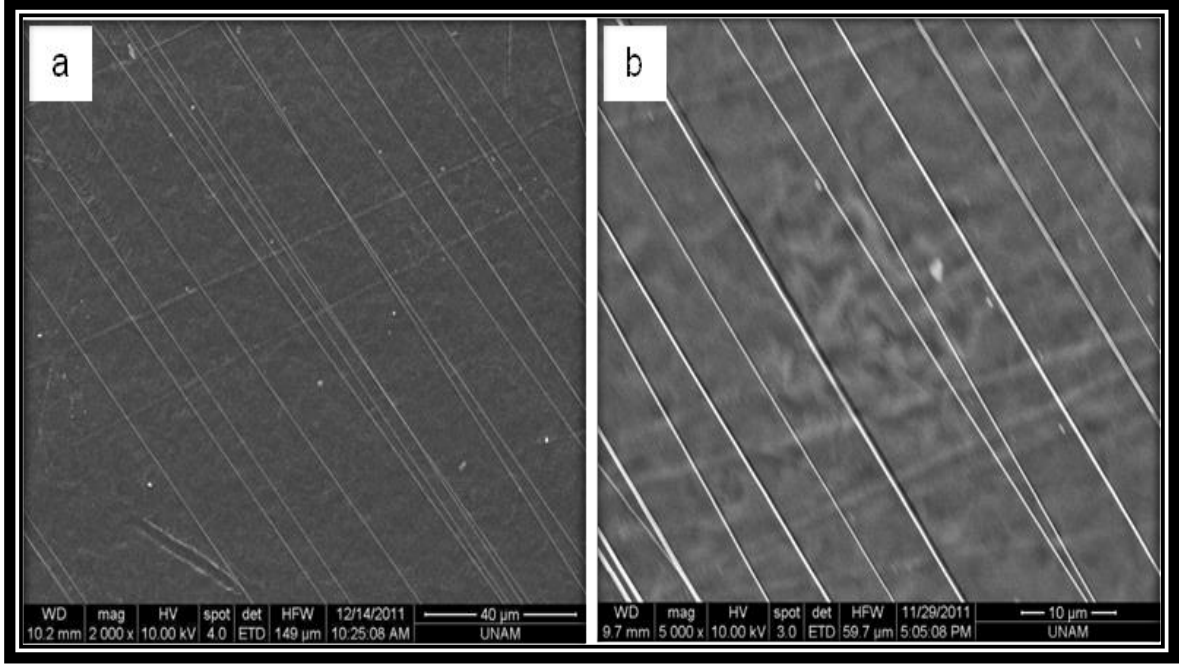


Şekil 4. 17. %10 PCL (w/v, HFIP), 12 mL sa⁻¹, 35 cm ve 22.5 kV koşulunda PCL membranlara gelişigüzel düzende desenlenmiş nanofiberlerin SEM görüntüleri. a) 5 KX ve b) 10 KX

ii. Polikaprolakton membranların polikaprolakton nanofiberler ile hizalanmış düzende desenlenmesi

PCL membranlardaki nanofiberlerin farklı desen özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla hizalanmış düzende fiberler ile PCL membranlara desenleme yapılmıştır.

Bu amaçla CS membranların hizalanmış fiberler ile desenlenmesinde kullanılan %10'luk PCL (w/v, HFIP) çözeltisinden 0.1 mL sa⁻¹ akış hızı, 10 cm toplayıcı mesafesi, 11 kV voltaj ve 2,400 rpm toplayıcı dönüş hızı koşullarında üretilmiş nanofiberler PCL yüzeylere desenlenmiştir. Elde edilen SEM görüntülerinden nanofiberlerin çapı 228±43 nm olarak bulunmuştur (Şekil 4. 18).



Şekil 4. 18. %10 PCL (w/v, HFIP), 0.1 mL sa⁻¹, 10 cm, 11 kV koşulunda PCL membrana desenlenmiş hizalanmış düzendeki nanofiberlerin SEM görüntüleri. a) 2 KX ve b) 10 KX

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hücre kültür çalışmaları, PCL ve PCL/Col nanofiberler ile gelişigüzel ve hizalanmış düzende desenlenmiş CS membranlar ve PCL nanofiberler ile gelişigüzel ve hizalanmış düzende desenlenmiş PCL membranlar ile gerçekleştirilmiştir. Hücre kültür çalışmalarında kullanılacak olan gelişigüzel düzende desenlenmiş (PCL-G1, PCL-G2 ve PCL/Col-G) ve hizalanmış düzende (PCL-H ve PCL/Col-H) desenlenmiş membranlara ait üretim koşulları ve elde edilen fiber çapları Çizelge 4.2'de, bu membranlara ait SEM görüntüleri ise Şekil 4. 19'da toplu bir şekilde verilmiştir. Çalışmalarda kullanılacak örnekler Çizelge 4.3'de belirtilen şekilde kısaltılarak kodlanmıştır. Gelişigüzel desenlenmiş fiberler arasındaki boşluk alanı 145±62 µm² ve hizalanmış fiberler arasındaki mesafe 15±5 µm olarak hesaplanmıştır. Membranlardaki boş alanlar hücrelerin membran yüzeyi ile ilk etkileşimleri için yeterlidir.

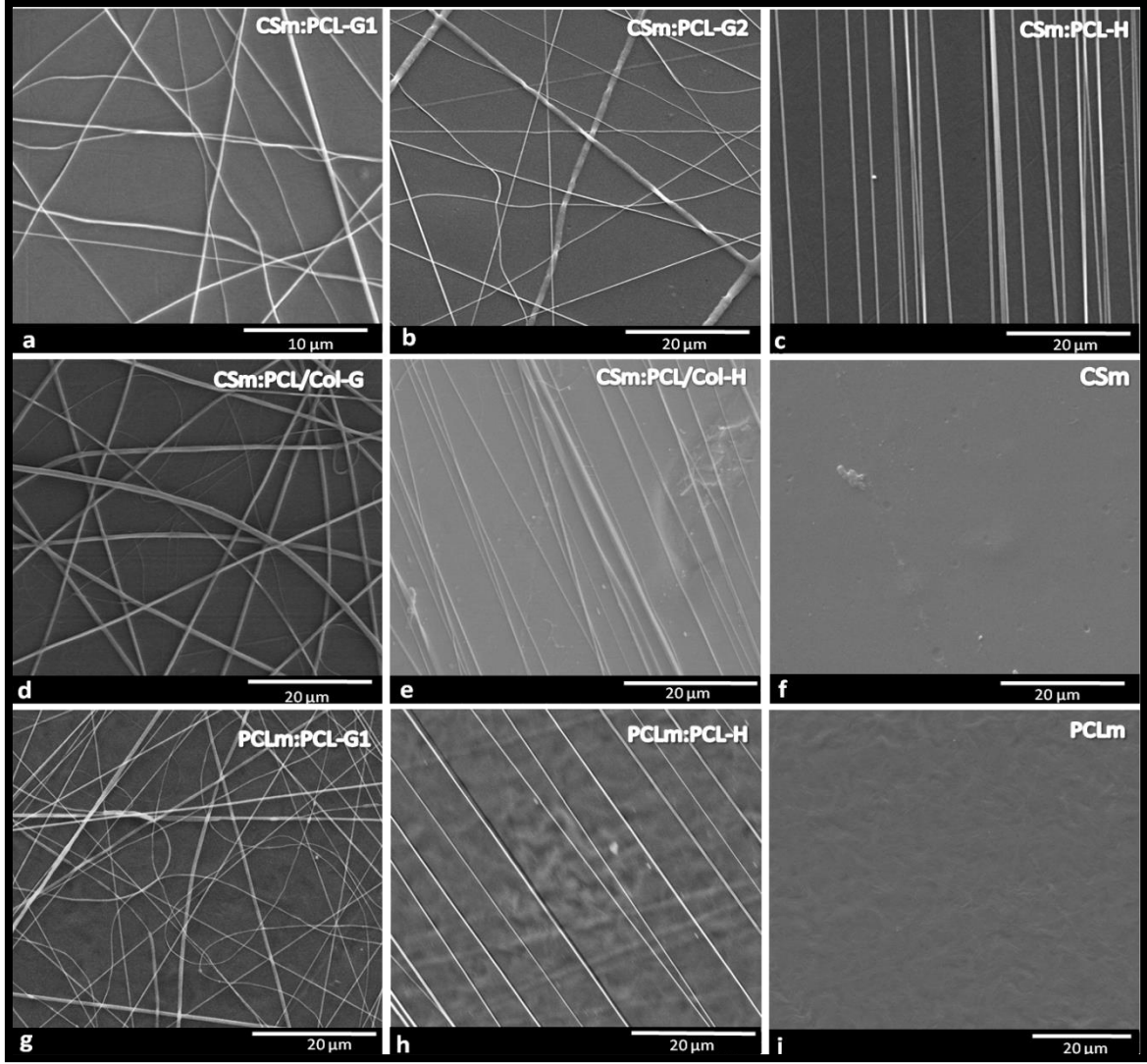
Çizelge 4. 2. Çizelge 4. 2. Çapraz bağlı CS ve PCL membranlar üzerine desenlenmiş PCL ve PCL/Col nanofiberlerin üretim koşulları ve çap değerleri

Membran Türü	Desenlemiş Fiber Türü*	Derişim (% w/v)	Voltaj (kV)	Toplayıcı Mesafesi (cm)	Akış Hızı (mL sa ⁻¹)	Toplayıcı Dönüş Hızı (rpm)	Fiber Çapı (nm)
CS	PCL-G1	10.0	22.5	35.0	12.0	-	205±65
	PCL-G2		20.0	20.0	4.0	-	550±190
	PCL/Col-G**	8.0	20.0	10.0	3.0	-	480±20
	PCL-H	10.0	11.0		0.1	2,400	385±62
	PCL/Col-H**	8.0	11.0		0.1		276±105
PCL	PCL-G1	10.0	22.5	35.0	12.0	-	211±70
	PCL-H		11.0	10.0	0.1	2,400	228±43

*PCL-G1, PCL-G2, PCL/Col-G: gelişigüzel düzendeki nanofiberler. PCL-H, PCL/Col-H:hizalanmış düzendeki nanofiberler.** PCL/Col: 55/25 (w/w)

Çizelge 4. 3. Çalışmalarda kullanılacak örnekler ve kısaltmaları

Kodlama	Açıklama
CSm	CS membran
PCLm	PCL membran
PCL-G1	Gelişigüzel düzendeki PCL nanofiberler
PCL-G2	Gelişigüzel düzendeki PCL nanofiberler
PCL/Col-G	Gelişigüzel düzendeki PCL/Col nanofiberler
PCL-H	Hizalanmış düzendeki PCL nanofiberler
PCL/Col-H	Hizalanmış düzendeki PCL/Col nanofiberler
CSm:PCL-G1	PCL-G1 ile desenlenmiş CS membran
CSm:PCL-G2	PCL-G2 ile desenlenmiş CS membran
CSm:PCL/Col-G	PCL/Col-G ile desenlenmiş CS membran
PCLm:PCL-G1	PCL-G1 ile desenlenmiş PCL membran
CSm:PCL-H	PCL-H ile desenlenmiş CS membran
PCLm:PCL-H	PCL-H ile desenlenmiş PCL membran
CSm:PCL/Col-H	PCL/Col-H ile desenlenmiş CS membran



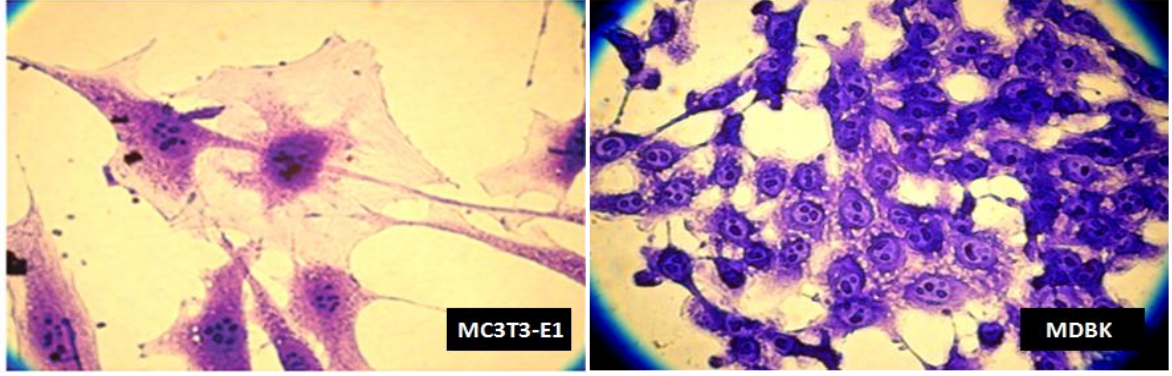
Şekil 4. 19. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS ve PCL membranlara ait SEM görüntüleri. a) CSm:PCL-G1, b) CSm:PCL-G2, c) CSm:PCL-H, d) CSm:PCL/Col-G, e) CSm:PCL/Col-H, f) CS membran, g) PCLm:PCL-G1, h) PCLm:PCL-H, i) PCL membran

4.1.3. Hücre Kültür Çalışmaları

Sunulan tez çalışmasında elektroçizme tekniği ile desenlemiş ve desenlenmemiş CS ve PCL membranlar üzerinde hücre davranışlarının incelenmesi amacıyla *in vitro* koşullarda hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. MC3T3-E1 ve MDBK hücrelerinin kullanıldığı çalışmalarda membran yüzeylere olan hücre yapışması ve üremesi incelenmiştir. Hücrelerin morfolojik yapısı SEM ve konfokal mikroskobu analizleri ile belirlenmiştir. PCL nanofiberler ile gelişigüzel ve hizalanmış düzende desenlenen CS ve PCL yüzeylerde membran kimyasının hücre davranışlarına olan etkisi nanofiberlerin yönelimi de hesaba katılarak incelenmiştir. Aynı zamanda

CS membranlardaki farklı desen özelliklerinin hücresel davranışlara olan etkisi fiber çaplarına ve fiberlerin kimyasal bileşimine bağlı olarak araştırılmıştır.

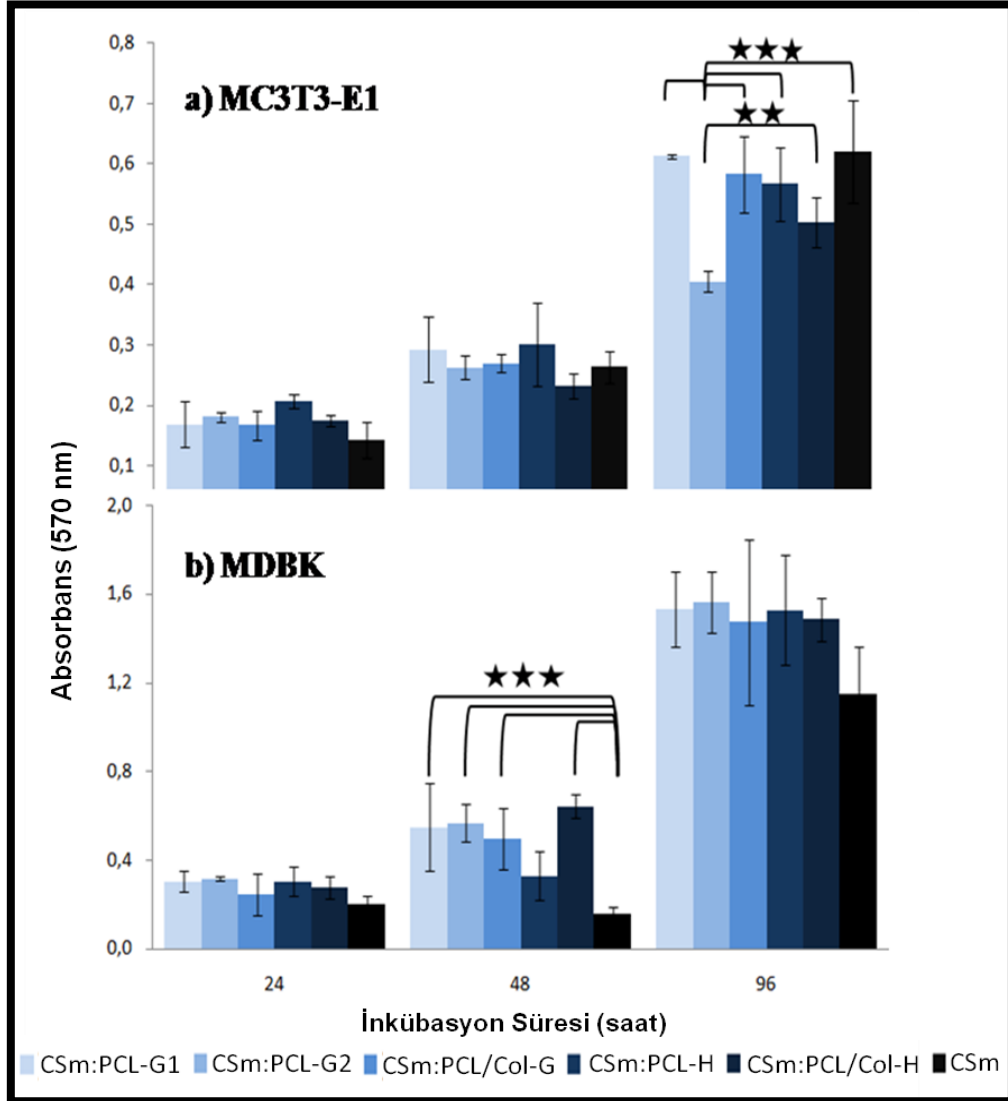
Fibroblastik morfolojiye sahip MC3T3-E1 ve epitel morfolojiye sahip MDBK hücrelerinin (Şekil 4. 20) desenlenmiş ve desenlenmemiş CS membranlara yapışmasının ve üremesinin incelendiği çalışmalar 96 saatlik kültür boyunca Bölüm 3.1.7.2'de açıklanan yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MTT deneylerinden elde edilen sonuçlar Şekil 4. 21'de verilmiştir. 24 saatlik kültür sonunda MC3T3-E1 hücrelerinin tamamının tüm membran yüzeylere yapıştığı görülmüştür. Şekil 4. 21 a incelendiğinde desenlenmiş tüm membranların MC3T3-E1 hücre üremesini desteklediği, 96 saat sonunda minimum mitokondriyal aktivitenin ise CSm:PCL-G2 yüzeylerde gerçekleştiği görülmektedir.



Şekil 4. 20. Kristal viyole ile boyanmış MC3T3-E1 ve MDBK hücrelerinin i-mikroskop görüntüleri (40X)

MDBK hücre kültüründe de tüm membranların kültür süresi boyunca hücre üremesini desteklediği görülmüştür (Şekil 4. 21 b). MDBK hücrelerinin üreme hızı (ikilenme süresi: 22 saat) MC3T3-E1 hücrelerine (ikilenme süresi: 36 saat) göre daha yüksek olduğundan, MTT deneylerinde MDBK hücreleri için elde edilen absorbans değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. MDBK hücrelerinin 48 saatlik kültürü sonunda en düşük mitokondriyal aktivitenin desenlenmemiş CS membranlar üzerinde gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. SEM çalışmalarından elde edilen sonuçlara paralel olarak, CSm:PCL-G2 membranlar üzerindeki mitondriyal aktivitenin CS membranlardaki aktiviteye oranla daha yüksek olması, MDBK hücrelerinin ilk 48 saat içinde nanotopografiden etkilendiğini göstermektedir. Bununla birlikte, 96 saatlik kültür sonunda hücre üremesinin membranlara göre farklılık göstermediği sonucuna varılmıştır.

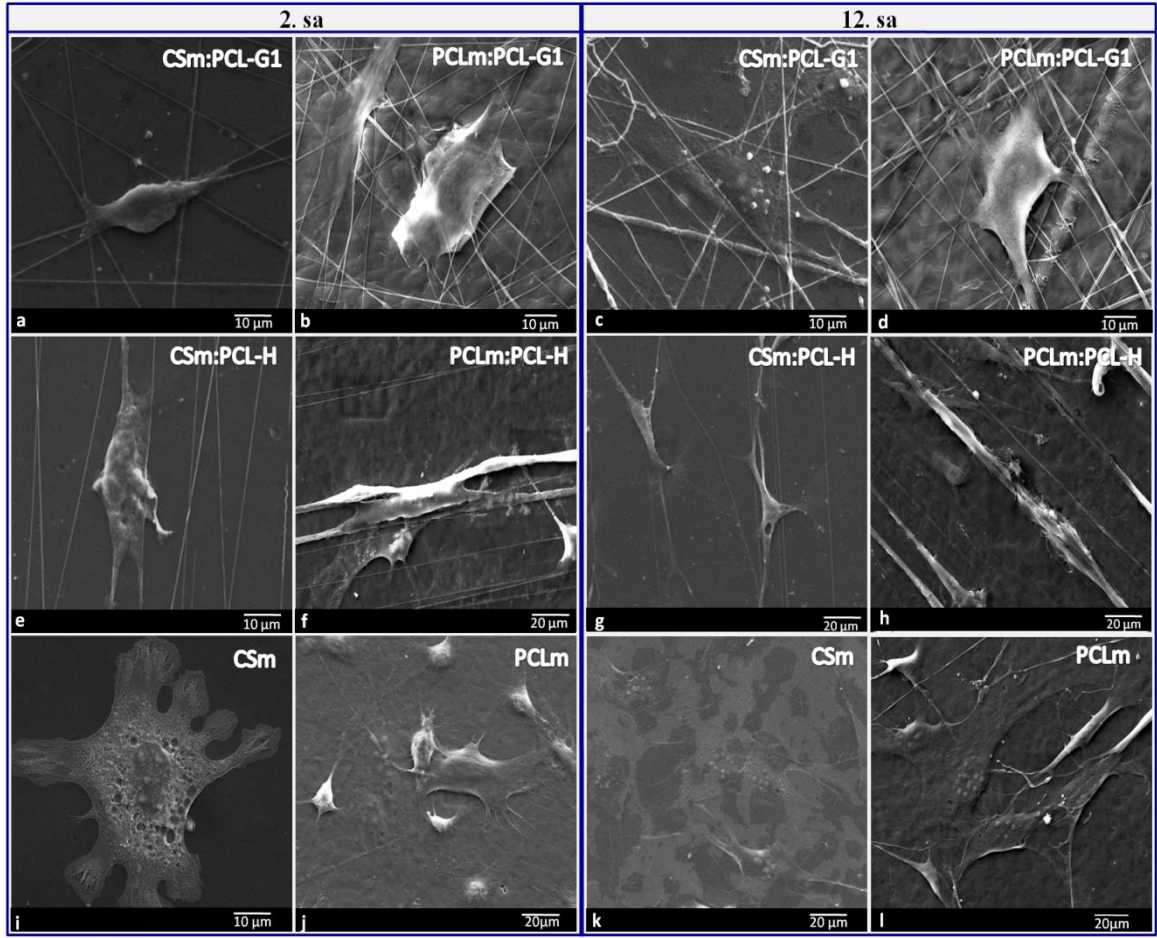
MTT çalışmalarından elde edilen veriler ışığında, desenlenmiş fiberlerin varlığı çoğalma davranışından öte hücresel morfolojiyi etkileyen, hücre kültürü sürecinin başlangıcında (yapışma süresi 12 saate kadar) etkili olmuştur. Bu bakımdan 12 saatlik hücre kültür çalışmalarının sonuçları iki bakış açısıyla değerlendirilmiştir: 1. Membran kimyasının (CS veya PCL) etkisi ve 2. CS membrandaki farklı desen özelliklerinin (fiberlerin kimyasal bileşimi ve çapları) etkisi.



Şekil 4. 21. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS membranlardaki a) MC3T3-E1 ve b) MDBK hücrelerinin 24., 48., ve 96. saatte MTT ile değerlendirilen mitokondriyal aktiviteleri (★★★p<0.001, **p<0.01)

4.1.3.1. Membran kimyasının etkisi

Membran kimyasının etkisini incelemek için, MC3T3-E1 ve MDBK hücrelerinin morfolojileri elektroeğrilmüş PCL nanofiberlerle desenlenen CS ve PCL membranlarda gözlemlenmiştir (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23).



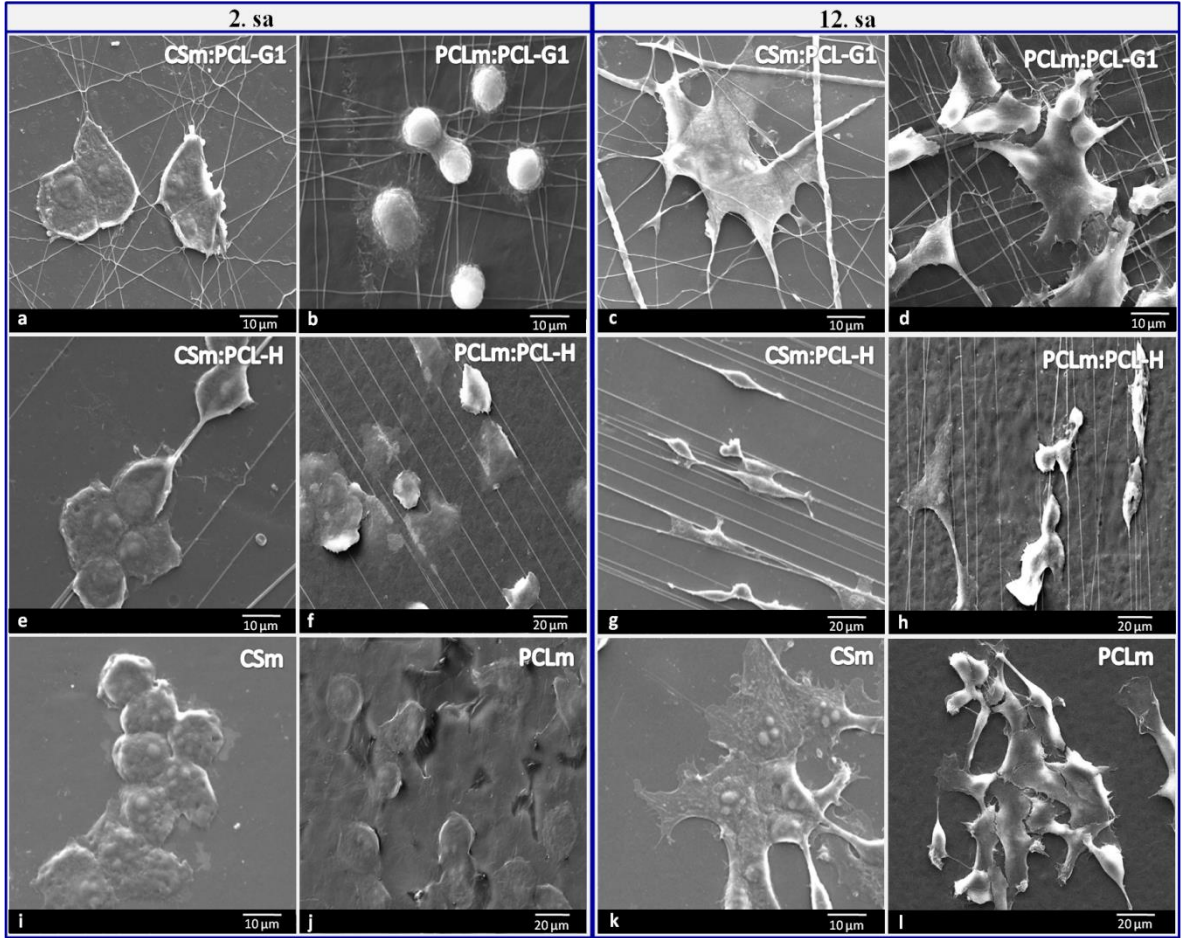
Şekil 4. 22. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS ve PCL membranlardaki MC3T3-E1 hücrelerinin 2 (a, b, e, f, i ve j) ve 12 (c, d, g, h, k ve l) saatlik hücre kültüründeki SEM görüntüleri. (a ve c) CSm:PCL-G1, (b ve d) PCLm:PCL-G1, (e ve g) CSm:PCL-H, (f ve h) PCLm:PCL-H, (i ve k) CS membran ve (j ve l) PCL membran yüzeylerindeki hücreler

PCL-G1 ile gelişigüzel desenlenmiş CS ve PCL membranlardaki MC3T3-E1 hücreleri 12 saatlik kültür sürecinde karşılaştırılmışlardır. Hücreler desenlenmiş CS membranlara kültüre edildiklerinde, 2 saatin sonunda PCL-G1 fiberlerle temasa geçme eğilimi sergilemişlerdir (Şekil 4.22 a). Öte yandan hücreler PCL membranlara desenlenmiş PCL-G1 fiberleri tanımamış ve fiberlerle özel bir etkileşim sergilememişlerdir (Şekil 4.22 b). Kültür süresi 12 saate çıktığında, CSm:PCL-G1 yüzeylerdeki MC3T3-E1 hücrelerinin yayılırken fiberlerle temasını kaybederek düzlemsel bir yapıda tüm CS membran üzerinde yayıldıkları görülmüştür (Şekil 4.22 c). Benzer davranış desenlenmiş PCL yüzeylerde de gözlenmiştir (Şekil 4.22 d). Hücreler yayılmaya başladıklarında topografi etkili olmamış, fakat desenlenmiş CS membranlarda, desenlenmiş PCL

membranlardaki hücrelere göre daha geniş yayılma alanı sergilemişlerdir. Desen yönelimi hizalanmış topografiye dönüştüğünde, hücre yönelimine fiberlerin etkisi desenlenmiş hem CS hem de PCL membranlarda çok daha ayırtedilebilir olmuştur (Şekil 4.22 e-h). MC3T3-E1 hücreleri alttaki membran kimyasına bakmaksızın fiber topografisine özel ilgi göstermiş, hücre kültürünün başlangıcından itibaren fiber yönelimini takip etme eğiliminde olmuşlardır (Şekil 4.22 e ve f)). Kültür süresi 12 saate çıktığında fiberlerdeki hizalanmış yönelim her iki desenlenmiş membrandaki hücre morfolojisini kontrol etmeyi sürdürmüştür. Hücreler farklı kimyasal yapıdaki membranları önemsemeksizin fiberler üzerinde kalmayı seçerek fiber yönünü takip etmişlerdir (Şekil 4.22 g ve h). Nanodesenlerin fiziksel yapısının değiştiği, hizalanmış düzendeki fiberler ile desenlenmiş membranlarda, MC3T3-E1 hücrelerinin çubuk benzeri bir morfolojiye sahip oldukları görülmüştür. Yüzeğe tutunan ve yayılan hücrelerin, hizalanmış fiberleri takip etmeleri sonucu uzadıkları ve morfolojideki bu değişime bağlı olarak yüzeğe yayılan hücre alanının azaldığı gözlemlenmiştir. Desenlenmemiş membranlardaki hücreler kendi orijinal morfolojilerini sürdürerek düzenli olmayan bir biçimde membran yüzeylerine yapışmış ve yayılmışlardır (Şekil 4.22 i-l).

Epitel morfolojideki MDBK hücreleri, 2 saatlik kültür sürecinde, CS membranlara desenlenmiş fiberlere MC3T3-E1 hücrelerine göre daha tepkisiz kalmışlardır. CSm:PCL-G1 yüzeylerde hücre-fiber temasının olmadığı ve buna bağlı olarak hücre morfolojilerinin değişmediği görülmüştür (Şekil 4.23 a). Diğer taraftan membran PCL olduğunda hücreler PCL fiberlere yapışmayı tercih etmişlerdir (Şekil 4.23 b). Topografinin tanınması desenlenmiş PCL membranlarda daha belirgin olmuştur. Bununla birlikte, 12 saatlik kültür sonunda, hücrelerin kare benzeri köşeli epitel morfolojilerinin CSm:PCL-G1 üzerindeki nanofiberlerden etkilendiği, yayılmakta olan hücre morfolojisinin nanofiber oryantasyonu yönünde değiştiği görülmüştür (Şekil 4.23 c). Topografi hücre yayılmasını yönlendirmede etkili olmuştur. Desenlenmiş PCL membranlara kültüre edilen hücreler 12 saatin sonunda PCL-G1 desenlere olan eğilimini kaybetmişlerdir (Şekil 4.23 d). Gelişigüzel düzende desenlenmiş PCL membranlara, fiberlerle temas işareti göstermeksizin yayılmaya çalışmışlardır. Hizalanmış düzende desenlenmiş CS ve PCL membranlardaki MDBK hücreleri kültürün başlangıcında fiberlerin varlığına ilgi göstermişlerdir. Şekil 4.23 (e ve f) incelendiğinde, MDBK hücrelerinin

hizalanmış düzendeki PCL nanodesenlere olan ilgisi açıkça görülmektedir. Hücreler, kültür başlangıcında kare benzeri köşeli yapılarını korumakla birlikte, yayılmaya başladıklarında yalnızca fiberler doğrultusunda hareket ederek orijinal morfolojilerini tamamen değiştirmişlerdir (Şekil 4.23 g ve h). Membran kimyasının farklılığı hücresel davranış için önemli olmamıştır. Desenlenmemiş CS ve PCL membranlardaki tipik epitel morfoloji Şekil 4.22 (i ve j)'de gösterilmiştir. Kültür süresi 12 saate çıktığında hücreler membranlara düzlemsel biçimde yayılmışlardır (Şekil 4.23 k ve l) .



Şekil 4. 23. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS ve PCL membranlardaki MDBK hücrelerinin 2 (a, b, e, f, i ve j) ve 12 (c, d, g, h, k ve l) saatlik hücre kültüründeki SEM görüntüleri. (a ve c) CSm:PCL-G1, (b ve d) PCLm:PCL-G1, (e ve g) CSm:PCL-H, (f ve h) PCLm:PCL-H, (i ve k) CS membran ve (j ve l) PCL membran yüzeylerindeki hücreler

Hücre kültür çalışmaları membran kimyasının hücresel etkileşimleri sınırlı ölçüde etkilediğini ortaya çıkarmıştır. Her iki desenlenmiş membranda gözlenen morfoloji

değişiminde ana etken fiber yönelimi olmuştur. PCL nanofiberlerin hizalanmış topografisi hem CS hem de PCL membralarda hücrelerin morfolojilerini kontrol etmiştir. Hücre kültürünün başlangıcında gelişigüzel yönelmiş desenlerdeki fibroblastik ve epitel hücrelerin hücre tutunma davranışlarındaki zıtlık hücre morfolojisinin önemini desteklemektedir. Öte yandan her iki hücre hattı, kültür süresi arttığında PCL membranlara desenlenmiş PCL nanofiberlere olan ilgilerini kaybetmişlerdir. Yüzeyine tutundukları membranla aynı kimyasal niteliklere sahip desenlerin hücre morfolojisinin kontrolünde etkili olmadığı görülmüştür.

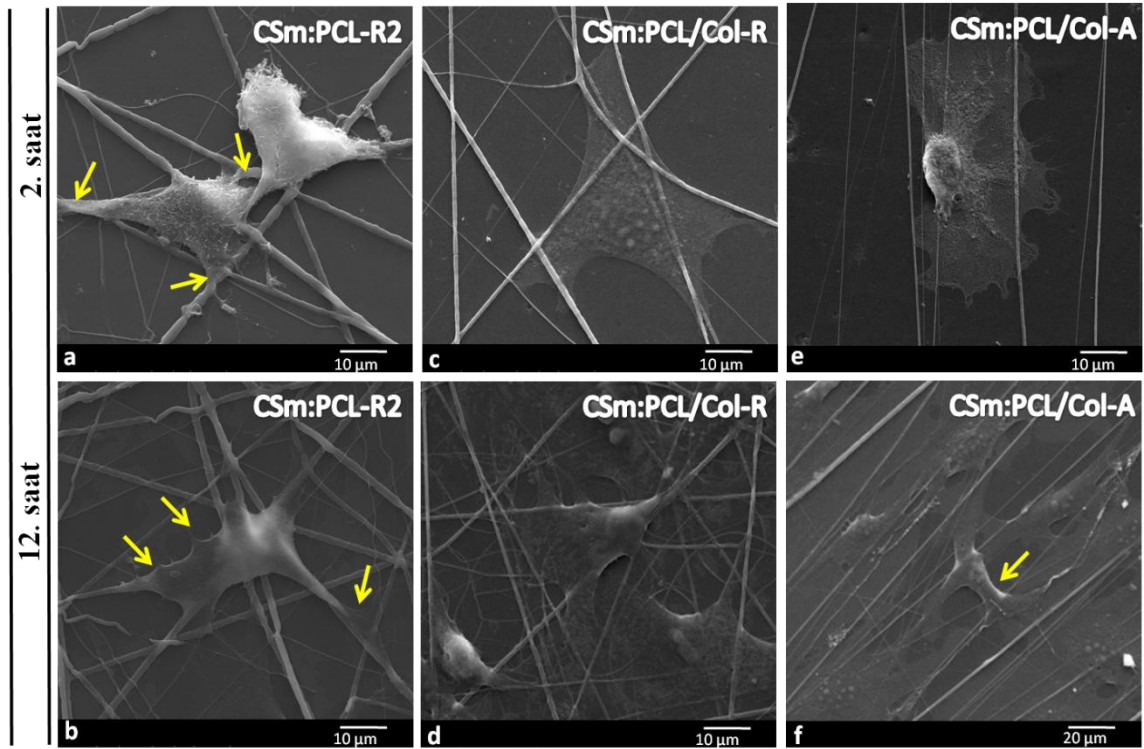
4.1.3.2. Kitosan membrandaki farklı desen özelliklerinin etkisi

MC3T3-E1 ve MDBK hücrelerinin hücresel davranışlarını incelemek için farklı çaplardaki ve farklı kimyasal bileşimdeki nanofiberler CS membranlara desenlenmişlerdir. Bu yüzeylerdeki hücre kültür çalışmalarının sonuçları aşağıda tartışılmıştır.

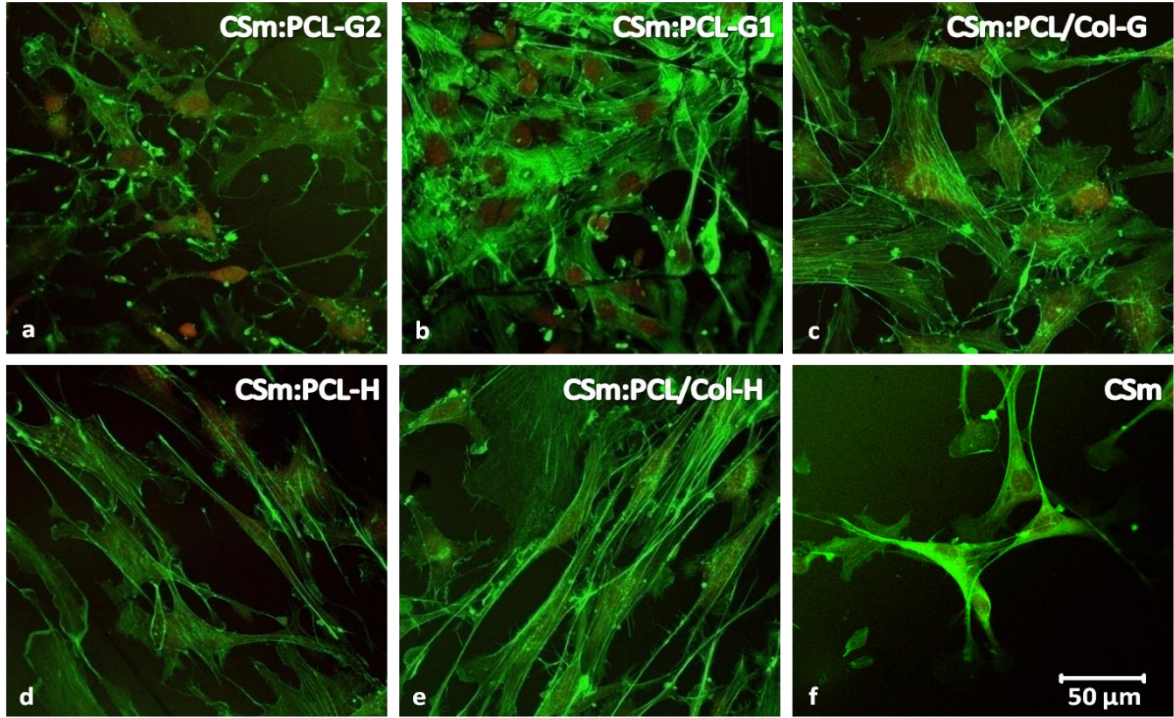
i. MC3T3-E1 hücre kültürü

Şekil 4.24 PCL-G2 ve PCL/Col nanofiberlerle desenlenen CS membralarda 2 saat ve 12 saat'lik sürede kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntülerini göstermektedir. Şekil 4.24 a'da görülebileceği gibi yapışma sürecinin başında (2 sa), CSm:PCL-G2'deki (PCL-G1'e göre daha kalın fiberlerin (550 nm) bulunduğu yüzey) hücreler CS membrandaki desenler boyunca *lamellipodia* uzantılarını kullanarak fiberlere yapışma eğilimi sergilemişlerdir. Kültür süresi 12 saate ulaştığında, hücrelerin nanofiberlere tutunarak membran üzerinde yayılmaya devam ettiği, çok köşeli şekil sergiledikleri ve CS membran yüzeyine doğru *filopodia* uzantılarının olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.24 b). Gelişigüzel desenlerin çapları azaltıldığında (CSm:PCL-G1, 205 nm) hücre kültürünün başlangıcında hücreler fiberlere yapışma eğilimini sürdürmeye devam etmektedirler (Şekil 4.22 a). Bununla birlikte ilerleyen kültür süresince hücrelerin fiberlere olan ilgisi azalmış ve düz bir yapıda tüm CS membran üzerinde yayıldıkları görülmüştür (Şekil 4.22 c). Kimyasal yapının değişmemesine karşın, fiber çapının 550 nm'den 205 nm değerine düşmesi sonucu, CSm:PCL-G1 yüzeylerde, nanodesen varlığında hücre yönelmesinin daha az olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.22 c ve Şekil 4.24 b). PCL fiber yapısına kollajen eklenmesiyle birlikte, CSm:PCL/Col-G yüzeylerde, yüzeye yayılan hücrenin alanının gerilmiş morfoloji ile birlikte arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.24 c ve d). SEM görüntülerinden elde edilen sonuçlar

PCL/Col-G nanofiberler ile gelişigüzel desenlenmiş membranlarda hücre yayılmasının her yöne doğru gerçekleşebileceğini ve bu yüzeylerde nanofiberlerin hücre organizasyonu ve morfolojisi üzerinde etkili olmadığını göstermiştir. Bu sonucun kitosanın ve kollajenin arasındaki kimyasal yapı benzerliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2). Desenlerin fiziksel yapısı gelişigüzel düzenden hizalanmış düzene geçince, hizalanmış desenlere sahip CSm:PCL/Col-H yüzeylerde, gelişigüzel düzendeki desenlere göre hücre morfolojisi ve organizasyonunda nanodesenlerin topografik etkisinin daha fazla olduğunu söylemek mümkündür (Şekil 4.24 e ve f)). Hücrelerin yüzey alanları fiberler boyunca uzadıklarından azalmıştır. Hücreler fiberler üzerinde başlangıçta yapışma göstermesine rağmen, CS membran ile de etkileşerek fiber yöneliminde yayılmışlardır. CS membran üzerinde fiberleri takip eden uzamış hücreler arasında hücre bağlantıları (köprüleri) gözlenmiştir (Şekil 4.24 f).



Şekil 4. 24. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS membrandaki MC3T3-E1 hücrelerinin hücre kültürünün 2. ve 12. saatindeki SEM görüntüleri. (a ve b) CSm:PCL-G2'deki hücreler (oklar *lamelliapodia* ve uzamış *filopodia*'yı göstermektedir); (c ve d) CSm:PCL/Col-G'deki hücreler; (e ve f) CSm:PCL/Col-H'deki hücreler (oklar iki hücre arasındaki köprüyü göstermektedir)



Şekil 4. 25. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS membrandaki MC3T3-E1 hücrelerinin 12. saatteki konfokal mikroskobu görüntüleri. a) CSm:PCL-G2, b) CSm:PCL-G1, c) CSm:PCL/Col-G, d) CSm:PCL-H, e) CSm:PCL/Col-H ve f) CSm yüzeylerdeki hücreler (20X, yeşil ve kırmızı floresanlar sırasıyla F-aktin filamentlerini ve hücre çekirdeğini göstermektedir)

MC3T3-E1 hücrelerinin iskeletsel filamentöz aktinleri konfokal mikroskobu ile incelenmiştir. Şekil 4.25 desenlenmiş ve desenlenmemiş CS membranlarda aktinleri (yeşil) ve çekirdekleri (kırmızı) boyanan 12 saatlik kültür sürecindeki MC3T3-E1 hücrelerinin iskeletini göstermektedir. Hücre çeperinde görülen noktasal boyalar fokal yapışmanın meydana geldiği noktalardır. Gelişigüzel desenlenmiş membranlardaki hücrelerde düzenli yapıya sahip aktin filament oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.25 a-c). Gelişigüzel desenlenmemiş membranlar arasında stres fiber oluşumu ve aktin filament aktivitesi en fazla CSm:PCL/Col-G üzerinde gözlenmiştir (Şekil 4.25 c). SEM çalışmalarında da gözlemlendiği gibi, yüzeye yayılan hücre alanı CSm:PCL/Col-G yüzeylerde artmıştır. Hizalanmış fiberler üzerindeki hücreler incelendiğinde, hücre şeklinin yanı sıra hücre iskeletinin organizasyonunun da nanodesenlerden önemli ölçüde etkilendiği görülmektedir. Aktin filament yapısında bulunan fiberlerin membran yüzeyinde bulunan nanofiberler yönünde hizalanarak sitoplazma içerisinde oldukça uzun ve düzenli organize yapıda aktin demetlerini oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.25 d

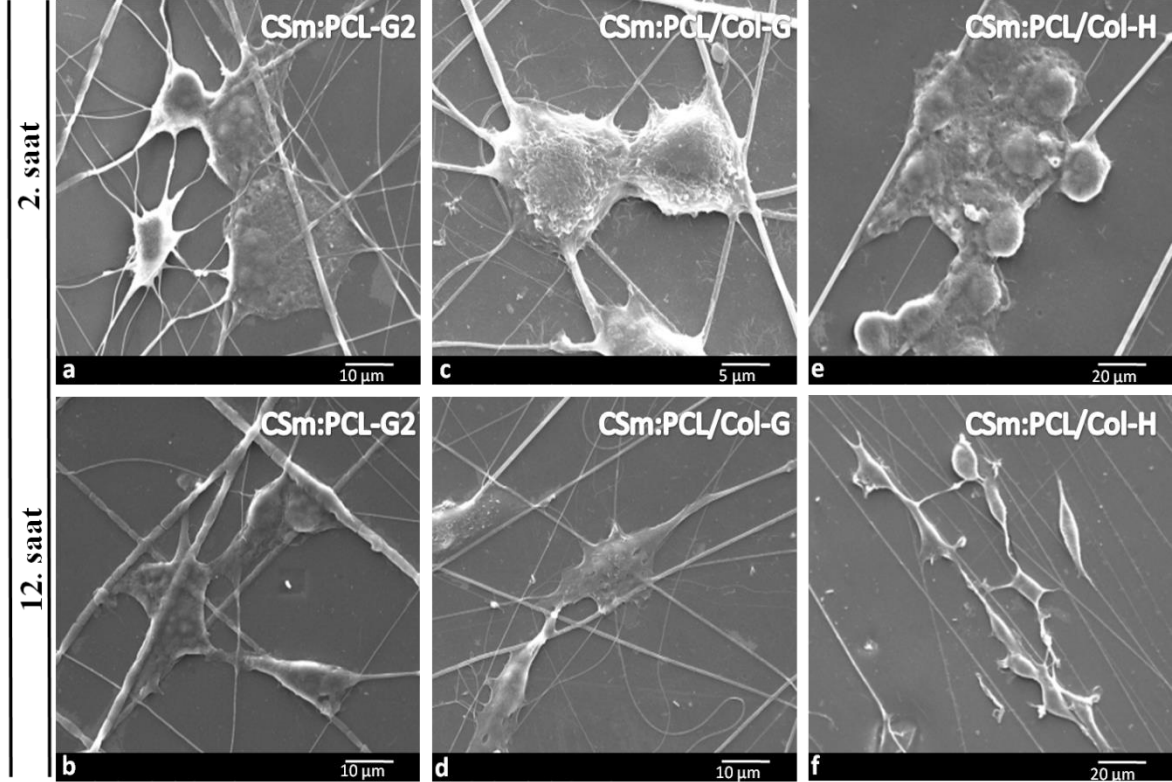
ve e). Sitoplazmadaki bu organizasyon, hizalanmış nanofiberlerin hücre yapısını kontrol ettiğini açıkça göstermektedir. Desenlenmemiş CS membrandaki hücreler yaklaşık olarak üçgen benzeri morfoloji sergilemişlerdir. Hücre içerisinde bulunan kısa zincirli aktin filamentlerin yapı içerisinde gelişigüzel dağıldığı gözlemlenmiş, uzun zincirli stres fiberlerinin oluşumuna rastlanmamıştır (Şekil 4.25 f).

ii. MDBK hücre kültürü

2 ve 12 saat kültüre edilen MDBK hücrelerinin CS membrandaki SEM görüntüleri Şekil 4.26'da verilmiştir. Hücrelerin CSm:PCL-G2 üzerindeki *lamellipodial* teması 2 saatlik hücre kültür sürecinde açıkça gözlenebilmiştir (Şekil 4.26 a). 12 saatlik kültür sonrasında fiberlerle temasını sürdüren hücreler, çok köşeli bir şekil sergileyerek morfolojilerini düzenleme eğiliminde olmuşlardır (Şekil 4.26 b). PCL fiberlerin çapı PCL-G1'e düştüğünde, hücrelerin yüzeye tutunma aşamasında daha ince fiber çapına sahip CSm:PCL-G1 membranlarda yüzeydeki nanofiberlerden etkilenmediği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.23 a). Kültür süresi arttığında çok köşeli morfoloji açıkça gözlenmiş ve yayılan hücreler fiber yönelimine bağlı olarak orijinal morfolojilerini değiştirerek temaslarını arttırmışlardır (Fig 4.23 c). Fiber yapıda kollajenin varlığında (PCL/Col-G), MDBK hücreleri yüzeye (CSm:PCL/Col-G) tutunma aşamasında gelişigüzel desenlenmiş fiberleri tercih etmiş (Şekil 4.26 c) ve fiber yönelimini takip ederek yayılmayı sürdürmüşlerdir (Şekil 4.26 d). CSm:PCL/Col-G yüzeylerde MDBK hücreleri ile MC3T3-E1 hücreleri kıyaslandığında, MDBK hücrelerinin nanofiberlere olan ilgisinin daha fazla olduğu ve morfolojilerinin nanofiberler ile olan temaslarından daha çok etkilendiği sonucuna varılmıştır.

Şekil 4.23 e incelendiğinde, MDBK hücrelerinin hizalanmış düzendeki nanodesenlere olan ilgisi açıkça görülmektedir. Hücreler, kültür başlangıcında kare benzeri köşeli yapılarını korumakla birlikte yayılmaya başladıklarında yalnızca nanofiberler doğrultusunda hareket ederek orijinal morfolojilerini tamamen değiştirmişlerdir (Şekil 4.23 g). Hücrelerin bu davranışı yapıya kollajen eklendiğinde de CSm:PCL/Col-H üzerinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.26 e ve f). Şekil 4.23 e'de ve Şekil 4.26 e'de görüldüğü gibi CSm:PCL-H ve CSm:PCL/Col-H yüzeylerde hücrelerin CS membran ile teması olmasına karşın, ilerleyen kültür sürecinde nanofiberler doğrultusunda organize olarak kare benzeri orijinal epitel morfolojilerinden çok farklı olarak, çubuk benzeri morfolojiye sahip oldukları

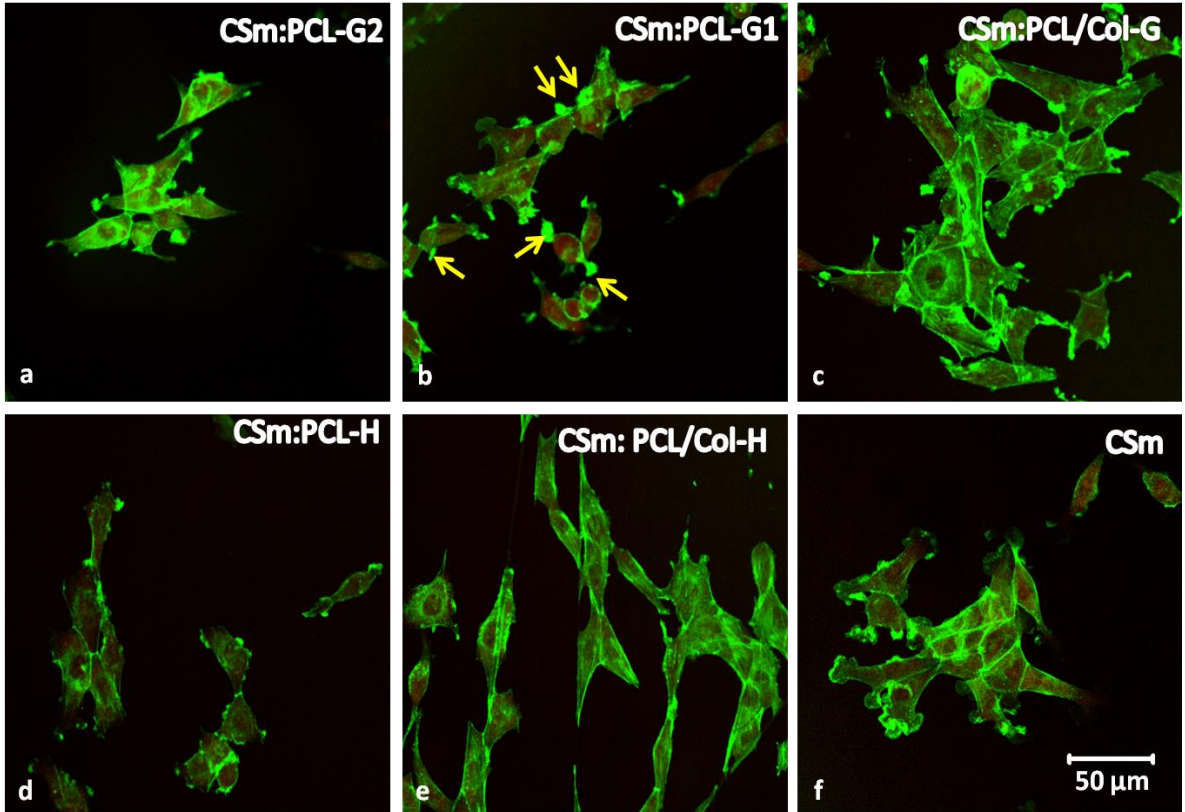
görülmüştür (Şekil 4.23 g ve Şekil 4.26 f). Desenlenmemiş CS membranlar üzerindeki hücreler incelendiğinde, yüzeye tutunan hücrelerin orijinal morfolojilerini korudukları ve yalancı ayak uzantıları ile yüzeye tutundukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.23 i ve k). MDBK hücrelerinin morfolojisindeki değişim hizalanmış yapıda desenlenmiş membran yüzeylerde çok net olarak görülmekle birlikte, gelişigüzel düzendeki desenli membranlarda, nanofiberler üzerindeki *lamellipodia* etkileşiminin arttığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4. 26. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS membrandaki MDBK hücrelerinin hücre kültürünün 2. ve 12. saatindeki SEM görüntüleri. (a ve b) CSm:PCL-G2'deki; (c ve d) CSm:PCL/Col-G'deki; (e ve f) CSm:PCL/Col-H'deki hücreler

Şekil 4.27, desenlenmiş ve desenlenmemiş CS membranlara 12 saat boyunca kültüre edilen MDBK hücrelerinin aktin stres fiberlerinin konfokal mikroskobu fotoğraflarını göstermektedir. CSm:PCL-G2'deki hücrelerle karşılaştırıldığında, CSm:PCL-G1'de tutunan hücrelerde noktasal aktinlerin daha yoğun olduğu görülmektedir (Şekil 4.27 a ve b). Bu sonuç, SEM görüntülerine paralel olarak 12 saat sonunda hücrelerin daha ince fiber çapına sahip PCL nanofiberler üzerindeki fokal yapışma noktalarının arttığını göstermektedir. Fiber çapı incelendiğinde hücrelerin nanofiberler ile temas etmek için uzantılarını arttırmasının, fokal

yapışma noktalarının artması ile sonuçlandığını söylemek mümkündür. Aktin boyamanın şiddetine bağlı olarak CSm:PCL-G1 yüzeylerde, hücreyi çevreleyen kortikal aktinin daha fazla boyandığı, buna karşın CSm:PCL-G2 yüzeylerde hücredeki iskeletsel aktin oluşumunun daha baskın olduğu gözlenmiştir. Gelişigüzel düzende desenlenmiş membranlar arasında hücre içindeki stres fiber oluşumu, yayılan hücrenin alanı ve aktin filament aktivitesi en yoğun CSm:PCL/Col-G yüzeylerde gözlenmiştir (Şekil 4.27 c). Hizalanmış düzende desenlenmiş membranlar üzerinde bulunan MDBK hücrelerinin morfolojilerindeki değişim, SEM çalışmalarından elde edilen sonuçlara paralel olarak konfokal görüntülerinde de net olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.27 d ve e). Şekil 4.27 e’de görülebildiği gibi, F-aktin sentezi ve stres fiber oluşumu fiber yapıda kollajenin varlığında artmıştır. Desenlenmemiş CS membranlardaki MDBK hücreleri organize olmayan biçimde aktin filamentleri sergilemişlerdir (Şekil 4.27 f).



Şekil 4. 27. Desenlenmiş ve desenlenmemiş CS membranındaki MDBK hücrelerinin 12. saatteki konfokal mikroskobu görüntüleri. a) CSm:PCL-G2, b) CSm:PCL-G1 (oklar aktin noktalarını göstermektedir), c) CSm:PCL/Col-G, d) CSm:PCL-H, e) CSm:PCL/Col-H ve f) CSm yüzeylerdeki hücreler (20X, yeşil ve kırmızı floresanlar sırasıyla F-aktin filamentlerini ve hücre çekirdeğini göstermektedir)

Literatürde yapılan çalışmalarda fibröz örgülerin topografilerinin hücrel davranışı etkilediği gösterilmiştir [78, 203]. Bu çalışmalardan ayrı olarak, Tian ve ark. [204] hücreye dirençli PVA substratlara desenlenmiş hizalanmış düzendeki poli(laktid-ko-glikolid)/kollajen mikrofiberler ve nanofiberler üzerinde, NIH3T3 hücrelerinin yapışmasını ve morfolojisini incelemiştir. Bu tez çalışmasında, fibröz örgü yerine, PCL nanofiberler farklı kimyasal yapıya sahip membranlar üzerine desenlenmiş biçimdedir. PCL, CS'ye göre daha az biyouyumlu olmasına karşın, CS membranlar üzerinde nanofiber formunda bulunduğu, hücre organizasyonu üzerinde etkili olmaktadır. Altındaki membranın ne hücreye ne de proteine karşı dirençli olmaması başlangıçtaki protein adsorbsiyonunu ve sonraki hücrel davranış farklılığını etkileyeceğinden, 2. saatlik periyotta MC3T3-E1 ve MDBK hücreleri daha ince PCL fiberlere (205 nm) sahip CS membranlar üzerinde bütünüyle farklı karakteristikler sergilemişlerdir. Fiber çapının artmasına (550 nm) bağlı olarak yapışma noktalarının artması, ilerleyen kültür sürecinde her iki hücre türünün de desenlere olan ilgisini arttırmıştır. Fibröz örgüdeki fiberlerle kaçınılmaz olarak etkileşen hücrelerin davranışlarına yönelik çalışmalarda belirtilen bir diğer önemli parametre ise fiber yönelimidir [205, 206]. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, fiberler membran yüzeyine desenlendiğinde hücrel morfolojinin fiber yöneliminden güçlü bir şekilde etkilendiğini göstermiştir. Morfolojideki değişim, MDBK hücrelerinin orijinal dört köşeli şekillerini bütünüyle kaybettikleri ve MC3T3-E1 hücrelerinin fibroblastik morfolojilerinin çubuk benzeri yapıya dönüştüğü hizalanmış düzende desenlenmiş membranlarda daha belirgin olmuştur. CS membran yüzeyi fiberlerle desenlendiğinde, hücreler morfolojilerini fiber yönünde düzenleme eğiliminde olmuşlardır. Bu eğilim hücre iskeletinde farklı bir gerilim ortaya çıkarmış ve stoplazmada üretilen aktin filamentler uygulanan gerilim yönünde organize olmuşlardır. Hücrelerin gelişigüzel yönlendirilmiş fiberlerde farklı yönlerdeki temasları hücre yayılma alanında artışa neden olmuş ve aktin filamentler gelişigüzel desenlerin yönelimlerini takip etmişlerdir. Fakat hizalanmış fiberlerdeki hücrelerin teması ve yayılması hücre alanında azalmaya neden olmuş ve aktin filament demetleri hizalanmış gerilim yönünde düzenlenmişlerdir. Bununla birlikte, desenlenmemiş CS ve PCL membranlarda yapışan hücreleri etkileyen stres yoktur. Bu yüzden aktin filamentleri hücre iskeleti içerisinde dağılmışlardır. Sunulan tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, hücre morfolojisinin nanotopografiye olan cevabını açıkça ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada hücre davranışlarını etkileme amacıyla, PCL elektroçirime çözeltisine kollajen eklenerek fiber kimyasının etkisi de araştırılmıştır. Kollajen ECM'nin doğal bileşidir ve Tip I ve Tip IV kollajenin hücre yapışmasını ve yayılmasını artırmada etkili olduğu bilinmektedir [70]. Kollajen daha biyouyumlu iskeleler elde etmek için çok sayıda polimer ile birleştirilmektedir [207]. Bu tez çalışmasında, kullanılan her iki hücre hattı da fiberlerin kimyasal bileşimindeki değişimden, morfoloji, yayılma ve F-aktin sentezi bakımından etkilenmişlerdir. CSm:PCL/Col-G'deki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri, hücre yayılmasının her yönde olabileceğini, bu bakımdan hücre yönelmesinin bu yüzeylerde belirgin bir şekilde gerçekleşmediğini göstermektedir. Bu sonuç kollajenin ve kitosanın kimyasal yapısındaki benzerliklerine bağlanabilir. Kimyasal yapısı değişmiş fiberlerin yöneliminin etkisinde, topografik belirtiler CSm:PCL/Col-G ile karşılaştırıldığında CSm:PCL/Col-H'da daha yoğun olmuştur. Hizalanmış fiberler arasında hücre köprüleri yine görülmüştür. Fiber kimyası, üzerinde tutunduğu membran ile benzer olduğunda, fibroblastların membranla temasında bir artış ortaya çıkmıştır. MDBK hücreleri de kollajenin varlığından etkilenmişlerdir ve CSm:PCL/Col-G'deki MDBK hücrelerinin yönelmesi MC3T3-E1 hücreleri ile kıyaslandığında daha seçilir olmuştur.

Mikro ve nano ölçekteki yüzey topografisinin, boyut, fiziksel yapı ve oryantasyona bağlı olarak hücre davranışını etkilediği bilinmektedir. Bu etki hücre tipine bağlı olarak da değişiklik gösterebilmektedir. Yüzey üzerinde girintilerden oluşan nanotopografik detaylar, fibroblast hücrelerinin hücre-yüzey etkileşimine engel olurken, doğrusal düzendeki oluşumlar fibroblast hücreleri için temas noktaları oluşturmuş ve hücrelerin yüzey üzerinde hizalanmış olan desenleri takip ederek yayıldıkları görülmüştür. Teixeira ve grubu [208] tarafından yapılan bir çalışmada epitel hücrelerin nano boyuttaki oluklar boyunca hizalandığı fakat fokal yapışma noktalarının ve aktin filamentlerin oluklara paralel olmadığı gözlenmiştir. Nano topografiye sahip PCL membran yüzeylerde L929 fibroblast ve MDBK epitel hücrelerin davranışlarının incelendiği bir diğer çalışmada, L929 fibroblastların pürüzlü yüzeyleri tercih ettiği görülürken, MDBK hücrelerin nano topografiden etkilenmediği görülmüştür [209].

Literatürde nano ölçekte detaylara ve topografiye sahip yüzeylerin elde edilmesine yönelik olarak kullanılan birçok teknik bulunmaktadır. Yürütülmüş olan bu tez

çalışması kapsamında CS ve PCL membranların desenlenmesinde nano ölçekte topografiye sahip yapıların elde edilmesinde de uygulanan elektroçirme tekniğı kullanılmıştır. Bu teknik ile gelişigüzel ve hizalanmış düzende üretilebilen nanofiberler ile hücrenel davranışların kontrolünü sağlamada olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Patel ve grubu [210] tarafından yürütölen bir çalışmada, nanotopografik desenlerin hücre göçü üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğı ve nöronlardaki uzamanın hizalanmış nanofiberler üzerinde, gelişigüzel yerleştirilmiş olanlara kıyasla daha fazla olduğı bulunmuştur. Feng ve grubu [129] tarafından yapılan bir diğör çalışmada ise, hizalanmış nanofiberler üzerindeki hepatosit hücre agregatlarının hücre aktivitesinin, gelişigüzel düzende nanofiberlere kıyasla arttığı görölmüştür.

Yürütölmüş olan tez çalışmasında, elektroçirme tekniğı ile CS ve PCL membranlar üzerinde farklı yönelime ve kimyasal yapıya sahip nanofiberler elde etmek mümkün olmuştur. Bu teknikte, fotolitografide olduğı gibi yüzeyi bozabilecek kimyasallar kullanılmadığından, nanodesenleme çalışmaları için önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Hücrenel davranışların incelenmesine yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmalara ait sonuçlar Çizelge 4.3'de özetlenmiştir.

Çizelge 4. 4. Desenlenmiş yüzeylerdeki hücrenel cevapların hücrenel morfoloji ile karşılaştırılması

	MC3T3-E1	MDBK
Topografiye hücrenel cevap	+	+
Gelişigüzel düzende desenlerde hücrelerin yüzey alanında artış	+	+
Hizalanmış düzende desenlerde hücrelerin yüzey alanında artış	-	-
Hücre yayılmasında membran kimyasının etkisi	+	+ (kısmen)
PCL membrandaki gelişigüzel düzende PCL fiberler üzerinde hücre yönelimi	-	-
PCL membrandaki hizalanmış düzende PCL fiberler üzerinde hücre yönelimi	+	+
CS membrandaki gelişigüzel düzende PCL fiberler üzerinde hücre yönelimi	-	+
CS membrandaki hizalanmış düzende PCL fiberler üzerinde hücre yönelimi	+	+

4.2. PEO Fiberler ile Yürütülen Çalışmalar

Titanyum implant yüzeylerin kaplanması amacı ile kullanılacak, istenilen çap dağılımına ve morfolojisine sahip polietilen oksit (PEO) nanofiberlerin üretimi elektroğirme yöntemiyle gerçekleştirilmiş ve en uygun koşulların belirlenmesi amacıyla optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. PEO nanofiberlere ait karakterizasyon çalışmaları i-mikroskop, SEM, AFM ve FTIR-ATR ile gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. PEO Nanofiberlerin Üretimi ve Karakterizasyonu

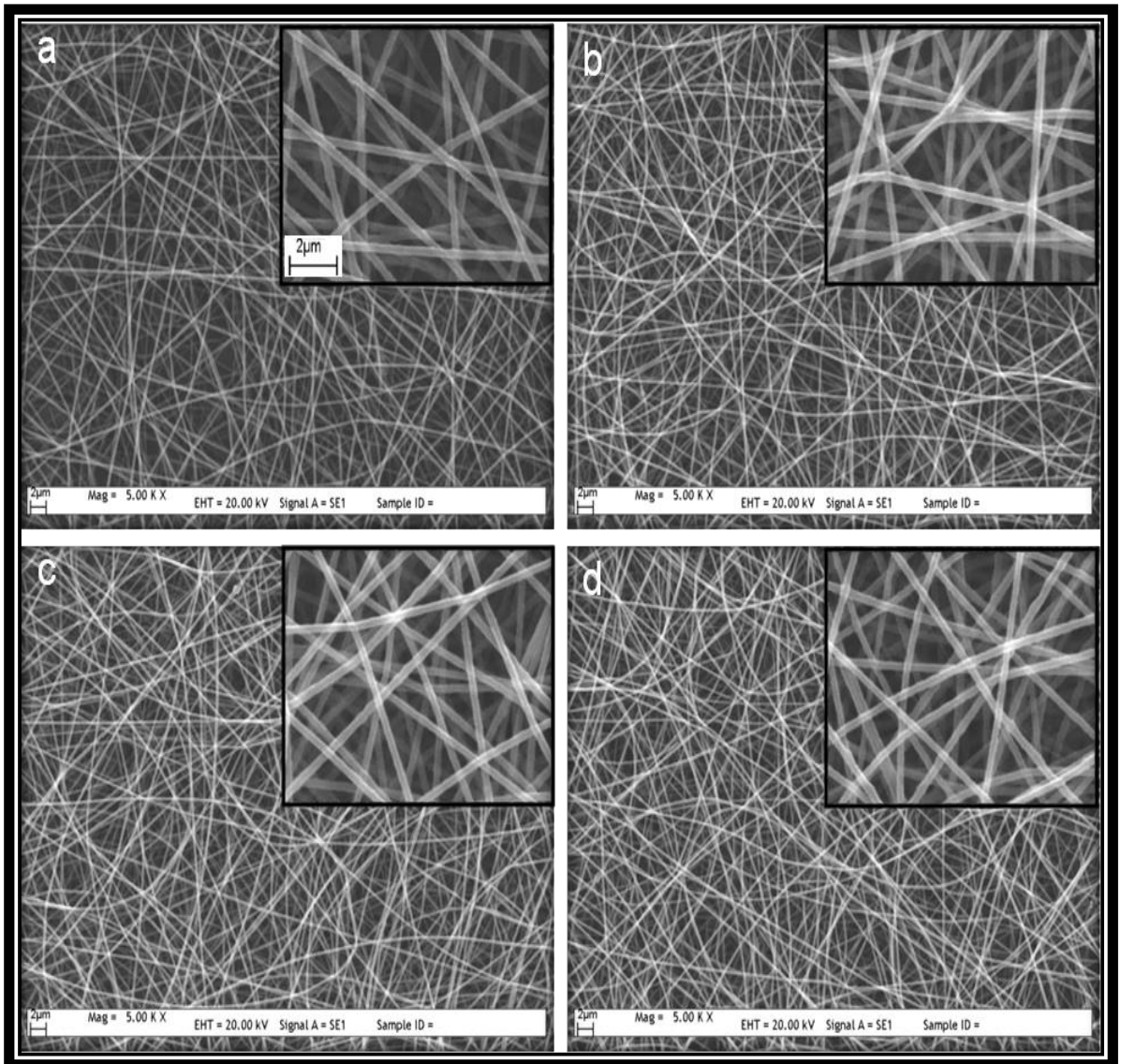
PEO'nun hidrofilik yapısı su ile rahatlıkla çözülebilmelerini sağlamaktadır. Elektroğirme işleminde, istenilen özellikteki fiberlerin üretilebilmesinde, kullanılan çözücünün türü ve dielektrik katsayısı gibi etkenler önem arz etmektedir (bak. Bölüm 2.1.3.9). Temelde bir çözücü elektroğirme işleminde çok önemli iki rolü üstlenir: Birincisi, elektrik yüklü jeti oluşturmak için polimer moleküllerini çözmek; ikincisi, çözülmüş polimer moleküllerini toplayıcıya ulaştırmaktır [211]. Teknik olarak dielektrik sabiti çözücünün, içine daldırılan yüklü partikülün etrafındaki elektrik alanın şiddetini azaltma yeteneğini ifade eder. Dielektrik sabiti çözücünün polaritesi için bir ölçüdür. Polar çözücülerdeki yükler polar olmayan çözücülere göre daha büyük etkiye sahiptir. Daha yüksek dielektrik sabitine sahip olan çözücülerin, çözültide daha yüksek net yük yoğunluğuna sahip olduğu düşünülmektedir. Elektrik alan altında, jet tarafından taşınan yükler arttığında, jete daha yüksek gerilme kuvvetleri uygulanır ve sonuç olarak boncuklarda küçülme ve çapta incelme meydana gelir [50, 212, 213]. Bu çalışmada PEO yüksek dielektrik sabitine sahip distile suda (bak. Çizelge 2.2) çözünerek elektroğirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Suyun kullanılması elektroğirmede kullanılan toksik çözücülerin hücresel çalışmalarda meydana getirebileceği olumsuz etkilerden kaçınılması açısından son derece önemlidir.

Titanyum implantların kaplanmasında kullanılmak üzere istenilen özellikteki nanofiberlerin elde edilmesi amacıyla distile suda çözünen iki farklı molekül ağırlığındaki ($M_v:400,000$ ve $600,000 \text{ g mol}^{-1}$) PEO'dan nanofiber üretim işlemleri gerçekleştirilmiştir.

4.2.1.1. $M_v:400,000 \text{ g mol}^{-1}$ molekül ağırlığındaki PEO'dan nanofiber üretimi

%6 PEO (w/v) derişimde, 0.3 mL sa^{-1} akış hızında, 15 cm toplayıcı mesafesinde ve 10-20 kV voltaj aralığında gerçekleştirilen çalışmalarda, akış hızı ve mesafe

sabit tutularak voltajın fiber oluşumuna ve morfolojisine etkisi incelenmiştir. İncelenen tüm voltaj değerlerinde düzgün yapıda fiberler elde edilmiş ve elde edilen fiberlerin SEM görüntülerinden (Şekil 4. 28) ortalama çapları hesaplanarak sonuçlar Çizelge 4.5'de verilmiştir. 10 kV'de 311 ± 33 nm çapında nanofiberler elde edilirken, 20 kV'de çap 264 ± 29 nm olmuştur. Çalışma koşullarında hesaplanan fiber çapları değerlendirildiğinde, voltajın 10 kV'den kademeli olarak 20 kV çıkması ile nanofiberlerin çaplarında bir azalma meydana gelmiştir (Şekil 4. 29). SEM görüntülerinden nanofiberlerin morfolojilerinde voltaja bağlı belirgin bir değişim gözlenmemiştir.

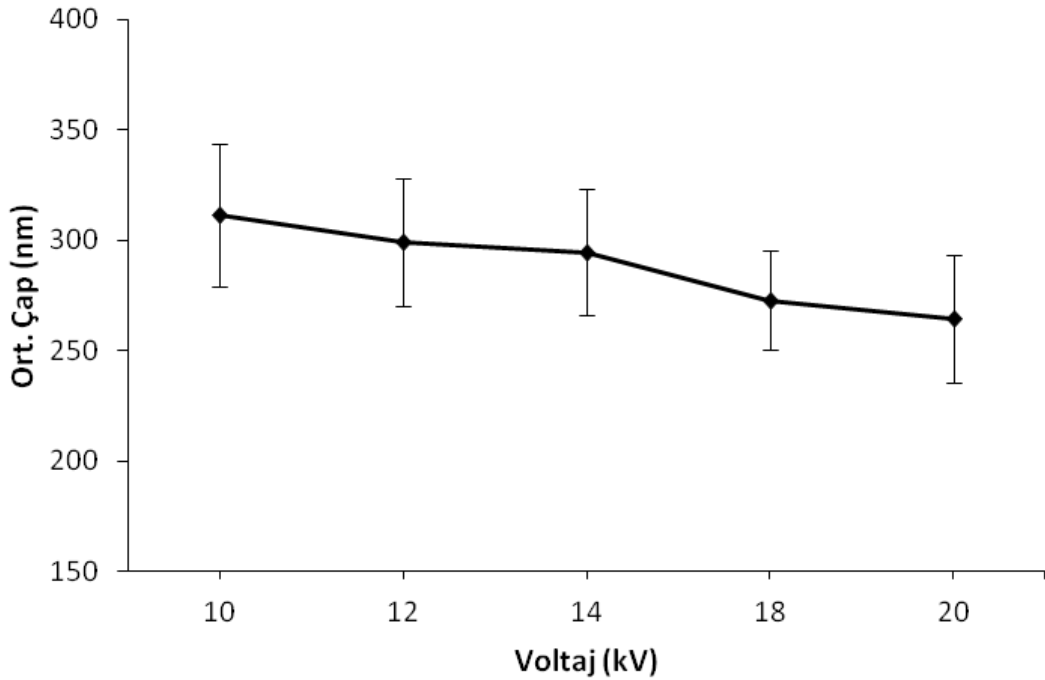


Şekil 4. 28. %6 PEO (w/v) derişimi, 0.3 mL sa^{-1} akış hızı ve 15 cm toplayıcı mesafesi için elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüleri (5 KX, sağ üst görüntüler 30 KX). a) 10 kV, b) 12 kV, c) 14 kV ve d) 20 kV

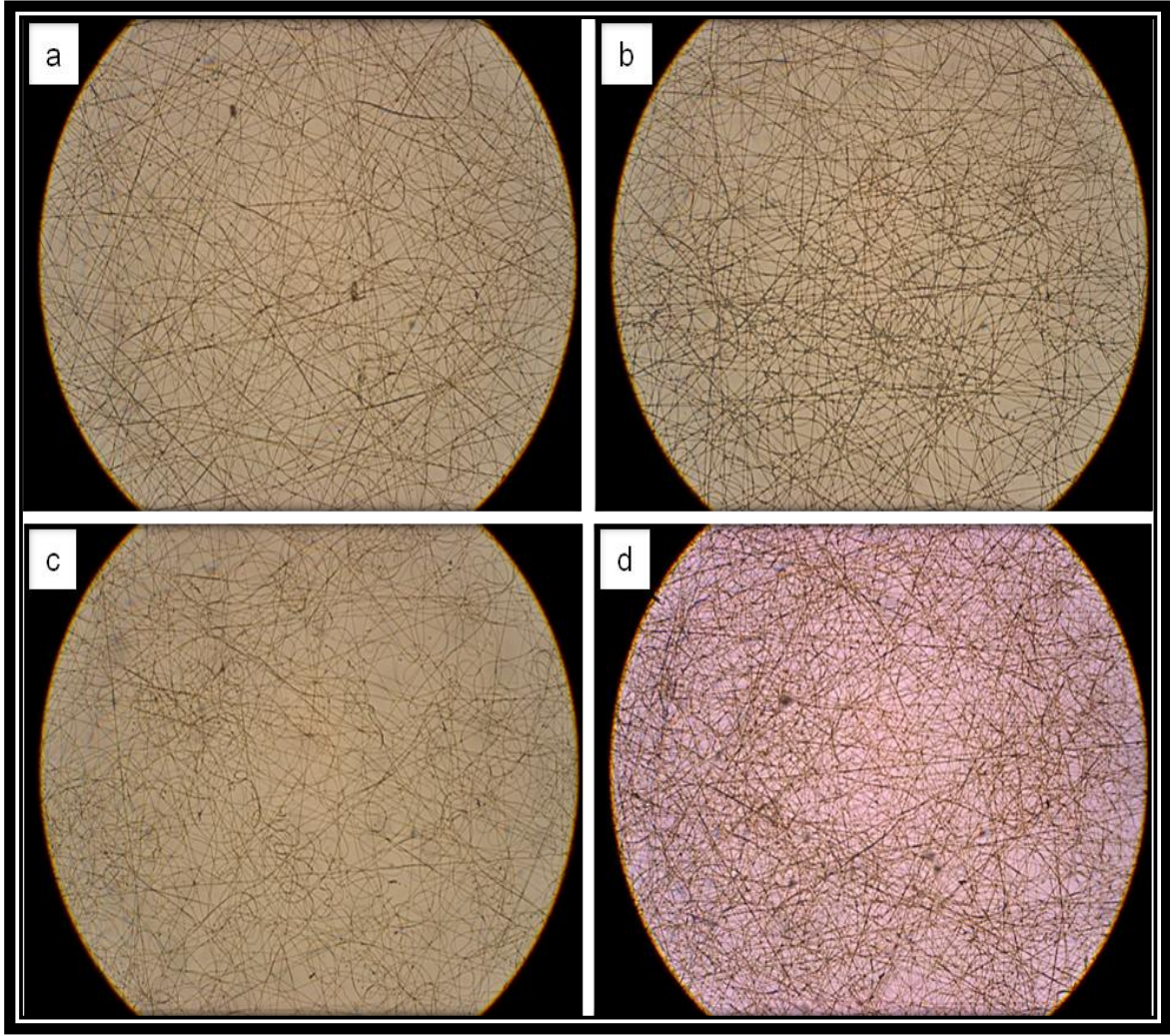
Çizelge 4. 5. %6 PEO (w/v) derişiminden elde edilen nanofiberlere ait çalışma koşulları ve fiber çapları

Derişim (% w/v)	Voltaj (kV)	Mesafe (cm)	Akış Hızı (mL sa ⁻¹)	Çap (nm)
6	10	15	0.3	311±33
	12			299±29
	14			295±28
	18			273±23
	20			264±29

Akış hızının fiberlere olan etkisini incelemek için 1 mL sa⁻¹ akış hızına çıkılarak çalışmalara devam edilmiştir. Üretilen fiberlerin i-mikroskop görüntüleri değerlendirildiğinde 10 kV'de elde edilen fiberlerde yer yer sarmalanma oluşmuş (4.30 a) voltajın 20 kV'ye çıkarılması aşamasında fiberlerde bozulmanın daha da arttığı gözlenmiştir (Şekil 4. 30 b-d). Bu koşullarda üretilen fiberler için 1 mL sa⁻¹ akış hızının, düzgün fiber üretimi açısından yüksek olduğu sonucu çıkarılmıştır.



Şekil 4. 29. % 6 PEO (w/v) derişimi, 0.3 mL sa⁻¹ akış hızı ve 15 cm toplayıcı mesafesi için elde edilen nanofiberlerin çap-voltaj ilişkisi



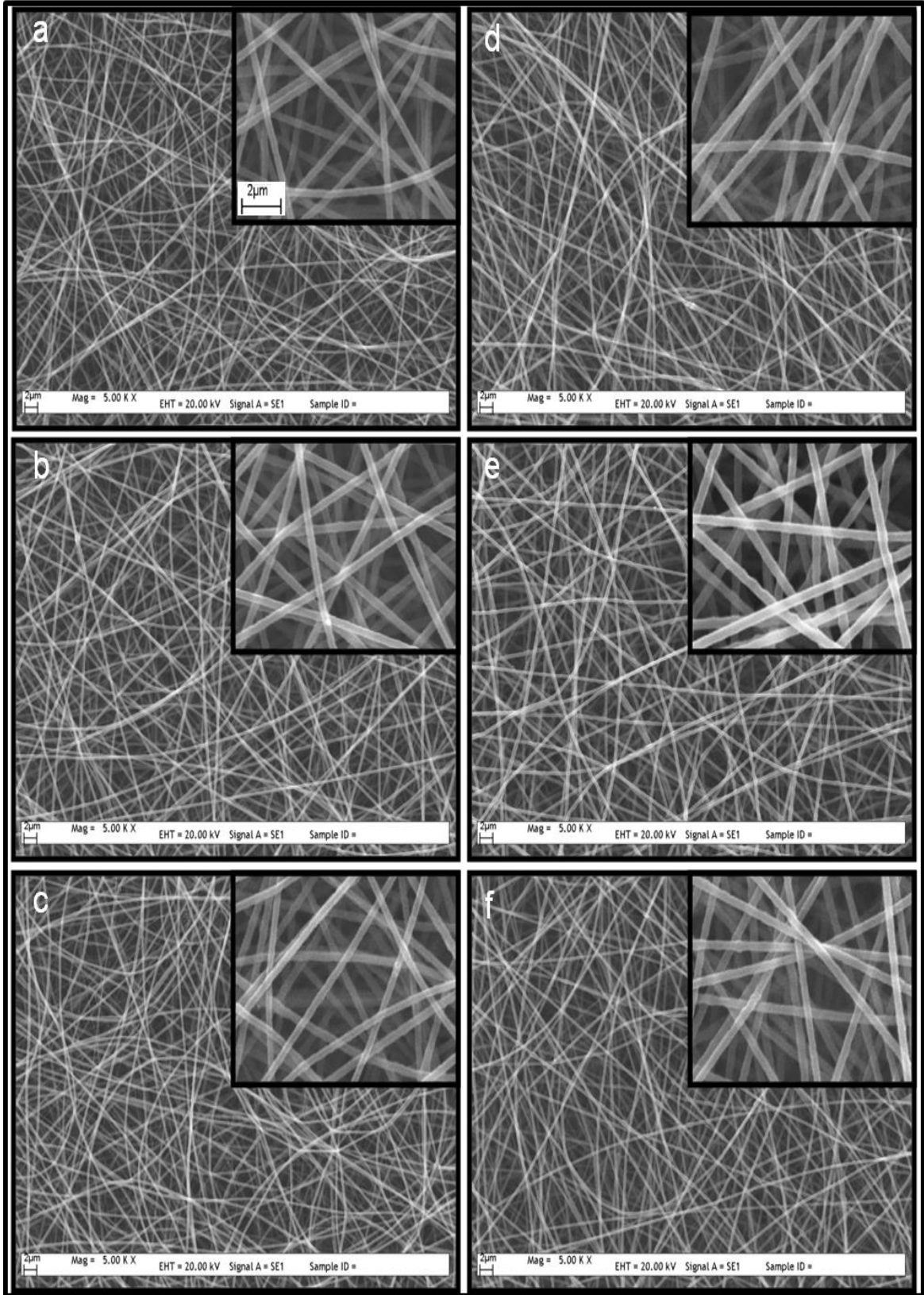
Şekil 4. 30. %6 PEO (w/v), 1 mL sa⁻¹, 15 cm koşulunda elde edilen fiberlerin i- mikroskop görüntüleri (40X). a) 10 kV, b) 14 kV c) 18 kV ve d) 20 kV

Polimer derişimi %8' e (w/v) çıkarılarak yapılan çalışmalarda mesafe sabit tutularak (15 cm) 0.25 mL sa⁻¹, 0.5 mL sa⁻¹, 1.0 mL sa⁻¹ akış hızlarında ve 12-20 kV aralığındaki uygulama potansiyeli ile hem voltajın, hem de akış hızının fiberlerin yapısına/boyutuna olan etkisi incelenmiştir. 0.25 mL sa⁻¹ akış hızında 12-20 kV aralığında üretilen fiberlerin SEM görüntülerinden (Şekil 4. 31 a-c) hesaplanan çapları Çizelge 4. 5'de verilmiştir. 12 kV ile 325±35 nm çaplı nanofiberler üretilmiş, 20 kV'de çap 318±37 nm olmuştur. Görüntüler incelendiğinde artan voltaja bağlı olarak nanofiberlerde morfolojik açıdan bir değişim gözlenmemiştir. Aynı zamanda voltajın kademeli olarak 12 kV'den 20 kV'ye artırılması fiberlerin çaplarında önemli bir değişime neden olmamıştır (Şekil 4. 32). Akış hızının fiberlerin yapılarına olan etkisini incelemek amacıyla, 0.5 mL sa⁻¹ ile çalışmalara devam edilmiştir. 12-20 kV aralığında yapılan elektroğirme işleminde elde edilen fiberlerin SEM

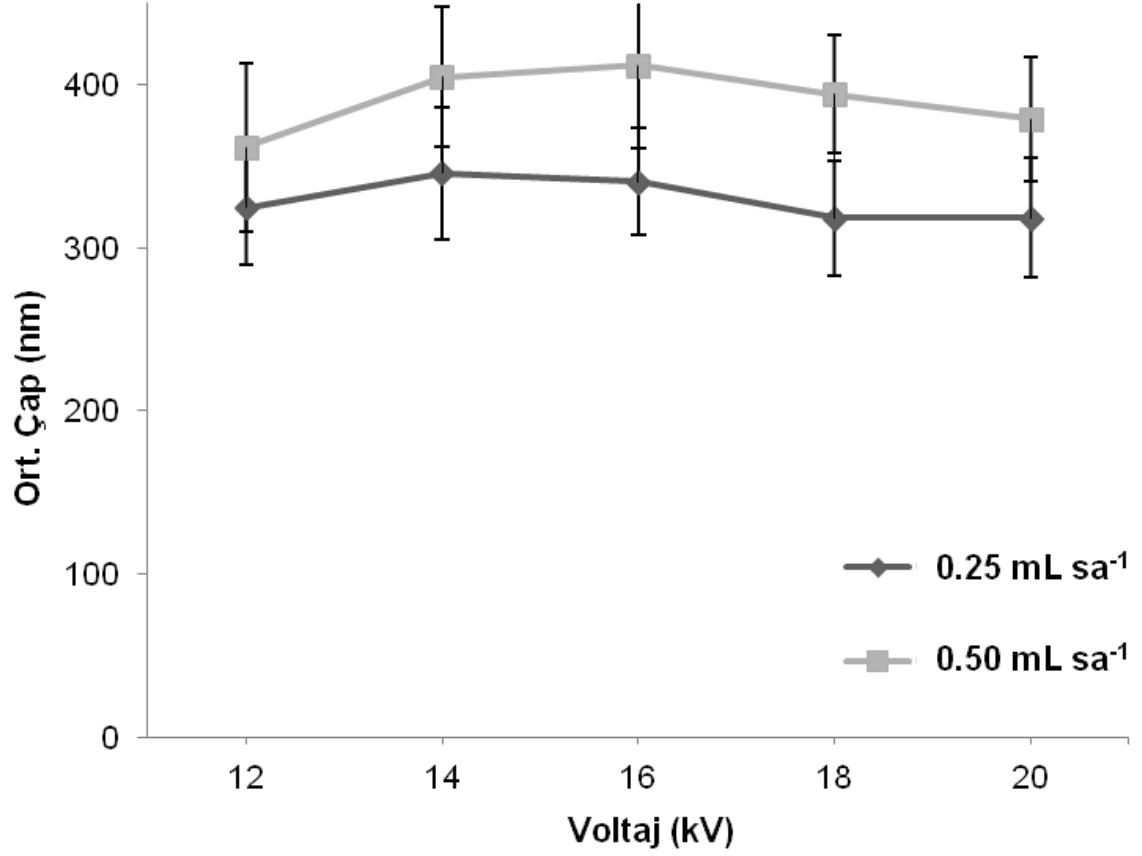
görüntülerinden (Şekil 4. 31 d-f) hesaplanan çapları Çizelge 4. 5’de verilmiştir. Fiberlerin çapları 12 kV için 362 ± 52 nm, 20 kV için ise 379 ± 38 nm olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, 0.25 mL sa^{-1} ’de elde edilen sonuçlara benzer olarak 0.5 mL sa^{-1} akış hızında elde edilen nanofiberlerin morfolojileri ve çapları üzerinde de voltajın önemli bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Fakat 0.25 mL sa^{-1} ve 0.5 mL sa^{-1} akış hızında elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında akış hızındaki artış, fiberlerin çaplarında bir artışa neden olmuştur (Şekil 4. 32). Nanofiberlerin morfolojilerinde, akış hızının değiştirilmesine bağlı belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Akış hızı 1 mL sa^{-1} değerine çıkarıldığında elde edilen fiberlere ait SEM görüntüleri (Şekil 4. 33 a ve b) incelendiğinde, akış hızındaki artışın fiber morfolojisini önemli bir şekilde etkilediği gözlenmiştir. Normalde silindirik bir yapıya sahip olan fiberlerin yassılaşıma doğru giderek şerit benzeri bir yapı sergiledikleri gözlenmiştir. Bu durum voltajın 18 kV çıktığı Şekil 4. 33 b’de çok daha belirgin olmuştur. Jetin toplayıcıya ulaşması sürecinde akış hızının artmasından dolayı, jet bükülmesinin azalması neticesinde jetin kat ettiği yol kısalmıştır. Bu nedenle, 15 cm mesafede fiber yapısından çözücünün (distile su) uzaklaşması için yeterli süre sağlanamadığından fiberlerin fiziksel yapısı tipik fiber yapısından uzaklaşmıştır.

Çizelge 4. 6. %8 PEO (w/v) derişiminden elde edilen nanofiberlere ait çalışma koşulları ve fiber çapları

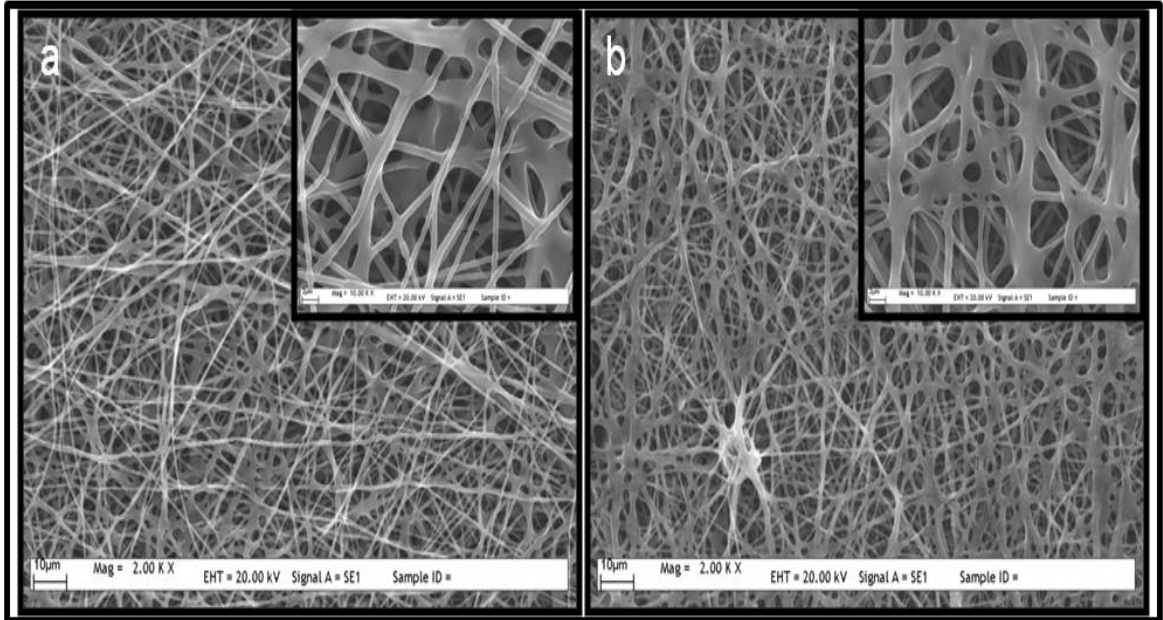
Derişim (% w/v)	Voltaj (kV)	Mesafe (cm)	Akış Hızı (mL sa^{-1})	Çap (nm)	
8	12	15	0.25	325 ± 35	
				346 ± 40	
				14	341 ± 33
					318 ± 35
	16		318 ± 37		
			0.5	362 ± 52	
	405 ± 43				
	412 ± 51				
	394 ± 36				
	20		379 ± 38		



Şekil 4. 31. %8 PEO (w/v) derişimi ve 15 cm toplayıcı mesafesinde elde edilen fiberlerin SEM görüntüleri (5 KX, sağ üst görüntüler 30 KX). 0.25 mL sa⁻¹ a) 12 kV, b) 16 kV ve c) 20 kV; 0.5 mL sa⁻¹ d) 12 kV, e) 16 kV ve f) 20 kV



Şekil 4. 32. %8 PEO (w/v) derişimi, 15 cm mesafe, 0.25 mL sa⁻¹ ve 0.5 mL sa⁻¹ akış hızları için elde edilen nanofiberlerin çap-voltaj ilişkisi



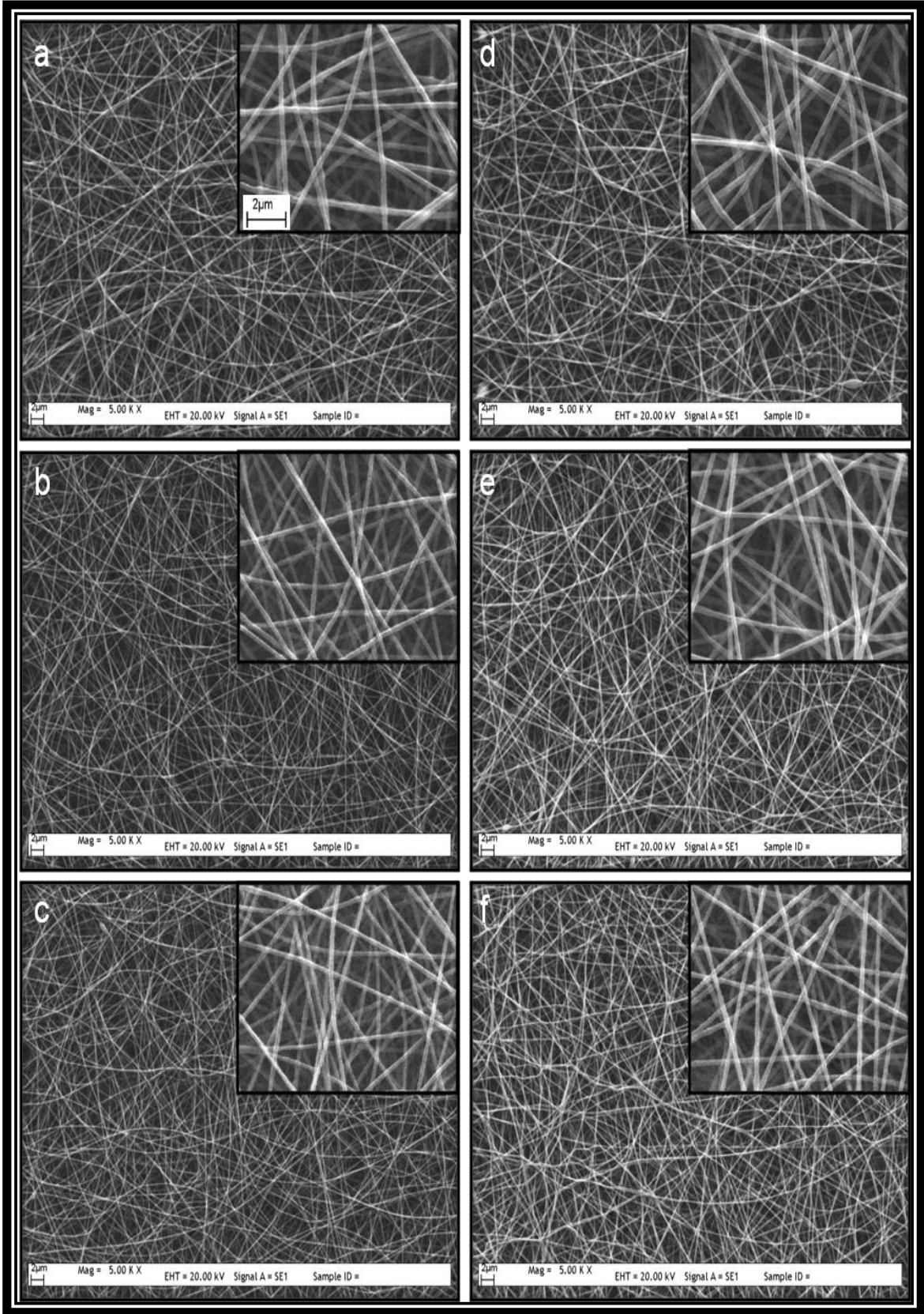
Şekil 4. 33. %8 PEO (w/v) derişimi ve 15 cm toplayıcı mesafesinde elde edilen fiberlerin SEM görüntüleri (2 KX, sağ üst görüntüler 10 KX) 1 mL sa⁻¹ a) 14 kV ve b) 18 kV

4.2.1.2. $M_v:600,000 \text{ g mol}^{-1}$ molekül ağırlığındaki PEO'dan nanofiber üretimi
%4 ve %5 ve %7 PEO (w/v) derişimde, 0.5 mL sa^{-1} akış hızında, 10-25 kV aralığında ve 10-30 cm toplayıcı mesafesinde elektroğirme işlemi gerçekleştirilerek elde edilen fiberler için voltaj-çap, mesafe-çap ve derişim-çap ilişkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

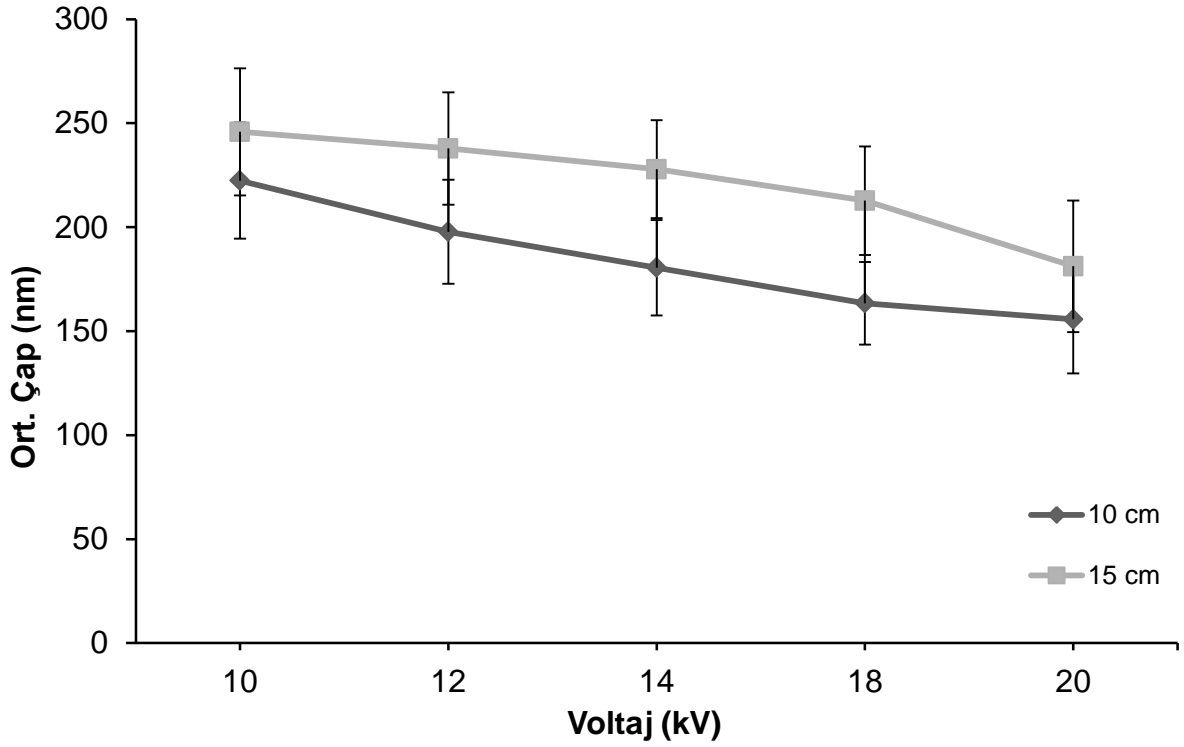
%4 PEO (w/v) derişiminde, 0.5 mL sa^{-1} , 10-20 kV aralığında, 10 cm ve 15 cm koşullarında gerçekleştirilen elektroğirme işlemlerinde, elde edilen fiberlerin SEM görüntülerinden (Şekil 4. 34) hesaplanan fiber çapları Çizelge 4. 6'da verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde, her iki toplayıcı mesafesinde ve 10-20 kV aralığında toplanan nanofiberlerde yapısal olarak bir farklılık gözlenmemiştir. 10 kV'de, 10 cm mesafede üretilen nanofiberlerin çapı $222 \pm 28 \text{ nm}$ iken, 15 cm'de çap $246 \pm 30 \text{ nm}$ olmuştur. 20 kV için, 10 cm mesafede üretilen nanofiberlerin çapı $156 \pm 26 \text{ nm}$, 15 cm'de ise $181 \pm 32 \text{ nm}$ olarak hesaplanmıştır. Mesafenin artmasına bağlı olarak fiberlerin çaplarında artış meydana gelmiştir (Şekil 4. 35). Ayrıca her iki mesafede voltajın artmasıyla birlikte çaplarda azalma meydana gelmiştir (Şekil 4. 35). Voltajın artmasıyla beraber, toplayıcıya ulaşma aşamasında fiberler daha da gerilmiş ve bu sayede çap düşüşü meydana gelmiştir.

Çizelge 4. 7. %4 PEO (w/v) derişiminden elde edilen nanofiberlere ait çalışma koşulları ve fiber çapları

Derişim (% w/v)	Voltaj (kV)	Akış Hızı (mL sa^{-1})	Mesafe (cm)	Çap (nm)
4	10	0.5	10	222 ± 28
				198 ± 25
				180 ± 23
				163 ± 20
	14		15	156 ± 26
				246 ± 30
	18		15	238 ± 27
				228 ± 24
				213 ± 26
				181 ± 32
20	15	213 ± 26		
		181 ± 32		



Şekil 4. 34. %4 PEO (w/v) derişiminde ve 0.5 mL sa^{-1} akış hızında elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüleri (5 KX, sağ üst görüntüler 30 KX). 10 cm a) 10 kV, b) 14 kV ve c) 18 kV; 15 cm d) 10 kV, e) 14 kV ve f) 18 kV



Şekil 4. 35. %4 PEO (w/v) derişimi ve 0.5 mLsa^{-1} akış hızı, 10 cm ve 15 cm mesafede elde edilen nanofiberlerin çap-voltaj ilişkisi

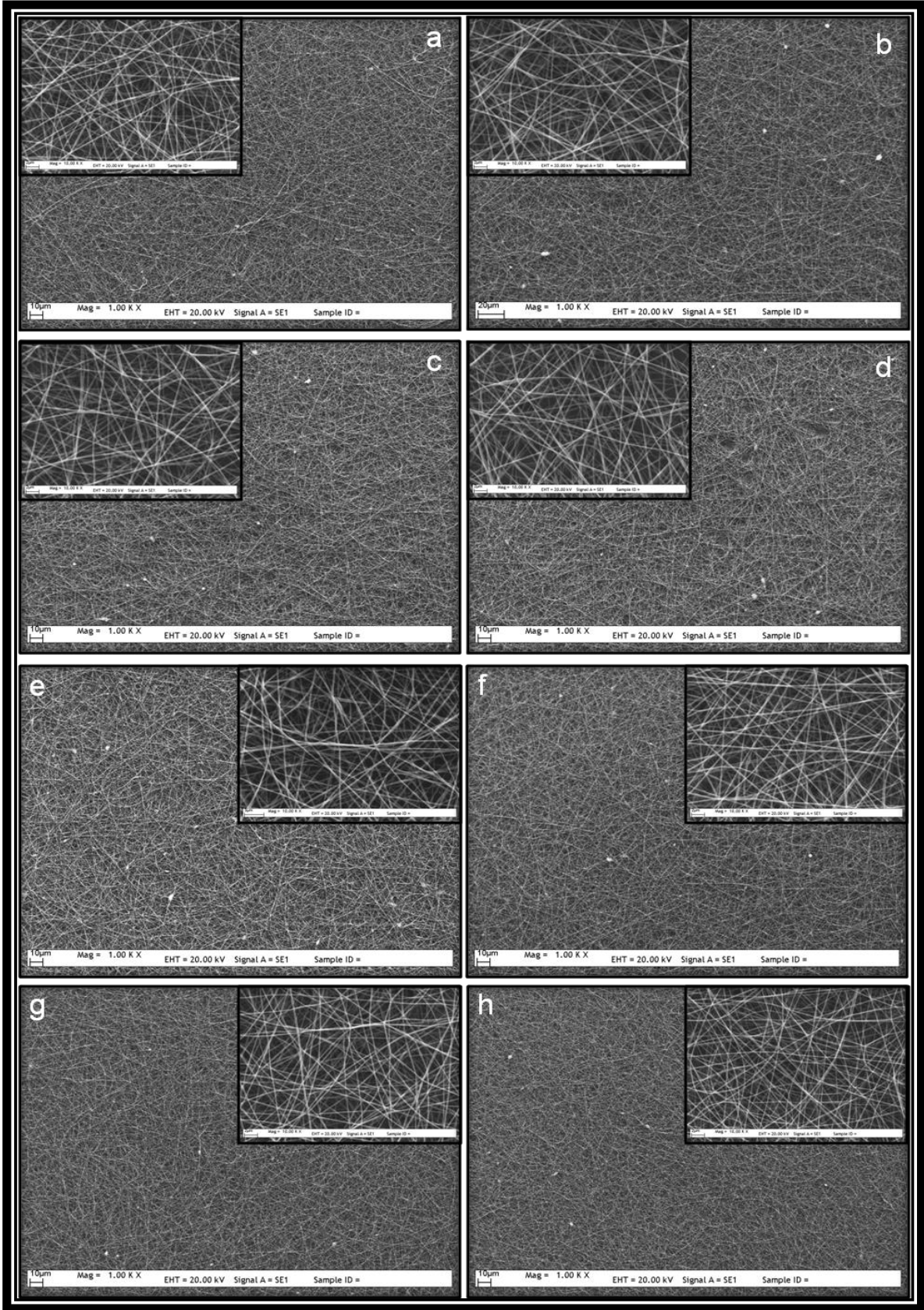
Polimer derişimi %5'e (w/v) çıkarılarak 0.5 mL sa^{-1} sabit akış hızında 10-30 cm arası mesafelerde elde edilen fiberlerin voltaja (10-25 kV) ve toplama mesafesine bağlı fiziksel yapılarındaki değişim çekilen SEM görüntülerinden belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 4. 36). SEM görüntülerinden hesaplanan fiber çapları Çizelge 4.7'de verilmiştir. 13 ve 15 kV voltaj değerlerinde 10, 15, 20, 25 ve 30 cm mesafelerde üretilen fiberlerin tümünde yer yer boncuk oluşumu gözlenmekle birlikte, fiberlerde morfolojik olarak belirgin bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4. 36 a-d). Fiber çapının toplama mesafesine göre değişimi Şekil 4. 37'de verilmiştir. Buna göre 13 kV ve 15 kV değerlerinde 10 cm ve 15 cm mesafede fiber çaplarında belirgin bir değişme olmamıştır. Mesafenin 20 cm'ye çıkarılması fiber çaplarında bir miktar yükselmeye yol açmışken 20-30 cm aralığında önemli bir değişim gözlenmemiştir. Sabit gerilimde mesafenin 20 cm'ye çıkmasıyla meydana gelen çaptaki artışın nedeni, artan mesafenin fiberler üzerindeki elektrik alan kuvvetini düşürerek fiber gerilmesini azaltması olarak görölse de, tüm mesefelerdeki çap değişimi incelendiğinde mesafenin fiber çapı üzerinde belirgin bir etkisinin olduğu görülmemektedir. Sabit toplayıcı mesafesinde voltajın fiberler üzerindeki etkisini belirlemek amacı ile 15 cm mesafede ve 10-25 kV voltaj

aralığında fiber üretimi gerçekleştirmiştir. Şekil 4. 36 (e-h)'deki SEM görüntüleri incelendiğinde 10-13 kV aralığında yer yer boncuk oluşumu gözlenmiş olup (Şekil 4. 36 e), 13 kV'den itibaren fiberlerde boncuk oluşumu azalmaya başlamış ve 15 kV değerinde en az düzeye inmiştir (Şeki 4.36 f). 15-25 kV aralığında ise boncuklarda bir miktar artış gözlenmiştir (Şeki 4.36 g ve h). 15 cm mesafede 10 kV için 246 ± 31 nm hesaplanan fiber çapı, 25 kV'de 179 ± 27 nm olmuştur (Çizelge 4. 7). 15 cm mesafede toplanan nanofiberlerin fiber çapları artan voltaja paralel olarak düşmektedir (Şekil 4. 38).

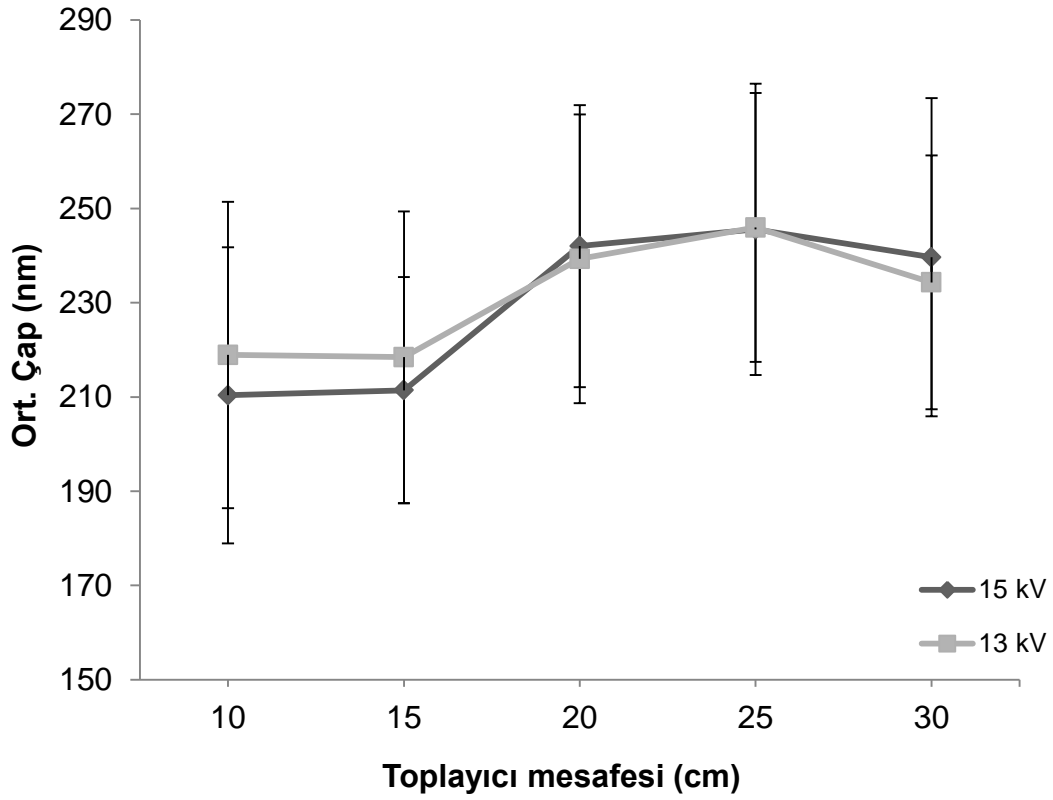
0.5 mL sa⁻¹ ve 15 cm koşullarında elde edilen fiber çaplarının PEO derişimine bağlı değişimini gösteren Şekil 4. 39, belirli voltaj değerlerinde %25'lik derişim farkının çap üzerinde önemli bir değişime yol açmadığını ifade etmektedir.

Çizelge 4. 8. %5 PEO (w/v) derişiminden elde edilen nanofiberlere ait çalışma koşulları ve fiber çapları

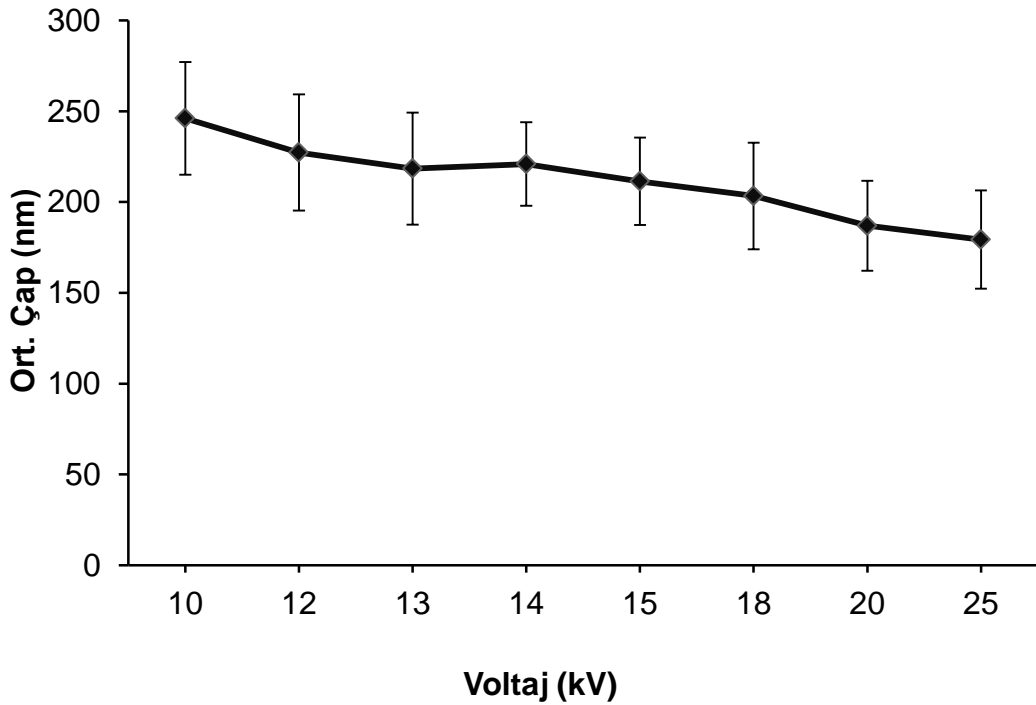
Derişim (% w/v)	Akış Hızı (mL sa ⁻¹)	Voltaj (kV)	Mesafe (cm)	Çap (nm)	
5	0.5	13	10	219±32	
		15		210±31	
		10	15	246±31	
		12		227±32	
		13		218±31	
		14		221±23	
		15		211±24	
		18		203±29	
		20		187±25	
		25		179±27	
		13, 15		20	239±31
					242±30
			25	246±28	
				246±31	
			30	234±27	
				240±34	



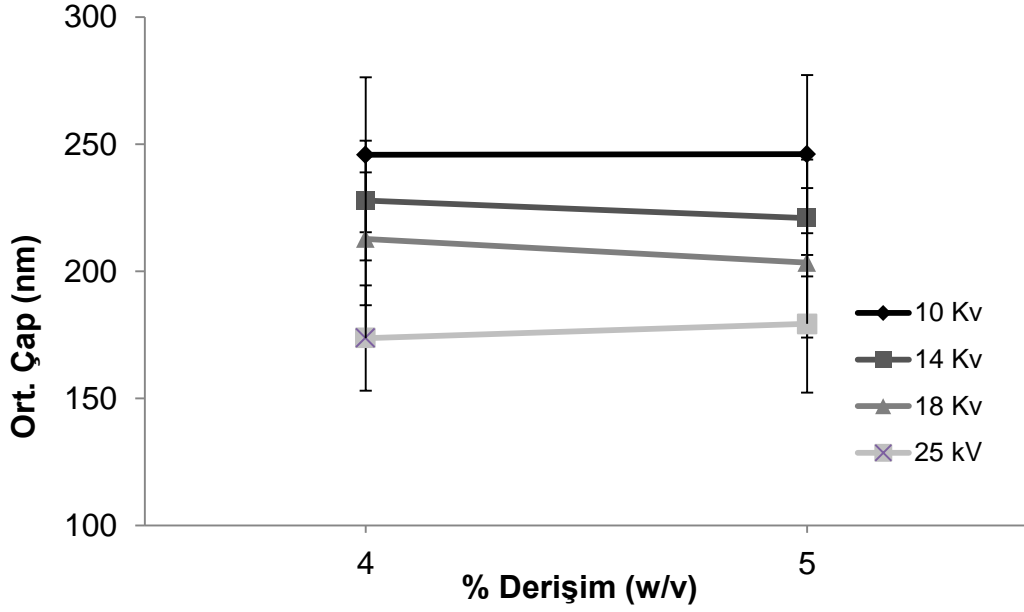
Şekil 4. 36. %5 PEO (w/v) derişiminden ve 0.5 mL sa^{-1} akış hızından elde edilen fiberlerin SEM görüntüleri (1 KX, üstteki küçük görüntüler 10 KX). 15 kV a) 10 cm, b) 20 cm, c) 25 cm ve d) 30 cm; 15 cm e) 10 kV, f) 15 kV, g) 18 kV ve h) 25 kV



Şekil 4. 37. %5 PEO (w/v) derişimi, 0.5 mL sa⁻¹ akış hızı, 13 kV ve 15 kV voltajda elde edilen nanofiberlerin çap-mesafe ilişkisi

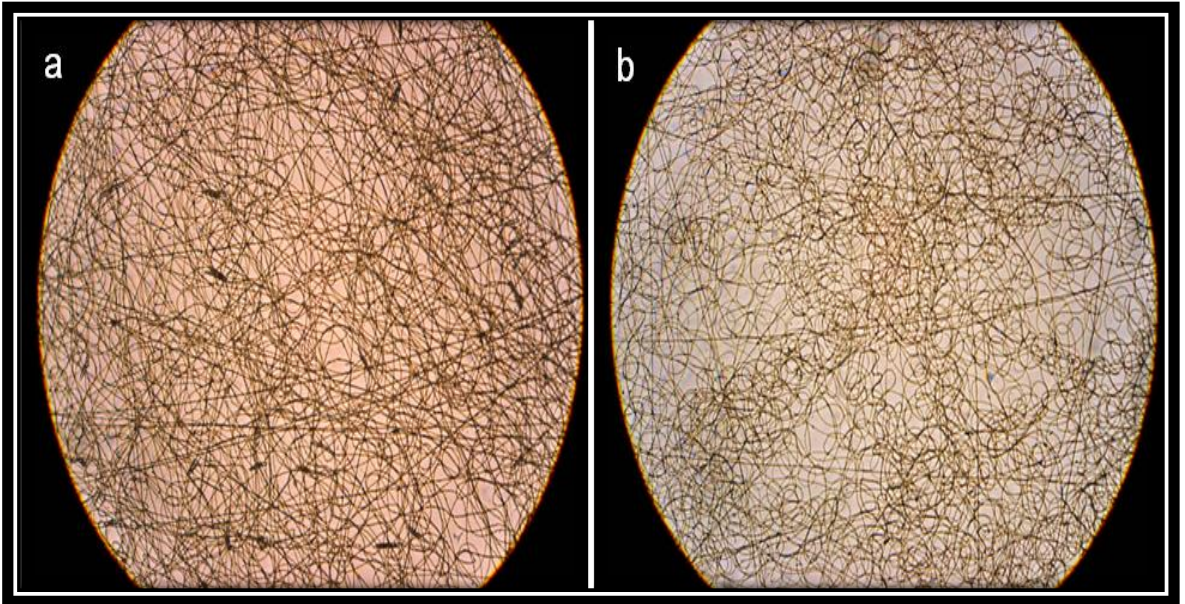


Şekil 4. 38. %5 (w/v) PEO derişimi, 0.5 mL sa⁻¹ akış hızı ve 15 cm mesafede elde edilen nanofiberlerin çap-voltaj ilişkisi



Şekil 4. 39. 0.5 mL sa⁻¹ akış hızı, 15 cm mesafede elde edilen nanofiberlerin çap-derişim ilişkisi

%7 PEO (w/v) ile 0.5 mL sa⁻¹ akış hızında 15 cm mesafede, ve 10-25 kV voltaj aralığında nanofiber üretimi gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Şekil 4.40'da verilen i-mikroskop görüntüleri incelendiğinde, tüm incelenen voltaj koşullarında düzgün yapıya sahip fiber üretimi gerçekleştirilememiş, fiberlerde sarmalanma ve yer yer damlacık oluşumu gözlenmiştir.



Şekil 4. 40. %5 PEO (w/v) derişiminden ve 0.5 mL sa⁻¹ akış hızından elde edilen fiberlerin i-mikroskop görüntüleri (40X). a) 10 kV ve b) 16 kV

PEO nanofiberlerin üretilmesi amacıyla incelenen tüm sistem parametreleri değerlendirilmiş ve nanofiberlerin %4 PEO ($M_v:600.000$) derişiminden 18 kV, 15 cm ve 0.5 mL sa^{-1} koşulunda üretilmesine karar verilmiştir.

4.2.2. PEO Nanofiberlerin Çapraz Bağlanması

Hücre ve bakteri kültürü ortamlarında kullanılacak PEO nanofiberlerin çözünmesini önlemek amacıyla bir dizi çapraz bağlama deneyi gerçekleştirmiştir. İlk olarak, sulu ortamda çözünmez polimer yapıların elde edilebilmesi amacıyla literatürde sıklıkla kullanılan glutaraldehit (GA) ve glioksal (GO) çapraz bağlayıcı ajanlarıyla kimyasal yolla çapraz bağlama işlemleri yapılmıştır. İkinci olarak, foto duyarlı çapraz bağlayıcılar (benzofenon ve pentaeritrol triakrilat) kullanılarak, UV varlığında çapraz bağlama deneyleri gerçekleştirilmiştir. En uygun çapraz bağlanma koşulunu belirlemek amacıyla çapraz bağlı PEO nanofiberler ile dinamik şişme deneyleri yapılmıştır.

GA ile çapraz bağlama işlemi için elektroğirme çözeltilisine eğirme işlemi öncesinde %1.5 (w/w) oranında GA ilave edilerek, fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlanma işlemini gerçekleştirmek amacı ile GA içeren PEO nanofiberler 24 saat süresince oda sıcaklığında reaksiyonun gerçekleştirilmesi için bekletilmişlerdir. Reaksiyon sonrasında fiberler distile su ile muamele edilerek, çapraz bağlama işleminin başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir. Distile su ile muamele edilen fiberlerin su ile temas eder etmez eridikleri gözlenmiştir. Çapraz bağlayıcı miktarının yetersiz olduğu düşüncesiyle %3'e çıkarılması, çapraz bağlama işleminin başarılı olmasını sağlayamamıştır. GA oranı %5 çıkarılıp farklı sıcaklık programlarında PEO nanofiberlerin çapraz bağlanması denemeleri gerçekleştirilmiştir. GA içeren nanofiberler 2 saat oda sıcaklığında veya 37°C ya da 45°C 'de, 4 saat oda sıcaklığında veya 37°C ya da 45°C 'de ve 22 saat oda sıcaklığında veya 37°C ya da 45°C 'de reaksiyona tabi tutulmuştur. Ancak belirtilen koşullarda reaksiyona sokulan nanofiberlerin çapraz bağlanmadıkları distile su ile muamele sonrası anlaşılmıştır. GA derişimin artması ve farklı sıcaklık programları PEO nanofiberlerin çapraz bağlanmasında etkin olmamıştır. Benzer işlemler glioksal içeren nanofiberlere de uygulanmış fakat olumlu bir sonuç elde edilememiştir. Bu bakımdan çapraz bağlama işleminin, çapraz bağlayıcı içeren ortamda yapılmasına karar verilmiştir. Çizelge 3.5'de belirtilen derişimlerdeki çapraz bağlayıcı ortamı metanol veya etanolde hazırlanmış ve ardından üretilen

fiberler çapraz bağlayıcı çözeltileri içerisinde yine Çizelge 3.5'de ifade edilen sıcaklık programlarına tabi tutulmuşlardır. Belirlenen reaksiyon süresinin sonunda fiberler kurutulmuş ve ardından distile su ile muamele edilmişlerdir. Fiberlerin distile su ile muamele eder etmez hemen çözüldükleri saptanmıştır. Sonuç olarak, PEO nanofiberlerin glutaraldehit ve glioksal ile çapraz bağlanması mümkün olamamıştır.

Literatürde GA ve GO ile PEO gibi hidroksil gruplara sahip polimerlerin (PVA ve hyaluronik asit gibi) çapraz bağlanmasına yönelik çalışmalar, çapraz bağlanmanın polimerlerin hidroksil grupları ile bu çapraz bağlayıcıların aldehit grupları üzerinden yürüdüğünü ifade etmektedir [214, 215]. PEO'da hidroksil grupları ana zincire yan zincirlerle bağlı durumdadır. Molekül ağırlığının artmasına bağlı olarak ana zincir uzunluğunun uzaması neticesinde, hidroksil grupları polimer ana zincirine kıyasla çok daha düşük miktarda kalmaktadırlar. Bu bakımdan PEO'nun OH grupları üzerinden çapraz bağlanamaması bu durumun ortaya çıkardığı bir sonuç olarak görülebilir.

Çapraz bağlama çalışmalarının ikinci basamağında, benzofenon ve pentaeritritol triakrilat (PETA) foto çapraz bağlayıcıları kullanılarak UV300 (300 Watt'lık ışık kaynağı) ve UV12 (12 Watt'lık ışık kaynağı) varlığında çapraz bağlama deneyleri yürütülmüştür. UV ışığı görünür ışığın hemen altında yer alan bir ışık spektrumudur. UV ışığı dalga boyuna bağlı olarak dört farklı spektral alana bölünmektedir: a) Vakum UV (100-200 nm arası), b) UV-C (200-280 nm arası), c) UV-B (280-315 nm arası) ve d) UV-A (315-400 nm arası). UV-A ışığı fotoçapraz bağlayıcı ajanlar varlığında polimerlerin fotoçapraz bağlanmasında kullanılmaktadır. PEO'nun çapraz bağlanmasında fotoçapraz bağlayıcı ajan olarak benzofenon ve türevleri sıklıkla uygulanmaktadır. Bu çalışmalarda PEO hem çözelti formundan hem de membran formundan çapraz bağlanmıştır [216, 217]. PEO'nun fotoçapraz bağlanmasında kullanılan diğer bir ajan ise PETA'dır. Doytcheva ve ark. [218] PETA içeren PEO membranları UV ile çapraz bağlamışlardır. Başka bir çalışmada Zhou ve ark. [219] da PETA kullanarak PEO fiberleri UV altında başarılı olarak çapraz bağlamışlardır. Bunlardan farklı olarak gama radyasyonu ile PEO'nun sulu çözeltilerinden veya katı formundan çapraz bağlayıcı ajan olmadan da doğrudan çapraz bağlanabileceği belirtilmiştir [220, 221]. Gama radyasyonu ile çapraz bağlama işleminin maliyet ve güvenlik gerekliliklerine karşın, UV ile çapraz

bağlama işleminin kolay, bağıl olarak daha güvenli ve ucuz olması tercihleri bu yöne çevirmiştir. Bu tez çalışmasında da UV-A türü ışık yayan lamba kullanılarak çapraz bağlama çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

İlk aşamada 300 Watt'lık 280-400 nm aralığında ışımaya yapan UV lamba (UV300) kullanılarak çapraz bağlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Şişme çalışmalarını daha pratik bir şekilde gerçekleştirmek ve sonrasında elde edilen sonuçları PEO nanofiberlerin şişme çalışmalarında kullanmak amacı ile, benzofenon içeren %4'lük PEO'dan (w/v) ($M_v:600,000$) çözücü döküm yöntemiyle hazırlanan membranlar ile çalışılmıştır. Çizelge 3.6 a'da belirtilen koşullar çerçevesinde ilk olarak distile suda hazırlanan PEO çözeltisine, distile suda çözünmediğinden dolayı etanolde çözünmesi sağlanan benzofenon çözeltisi ilave edilmiştir. Benzofenon içeren etanol çözeltisinin PEO sulu çözeltisine ilave edilmesi sonrasında, PEO, çözelti içerisinde kolloid benzeri bir forma dönüşmüştür. Bu şekilde Petrilere dökülüp 35°C'de 3 gün boyunca kuruma işleminin ardından katı formdaki membranlara belirlenen koşullar uygulanarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Optimum çapraz bağlanma koşulunun belirlenmesi amacıyla, %5, %10 ve %15 oranlarında (w/w) benzofenon içeren PEO membranlara 7 cm mesafeden 2, 3, 4, 5, 10 dakika süre ile UV300 uygulanmıştır. Bu mesafeden çapraz bağlanmaya çalışılan membranlarda ışık kaynağının yakın olmasından dolayı meydana gelen ısınma neticesinde yumuşama ve yüzeye yapışma gözlenmiştir. İşlem sonrası soğuması beklenen membranlar distile suya konulmuş ve tüm örneklerin şişme davranışı sergileyerek çözünmedikleri tespit edilmiştir. Etanolün PEO çözeltisinde oluşturduğu kolloid benzeri davranışın önüne geçebilmek amacıyla, benzofenon DCM'de çözülerek distile suda çözünen PEO ortamına ilave edilmiştir. Fakat iki çözeltinin karışması sonrasında çözelti içerisinde pamuk benzeri bir yapının oluşumu gözlenmiştir. Tüm bunların neticesinde, membranların hem PEO'yu hem de benzofenonu çözen DCM'de hazırlanmasına karar verilmiştir. 20 cm mesafeden 40 dak boyunca yapılan UV300 muamelesi sonrasında, distile suda bekletilen (24 sa) membranların çözünmedikleri tespit edilmiştir. Aynı derişimde PEO fiberler üretilmeye çalışılmış fakat başarılı bir şekilde fiber üretimi gerçekleştirilememiştir. Bu durumun DCM'nin düşük dielektrik sabitine sahip olmasından dolayı elektroegirme işlemini zorlaştırması neticesinde ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle daha

yüksek dielektrik sabitine sahip olan DMF (bak. Çizelge 2.2) çözücü ortamına eklenerek çapraz bağlama deneylerine devam edilmiştir. DCM/DMF (30/70, v/v) ortamında hazırlanan %5, %10 ve %15 (w/w) derişimlerde benzofenon içeren membranlara öncelikle 6 ve 8 cm mesafeden 1, 2 ve 5 dakika süreyle UV300 uygulanmıştır. Bu mesafelerde, ısınma sonucu yumuşama sonrasında yüzeye yapışan örneklerin işlem sonrası soğuması beklenmiş ve membranlar yüzeyden ayrılarak distile su ile muamele edilmişlerdir. Membranların su ortamında şiştikleri gözlenmekle birlikte mekanik dayanımlarının zayıf olduğu görülmüştür. Mesafe 15 cm'e çıkartılarak 1, 5 ve 10 dakika uygulama süresi ile yapılan çalışmalarda, 1 ve 5 dakikalık işlem süresinde çapraz bağlanmış membranların zayıf mekanik kararlılık gösterdiği, 10 dakikalık sürede ise ısınmaya bağlı yumuşama sergilediği gözlenmiştir. Mesafe 20 cm'e çıkartılarak yapılarak yapılan denemelerde, 1-90 dakika arasındaki sürelerde UV300 muamelesi yapılan membranların distile sudaki davranışları incelenmiştir. 15 dakikalık şişme süresinin sonunda tartılan membranların, gravimetrik olarak % şişme değerleri hesaplanmıştır. 1 dakikalık muamele sonrasında % 5, %10 ve %15 benzofenon içeren örneklerin % şişme değerleri sırasıyla %596, %546 ve %845 olarak hesaplanmıştır. Çapraz bağlanma süresinin 90 dakikaya çıkarılması sürecinde % şişme değerleri düşerek, 90 dakika için sırasıyla %143, %109 ve %123 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar en uygun benzofenon derişiminin %10 olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuçların benzofenon içeren PEO nanofiberlere uygulanma aşamasında 18 kV, 0.5 mL sa⁻¹ ve 15 cm koşulunda üretilen PEO fiberlerle çalışılmıştır. Hem membranlarda elde edilen optimum %10 benzofenon derişiminde, hem de Çizelge 3.6 b'de belirtilen diğer koşullarda çapraz bağlama işlemleri uygulanmıştır. Fakat fiber örgülerin distile su ile muamelesi sırasında hemen eridikleri tespit edilmiştir. Hem membranların çapraz bağlanmasında kullanılan, hem de belirlenen diğer koşullarda yürütülen çapraz bağlama deneylerinin sonucunda, PEO membranların çapraz bağlanıp şişmesi PEO fiberlerin ise çapraz bağlanmaması durumu ortaya çıkmıştır. PEO'nun iki farklı formunun ortaya çıkardığı birbirine zıt bu davranışa, PEO'nun membran formundan nanofiber formuna dönüşmesi sonucu ortaya çıkan oldukça yüksek yüzey alanı neticesinde, benzofenonun fiberleri çapraz bağlamada yetersiz kalmasının neden olduğu yorumu yapılabilir. Elde edilen sonuçlar neticesinde UV ışık kaynağının değiştirilmesine karar verilmiştir.

İkinci aşamada UV12 ışık kaynağı ve benzofenon ile Çizelge 3.7'de belirtilen koşullarda yapılan çalışmalarda UV300 kaynağı ile yapılan çalışmaların sonucuna benzer olarak membranların suda şişme davranışı gösterdiği, fakat PEO fiberlerin su ortamında hemen eridiği tespit edilmiştir. Bu sonucun da yukarıda açıklanan durumdan dolayı ortaya çıktığı düşünülmektedir. Çapraz bağlayıcının PETA olarak kullanılması sonrasında %10'luk PETA içeren membranların çapraz bağlandığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu derişimde üretilen nanofiberlerin de su ortamında şişme sergileyerek çapraz bağlandığı belirlenmiştir. Benzofenondan farklı olarak PETA'nın fiberleri çapraz bağlayabilmesi, çapraz bağlayıcı olarak daha etkin olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçtan yola çıkarak PEO nanofiberlerin PETA kullanılarak UV12 kaynağı ile çapraz bağlanmasına karar verilmiştir. Fiberler için en uygun çapraz bağlanma koşulunun belirlenebilmesi amacıyla PETA derişimi ve fiberlerin kuruma koşulları üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.7'de belirtilen tüm koşullarda %4 PEO (w/v) ($M_v:600,000 \text{ g mol}^{-1}$) ile 18 kV, 0.5 mL sa^{-1} ve 15 cm elektroğirme parametreleri için PETA derişiminin artmasına bağlı olarak düzgün fiber elde edilmesi zorlaşmıştır. Voltajın 18 kV'da sabit tutulması, akış hızının 0.4 mL sa^{-1} 'e düşürülmesi ve mesafenin 23 cm'ye çıkarılması ile istenilen özellikteki fiberlerin üretimi mümkün olmuştur. Bundan sonraki tüm çalışmalarda nanofiber üretimi için %4 PEO (w/v) ($M_v:600,000 \text{ g mol}^{-1}$) derişimi, 18 kV uygulama potansiyeli, 0.4 mL sa^{-1} akış hızı ve 23 cm toplayıcı mesafesi kullanılmıştır. Literatürde yapılan çalışmalar UV uygulama mesafesinin 4-6 cm mesafede en iyi sonucu verdiğini göstermiştir [218]. Bu bakımdan bu çalışmada da 4 cm mesafede çapraz bağlama deneyleri gerçekleştirilmiştir. Tüm çapraz bağlayıcı derişimlerde elde edilen nanofiber örgüler (1 cm^2) elektroğirme sonrası hemen Çizelge 3.7'de belirlenen sürelerde çapraz bağlanma işlemine tabi tutulmuşlardır. İşlemler sonrasında fiberlerin sudaki şişme davranışları incelenmiştir. Gravimetrik tayin yöntemiyle hesaplanan % su içeriklerinden fiberlerin en iyi 50 dakikada çapraz bağlandığı belirlenmiş ve devam eden çalışmalar bu sürede gerçekleştirilmiştir.

4.2.3. Çapraz Bağlı PEO Nanofiberlerin Karakterizasyonu

PETA içeren PEO nanofiberlerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında; en iyi çapraz bağlanma koşulunun belirlenebilmesi amacıyla dinamik şişme deneyleri

gerçekleştirilmiştir. Fiberlerin kimyasal yüzey karakterizasyonu FTIR-ATR ile yapılmıştır. Optimum PETA miktarının belirlenmesi sonrasında, çapraz bağlı PEO nanofiberler ile kaplanan titanyum yüzeyler SEM, AFM ve su temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmiştir.

4.2.3.1. Çapraz bağlı PEO nanofiberler ile şişme çalışmaları

PEO nanofiberlerin PETA ile UV12 yoluyla çapraz bağlanabilirliğinin belirlenmesinin ardından optimum çapraz bağlanma koşulunun sağlanması amacıyla dinamik şişme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Fiber örgülerin şişme deneyleri PBS (pH: 7.4) ortamında yürütülmüştür. Elektroçirime sonrası UV12 ile muamele edilip PBS ortamında koyulan fiberlerin PBS ile temas eder etmez küçüldükleri ve büzülerek katlandıkları tespit edilmiştir. Bu durum titanyum yüzeylere kaplanacak olan nanofiberlerin yüzeyden ayrılmalarına neden olacağından, fiberlerin kararlı şişme davranışı göstermelerini sağlamak amacıyla 37 °C'de veya oda sıcaklığında ya da vakumda (oda sıcaklığı) kurumaya alınan fiber örgüler belirli süreler sonunda, UV12 ile muamele edilerek PBS ortamına koyulmuş ve şişme davranışı gözlenmiştir. Bu bakımdan Çizelge 3.8'deki koşullar kullanılarak, %1, %2.5, %5, %7.5 ve %10 (w/w) PETA derişimine sahip her bir fiber örgü grubu 37°C'de kurumaya alınmış ve her bir PETA derişimindeki fiber örgüler 1 gün, 3 gün, 6 gün ve 8 günlük kuruma sürelerinin sonunda UV12 yoluyla çapraz bağlanarak PBS ortamında (37°C) şişme davranışları açısından incelenmiştir. Tüm örnek gruplarında 6. günden itibaren kuruyan fiberlerin şişme ortamında daha az küçüldükleri ve şekil değiştirdikleri gözlenmiş, 8. günden itibaren ise PETA derişimine bağlı olarak karesel formdaki fiber örgülerin şekillerindeki değişim oldukça azalmış veya ortadan kalkmıştır. Diğer ortamlarda (vakumda veya oda koşullarında) kuruyan fiber örgülerde ise bu düzelmenin ortam sıcaklığına bağlı olarak 2-3 haftadan sonra ortaya çıktığı belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç doğrultusunda fiberlerin 37°C'de kurutulmasına karar verilmiştir. Aynı koşullar, PETA içeren fakat UV12 uygulanmayan fiber örgülere de tatbik edilmiş ve fiber örgülerin UV kaynağı olmadan da çapraz bağlanabildiği tespit edilmiştir. En iyi çapraz bağlanma koşulunun tespiti amacıyla UV12 uygulanmayan fiber örgülerin şişme davranışları UV12 uygulanan örgülerle paralel yürütülmüştür.

%1 PETA (w/w) derişiminde UV12 muamelesi gören ve görmeyen örneklerin PBS ortamında 24. saatten itibaren parçalandıkları tespit edilmiştir. Bu derişimde

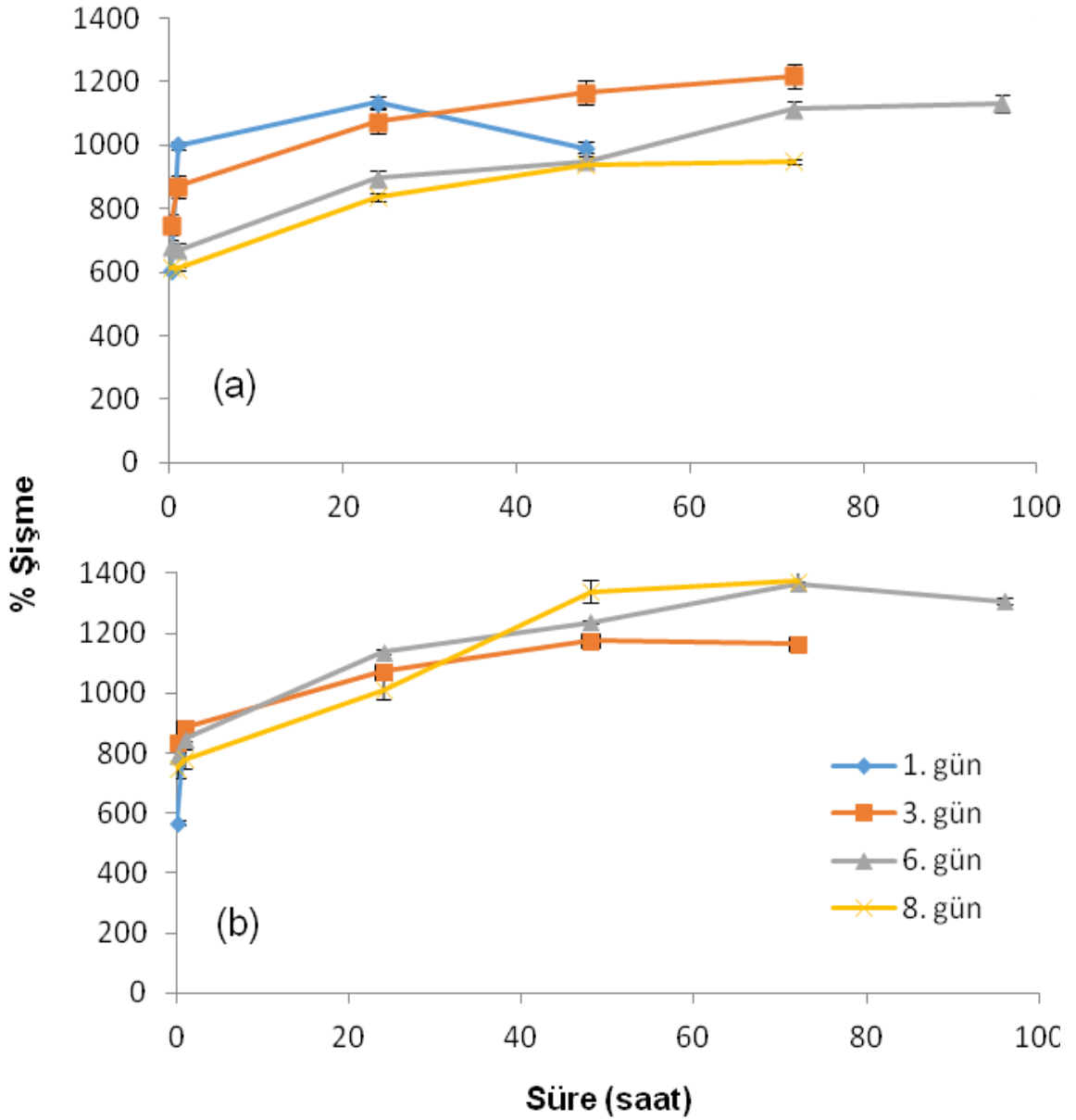
çapraz bağlanan nanofiberlerin yetersiz çapraz bağlayıcı miktarından dolayı yeterli mekanik dayanıma sahip olmadıkları belirlenmiştir.

%2.5 PETA (w/w) derişiminde elde edilen fiber örgülerden hem UV12 muamele edilenler hem de edilmeyenler PBS ortamına koyulur koyulmaz küçülme ve büzülme davranışı sergilemişlerdir. 1 günlük ve 3 günlük kurumanın sonunda PBS ile muamele edilen örneklerin 24. saatten itibaren jelleşmeleri artmış ve bu durum ağırlıklarının belirlenmesinde problem yaratmıştır. 6 ve 8 günlük kuruma sonrasında ise 48. saatten sonra jelleşme artışına paralel olarak örneklerde ya ağırlık kaybı gözlenmiş ya da sonraki sürelerde ölçüm alınamamıştır. UV12 uygulanmayan örneklerde bahsi geçen jelleşme problemi daha da baskın olmuştur. Ayrıca her iki örnek grubu için kurumanın 6. gününde fiber örgülerdeki küçülme ve büzülme davranışı bir miktar azalmış, 8. günde ise daha da az olmuştur.

%5 PETA (w/w) içeren fiber örgülerdeki şişme davranışı değerlendirildiğinde, UV12 uygulanan ve uygulanmayan örneklerde 1 ve 3 günlük kuruma sonunda PBS ortamında küçülme ve büzülme davranışı gözlenmiştir. Her iki örnek grubunda da 24 veya 48 saatlik şişme sürecinden sonra aşırı jelleşmeye bağlı olarak ya ağırlık kaybı gözlenmiş ya da ölçüm alınamamıştır. UV12 uygulanmayan örneklerin jelleşmelerinin, UV12 uygulananlara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Her iki örnek grubu için 6 günlük kuruma sonrası fiber örgülerdeki küçülme ve büzülme davranışının azalmaya başladığı, 8 günlük kuruma sonrasında ise çok daha az olduğu gözlenmiştir.

PETA derişimi %7.5'e (w/w) çıkarıldığında, UV12 uygulanan ve uygulanmayan gruplarda 1 ve 3 günlük kuruma işleminin sonunda PBS ile muamele edilen örgülerin küçülme ve büzülme sergiledikleri gözlenmiştir. 72 saatlik şişme sürecinde her iki örnek grubundaki jellerin 3 günlük kuruma süresinden itibaren mekanik kararlılıklarının iyi olduğu tespit edilmiştir. 8 günlük kuruma süresine sahip fiber örgülerde şişme sırasında az miktarda küçülme gözlenmiş büzülme davranışı ise gözlenmemiştir. Her iki örnek gurubuna ait % şişme grafiği Şekil 4. 41'de verilmiştir. UV12 uygulanmayan örneklerin PBS ortamında daha fazla şişme sergiledikleri belirlenmiştir. 72 saatin sonunda minimum şişmenin %950 ile 8 gün boyunca kurutulurken UV12 ortamında çapraz bağlanan fiber örgülerde meydana geldiği hesaplanmıştır. UV12 uygulanmayan örneklerin 8. günlük kuruma sonrası

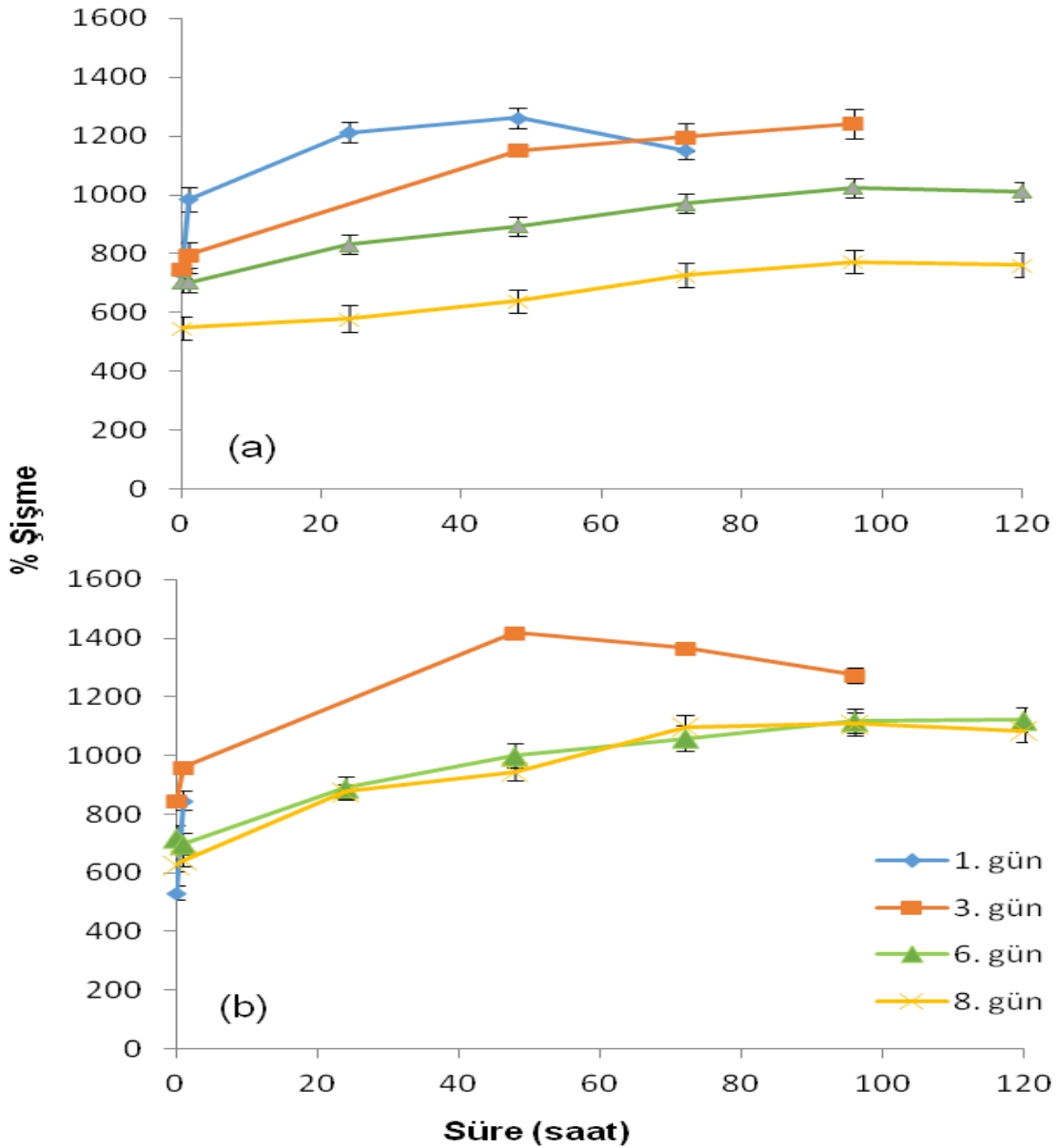
şişme değeri %1376'dır. Örneklerin şişmelerine ait veriler Ek'te sunulmuştur.



Şekil 4. 41. 37°C'de kurumaya alınan a) UV12 uygulanmış ve b) UV12 uygulanmamış %7.5 PETA içeren PEO nanofiberlerin kuruma süresine göre şişme davranışları

PEO fiber yapısına katılan %10'luk PETA (w/w) derişiminde %7.5 PETA derişimine benzer bir şekilde, kurutma sürecindeki her iki örnek grubunun 3. günden itibaren kararlı şişme davranışı sergiledikleri gözlenmiştir. 6 günlük kuruma sonrası şişme ortamındaki fiber örgüler büzülme sergilemeyerek az miktarda küçülme davranışı sergilemişlerdir. 8. günde ise fiber örgüler, şişme ortamında koyulduğu gibi kalarak şekil değişimi göstermeksizin şişmişlerdir. UV12

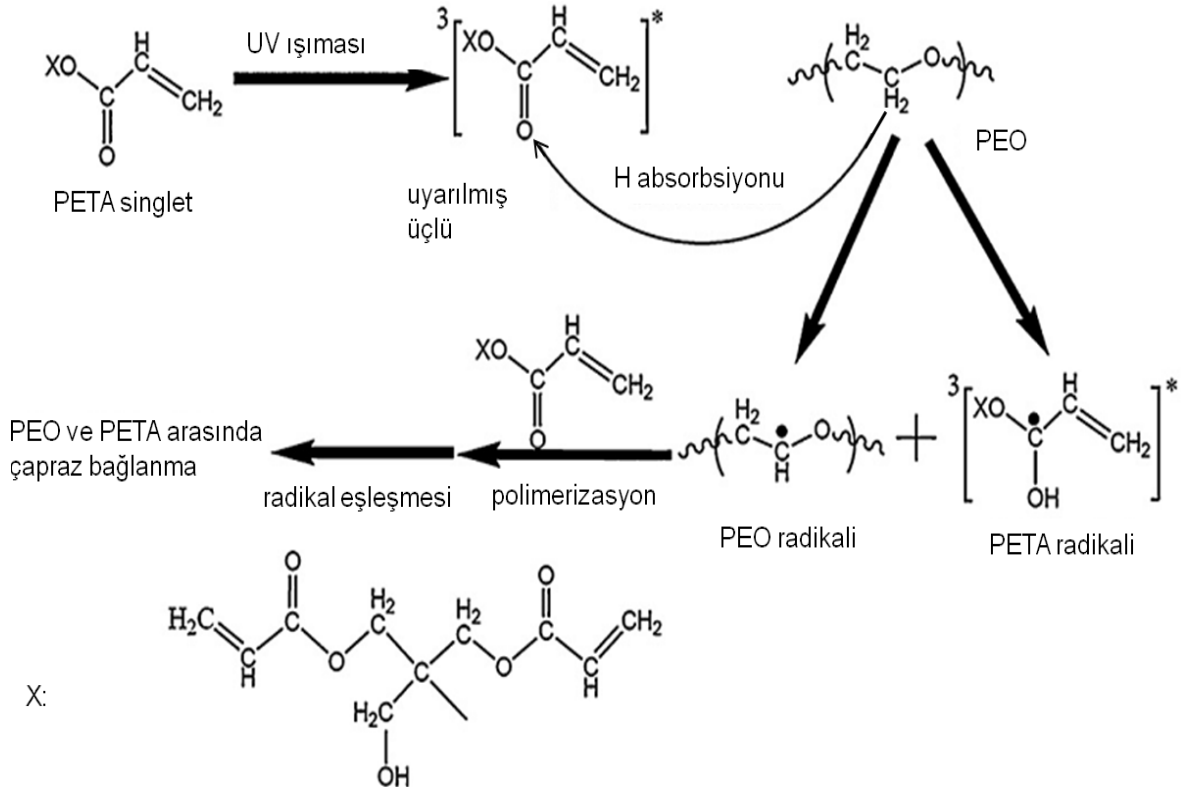
uygulan ve uygulanmayan örneklerin şişme grafikleri Şekil 4.42'de verilmiştir. Hesaplanan şişme verilerinden 8 gün boyunca kurutularak UV12 varlığında çapraz bağlanan fiber jellerin 96 saatlik şişmenin sonunda %772 şişme yüzdesiyle tüm örnek grubuna göre minimum şişme gösterdiği belirlenmiştir. Işık kaynağı kullanılmayan örneklerdeki şişme yüzdesi ise %1097 olmuştur. Örneklerin şişmelerine ait veriler Ek'te sunulmuştur.



Şekil 4. 42. 37°C'de kurumaya alınan a) UV12 uygulanmış ve b) UV12 uygulanmamış %10 PETA içeren PEO nanofiberlerin kuruma süresine göre şişme davranışları

Elde edilen tüm bu sonuçlar PEO nanofiberlerin PETA ile doğrudan çapraz bağlanabileceğini, fakat UV12 varlığında çapraz bağlanmanın daha etkin olduğunu

göstermiştir. PEO'nun PETA ile UV ışınması altındaki muhtemel çapraz bağlanma mekanizması Şekil 4. 43'de gösterilmiştir. Buna göre, UV ile uyarılmış PETA, PEO'dan bir hidrojen atomu alır ve bu şekilde hem PETA hem de PEO radikalleri ortaya çıkar. PETA radikali PEO radikaline bağlanabilir, dimerize olabilir veya PETA'nın polimerizasyonunu başlatabilir. Ana çapraz bağlanma süreci elde edilen PEO radikallerinin karbon karbon bağları ile birleşmesi yoluyla sağlanır [218].



Şekil 4. 43. PEO'nun PETA ile çapraz bağlanma reaksiyonunun şematik gösterimi

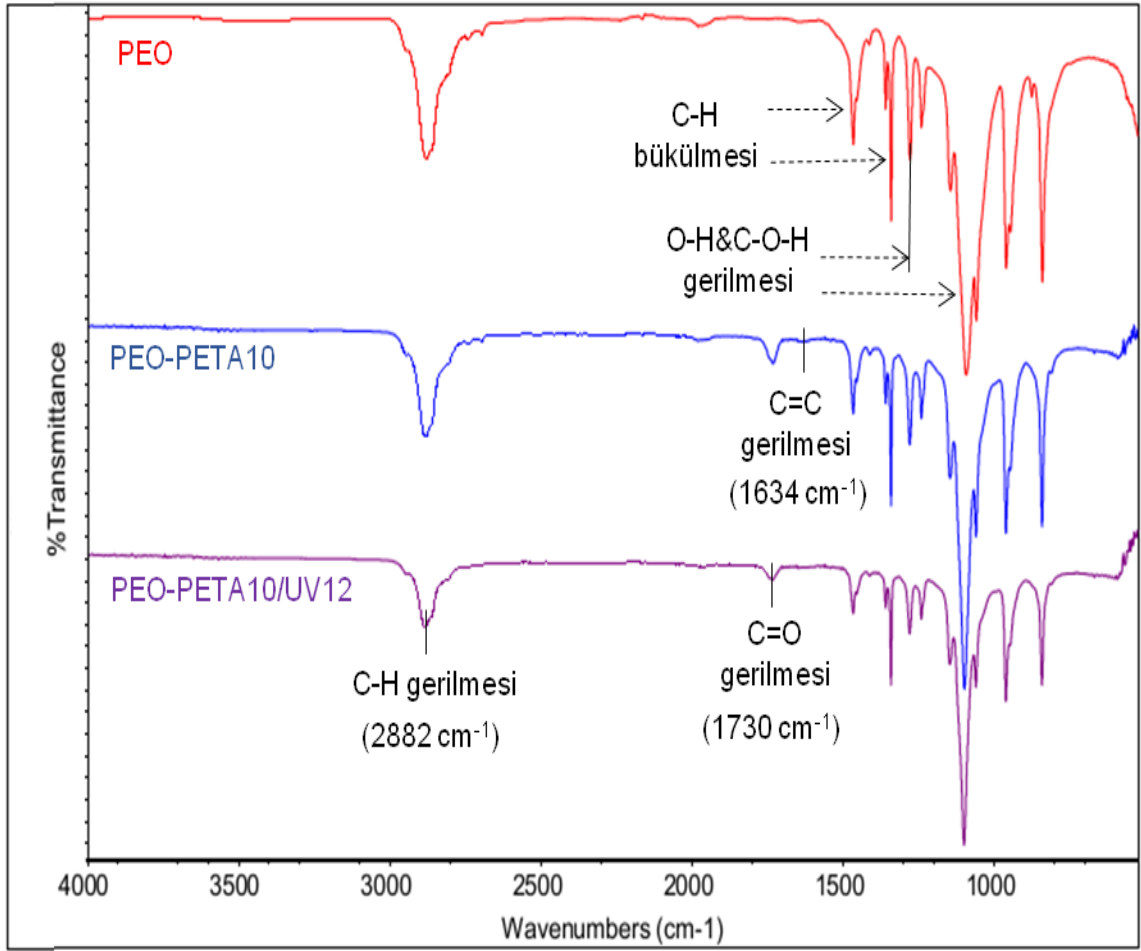
Literatürde yapılan çalışmalarda, benzofenon ve PETA kullanılarak gerçekleştirilen foto çapraz bağlama işlemleri oksijen tarafından sönmeyi engellemek amacıyla ya azot gazı varlığında ya da dinamik vakum ortamında gerçekleştirilmiştir [217, 218]. Bu tez çalışmasında, çapraz bağlama işlemi oda koşullarında gerçekleştirilerek başarılı şekilde sonuçlandırılmıştır. Yüksek molekül ağırlıklı PEO partiküllerinin izooktan ortamında, çapraz bağlayıcı bir ajan olarak PETA ve bir başlatıcı olarak organik peroksit kullanılarak radikal kimyasal reaksiyon ile çapraz bağlanabileceği bildirilmiştir [218]. Bu tez çalışmasında ise PEO fiberlerin UV olmadan da PETA ile doğrudan başarılı bir şekilde çapraz bağlanabildiği keşfedilmiştir. Bu durumun PETA'nın sadece bir fotobaşlatıcı olarak değil, aynı zamanda doğrudan bir çapraz bağlayıcı olarak da

davrandığını göstermektedir. Çözücü döküm yöntemiyle hazırlanan PEO filmlerle gerçekleştirilen bir çalışmada, tek yönlü olarak UV'ye maruz bırakılan filmlerin su varlığında rulo şeklinde katlandığı, fakat filmlerin her iki tarafına UV uygulandığında ise biçimini koruduğu belirtilmiştir [222]. Bu gözlem sonucunda, tek yönlü UV çapraz bağlanmanın tüm film boyunca homojen bir şekilde gerçekleşmediği ifade edilmiştir. Buna benzer olarak bu çalışmada, kuruma işleminin özellikle 1. ve 3. gününde, çapraz bağlı fiber örgülerin PBS'deki kararsız şişme davranışları çapraz bağlanmanın yapı içerisinde heterojen bir şekilde gerçekleştiğini düşündürmektedir. Kuruma süresinin 8 güne çıkması aşamasında PETA'nın fiberleri çapraz bağlamaya devam ettiği ve sıcaklığın bu süreci kısalttığı belirlenmiştir. Bu süre sonundaki fiber örgülerin sudaki kararlı davranışları çapraz bağlanmanın tüm yapı içerisinde homojen bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Fiber örgülerin yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde iki yönlü UV12 ile muamele edilmesi ise fiberlerin büzülme davranışında düzelmeye yol açmamıştır.

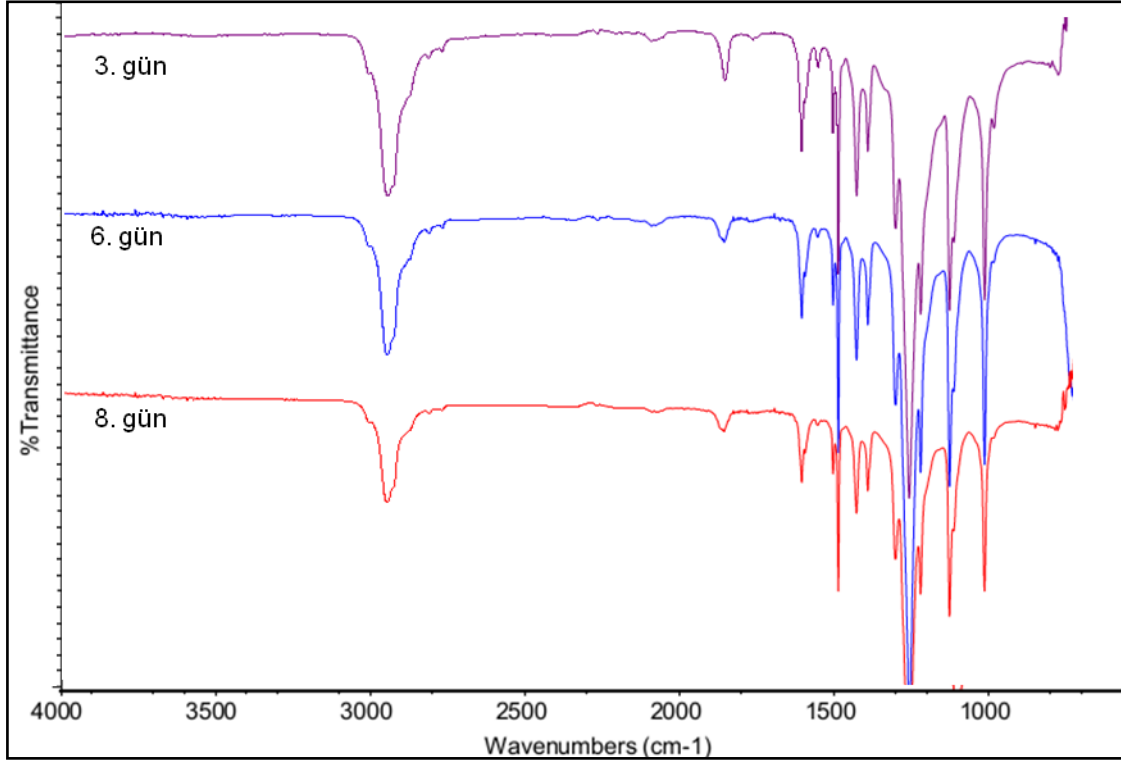
FTIR-ATR Analizi

37°C'de 8 gün boyunca kurutulmuş %10 PETA içeren fiberlerin yüzey karakterizasyonu FTIR-ATR analizi ile gerçekleştirilmiş ve aynı zamanda çapraz bağlanmanın hangi gruplar üzerinden yürüdüğü belirlenmeye çalışılmıştır. Şekil 4.44, saf PEO'ya, %10 PETA içeren PEO fiberlere (PEO-PETA10) ve UV12 uygulanmış %10 PETA içeren PEO fiberlere (PEO-PETA10/UV12) ait spektrumları göstermektedir. Saf PEO'ya ait CH₂ grubunun karakteristik piki C-H gerilmesine bağlı olarak 2882 cm⁻¹'de gözlenmektedir. PEO ile karşılaştırıldıklarında PEO-PETA10 ve PEO-PETA10/UV12 nanofiberlerin 1730 cm⁻¹'de C=O gerilmesine, 1634 cm⁻¹'de C=C gerilmesine bağlı karakteristik pikleri, PETA'nın nanofiber yapısına başarılı bir şekilde katıldığını göstermektedir. Çapraz bağlanma reaksiyonu sürecinde, PETA'nın PEO'dan bir proton almasıyla PETA'nın C=O bağı açılır ve PEO ve PETA radikalleri ortaya çıkar. PEO radikali PETA'nın C=C bağına hamle yaparak PETA'nın polimerizasyonunu başlatabilir veya PEO ve PETA radikalleri arasında çapraz bağlanma reaksiyonları gerçekleşir. PEO-PETA10/UV12 örneğindeki pik şiddetlerinin, UV12 uygulanmayanlara göre daha da düşmesi UV12 varlığında çapraz bağlanmanın daha etkin olduğunu göstermektedir. Radikallerin eşleşmesi sonucu sonlanan bu zincirler PEO ve PETA arasında çapraz bağlanmayı gerçekleştirir [219]. Çapraz

bağlanmanın devam eden süreçlerinde PEO'nun C-H geriliminde ve PETA'nın C=O geriliminde meydana gelen pik şiddetindeki azalma ile çapraz bağlanma süreci takip edilebilir. UV12 uygulanan örneklerde ilerleyen kuruma sürelerinde çapraz bağlanmanın devam ettiği, PETA'nın karakteristik piklerinin şiddetlerinin azalması ile takip edilebilmiştir (Şekil 4. 45). Bu durum bize, başlangıçta fiber yapı içerisinde yer alan heterojen çapraz bağların kuruma süresinin ilerleyen günlerinde artarak daha homojen bir şekilde yapıda yer aldığını göstermektedir. Bunun sonucu olarak, başlangıçta fiber örgülerde meydana gelen kararsız şişme davranışı kuruma sürecinin devam etmesiyle iyileşmiştir. Benzer durum UV12 ile muamale edilmemiş örneklerde de gözlenmiştir.



Şekil 4. 44. PEO, PEO-PETA10 ve PEO-PETA10/UV12 nanofiberlerin FTIR-ATR spektrumları



Şekil 4. 45. PEO-PETA10/UV12 nanofiberlerin kuruma sürelerine göre FTIR-ATR spektrumları

4.2.4. Çapraz Bağlı PEO Nanofiberler ile Titanyum Yüzeylerin Kaplanması ve Yüzey Karakterizasyonu

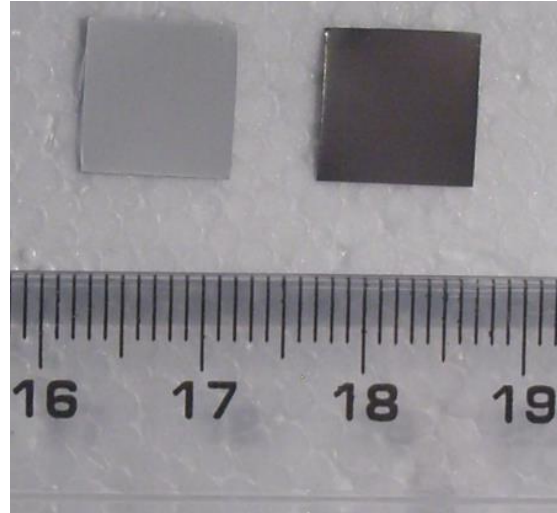
Biyomedikal uygulamalarda sıklıkla kullanılan titanyum (Ti) implantların kullanımına bağlı ortaya çıkardığı sorunların çözümüne yönelik olarak yüzeylerinin modifikasyonu için geliştirilmiş yöntemler Bölüm 2.2.2'de açıklanmıştır. Bu tez çalışmasında, implant yüzeylerinin PEO ile modifiye edilmesinde, alternatif ve pratik bir yaklaşım olarak elektroçirme kullanılarak Ti yüzeyler PEO nanofiberlerle kaplanarak modifiye edilmiştir. Doku mühendisliği araştırmalarında PEO genellikle diğer sentetik veya doğal polimer ile birleştirilerek eğilmektedir [223]. Özellikle molekül ağırlığı çok yüksek doğal polimerlerden fiber üretimindeki zorluğun aşılması amacıyla yapıya PEO katılarak elektroçirme işlemi rahatlıkla yapılabilmektedir [224]. Bu çalışmada, yalnızca PEO kullanılarak önceki bölümlerde belirtilen optimizasyon çalışmaları ışığında elektroçirme ile nanofiber üretimi gerçekleştirilmiş ve fiberlerin çap ve morfoloji açısından karakterizasyonu yapılmıştır. Ardından PEO fiberlerin çözünmelerini önlemek amacıyla UV12 varlığında PETA ile çapraz bağlama ve şişme deneyleriyle en uygun çapraz bağlanma koşulu belirlenmiştir. Ti yüzeyler %10 PETA (w/w) içeren %4'lük PEO

(w/v) (600,000 Da) çözeltisinden 18 kV, 23 cm ve 0.4 mL sa⁻¹ koşullarında üretilen nanofiberlerle 5 dakika boyunca kaplanmışlardır (Şekil 4.46). Son aşamada 8 gün boyunca 37°C'de kurutulan kaplanmış Ti yüzeylere UV12 kaynağı ile çapraz bağlama işlemi uygulanarak, devam eden çalışmalarda kullanılmak üzere örnekler hazır hale getirilmiştir. Ti yüzeylerin bir bölümü, hücresel davranışlara etkisinin ve kaplama kararlılığının tespiti amacıyla tek yönlü olarak zımparalanarak pürüzlendirilmiştir.

Çalışmalarda kullanılacak örnekler çizelgede 4.8'de belirtilen şekilde kodlanmışlardır.

Çizelge 4. 9. Çalışmalarda kullanılacak örnekler ve kısaltmaları

Kodlama	Açıklama
Ti-y	Yalın Ti (%99.98 saflıkta)
Ti-p	Yüzeyi pürüzlendirilmiş Ti
Ti-yPEOf	%10 PETA içeren PEO nanofiber kaplı yalın Ti
Ti-yPEOf/UV12	UV12 uygulanmış %10 PETA içeren PEO nanofiber kaplı Ti-y
Ti-pPEOf/UV12	UV12 uygulanmış %10 PETA içeren PEO nanofiber kaplı Ti-p



Şekil 4. 46. PEO fiber kaplanmış (sol) ve kaplanmamış (sağ) Ti-y implantlara ait görüntüler

4.2.4.1. SEM ve AFM analizleri

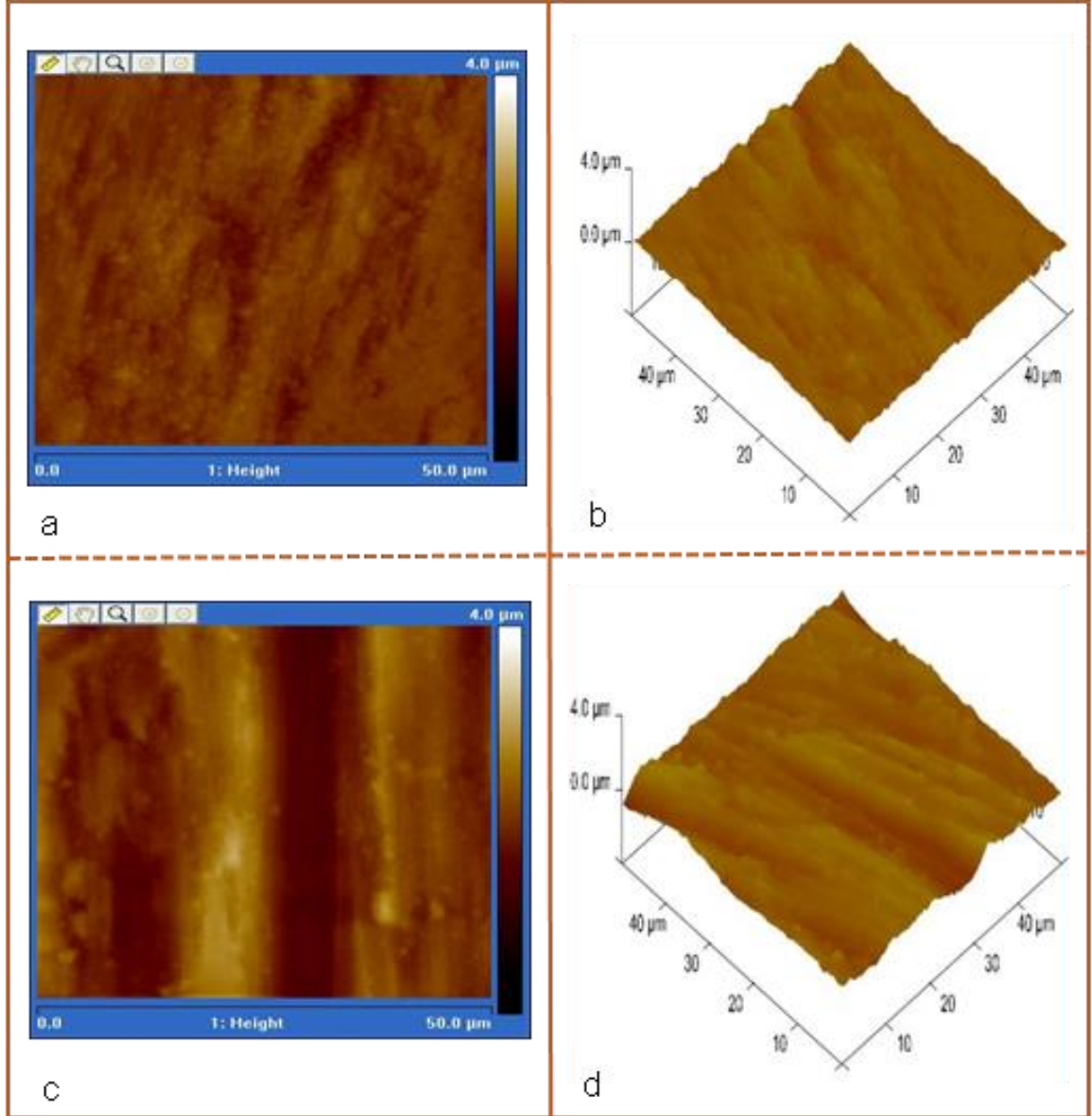
Malzemelerin yüzey topografilerinin incelenmesi amacıyla AFM ve SEM teknikleri kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Ti-y yüzeylerin pürüzlendirilmesinden

sonra elde Ti-p yüzeylerin AFM analizi ile elde edilmiş yüzey topografisi Şekil 4.47'de Ti-y yüzeyler ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Her iki yüzey karşılaştırdığında Ti-y yüzeylerin Ti-p yüzeylere göre daha düz bir yapıya sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.47 a ve b). Tek yönlü zımparalanmanın yarattığı yüzey morfolojisindeki değişim yüzey pürüzlülüğünün artmasına yol açmıştır (Şekil 4.47 c ve d). Pertometre ile yapılan yüzey pürüzlülük ölçümleri de ortaya çıkan pürüzlülük artışını ortaya çıkarmaktadır. Ti-y ve Ti-p yüzeylerin pürüzlülükleri sırasıyla $0.18 \pm 0.008 \mu\text{m}$ ve $0.28 \pm 0.028 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür.

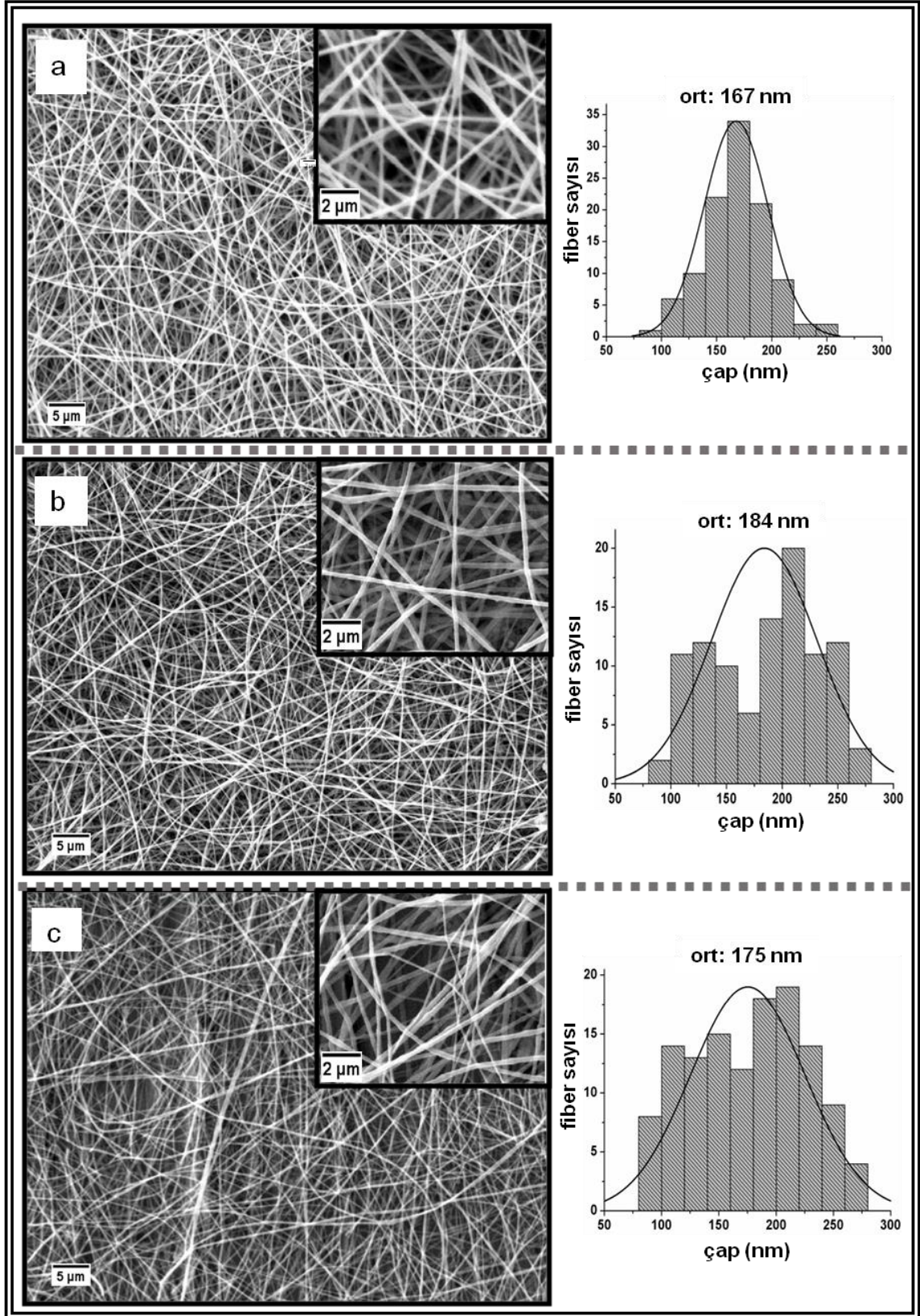
Ti-y ve Ti-p yüzeylere kaplanmış fiberlerin fiziksel yapısına UV12'nin etkisi SEM analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4. 48). Ti yüzeylere toplanan nanofiberlerin SEM görüntülerinden çap değerleri 8 günlük kuruma sürecinden sonra, Ti-yPEOf için $167 \pm 29 \text{ nm}$, Ti-yPEOf/UV12 için $184 \pm 48 \text{ nm}$ ve Ti-pPEOf/UV12 için ise 175 ± 50 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4. 48 a-c). UV12 uygulanan yüzeylerdeki fiber çapları önemli bir değişim göstermemekle birlikte (Şekil 4. 48 b ve c), UV12 uygulanmayan nanofiberlere (Şekil 4. 48 a) göre bir miktar artmıştır. Bu artışın PETA'nın yapıya eklenmesi ile viskozitenin artmasına bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Ayrıca Ti-yPEOf yüzeylerde daha homojen çap dağılımına sahip fiberler bulunmaktadır. Bunlara ek olarak, tüm yüzeylerdeki fiberlerde morfolojik açıdan belirgin bir farklılık görülmemiştir.

Ti-y ve Ti-p yüzeylerdeki fiberlerin AFM görüntüleri (Şekil 4.49 a ve b), SEM sonuçlarına paralel olarak morfolojik olarak fiberlerde bir belirgin bir farklılık olmadığını doğrulamaktadır. Yüzey pürüzlülüğünün artmasına bağlı olarak Ti-p yüzeylerdeki fiberlerde inişli çıkışlı dalgalanmalar göze çarpmaktadır. Bu durum yüzey üzerinde tutunan nanofiberlerin yüzey pürüzlülüğünden etkilendiğini açıkça göstermektedir. İmplant yüzeylerdeki fiberlerin kültür ortamında, yüzey üzerinde kararlı bir yapı sergileyip sergilemediklerinin anlaşılması amacıyla, Ti-yPEOf/UV12 ve Ti-pPEOf/UV12 örnekleri distile su ortamında (37°C) bekletilmişlerdir. 24 saat sonra ortamdaki çıkarılan örnekler oda sıcaklığında kurutulup, yüzey morfolojileri SEM ve AFM ile incelenmiştir. Şekil 4.49 (c ve d) ve (e ve f)'deki görüntüler incelendiğinde, fiberlerin su ortamında şişip birbirleriyle kaynaştıkları ve yüzeyi düz bir membran formunda kapladıkları görülmektedir. Bu durum yüzey ile etkileşecek hücrelerin ve bakterilerin implantlar ile etkileşimlerini bütünüyle kesecek bir ortam sağlaması açısından önemlidir. Kuruma sonrası fiberlerin tekrar eski fiziksel

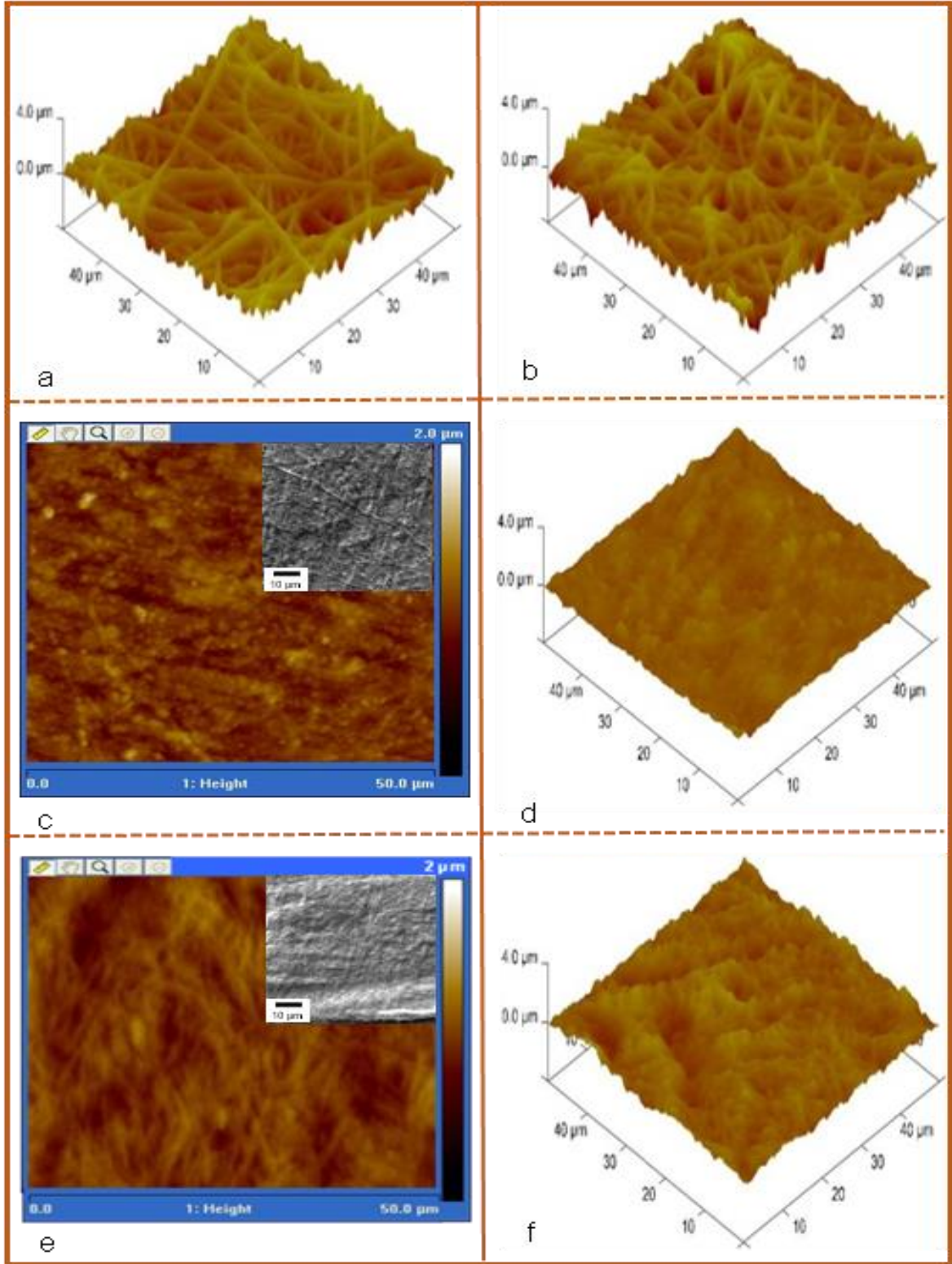
formuna dönmediği görülmektedir ki, bu da bize fiberlerin tersinir olmayan bir şişme davranışı sergilediklerini göstermektedir. Pürüzlendirmeye bağlı olarak fiber kaplamanın yüzey üzerinde daha kararlı bir yapı oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.49 e ve f). Pürüzlendirilmiş yüzeyler üzerinde nanofiberler için daha fazla temas noktası oluşmuş ve bu da fiberlerin yüzeye daha iyi tutunmasını sağlamıştır.



Şekil 4. 47. (a, b) Ti-y ve (c, d) Ti-p yüzeylerin AFM görüntüleri. (a, c) 2 boyutlu ve (b, d) 3 boyutlu görüntüler



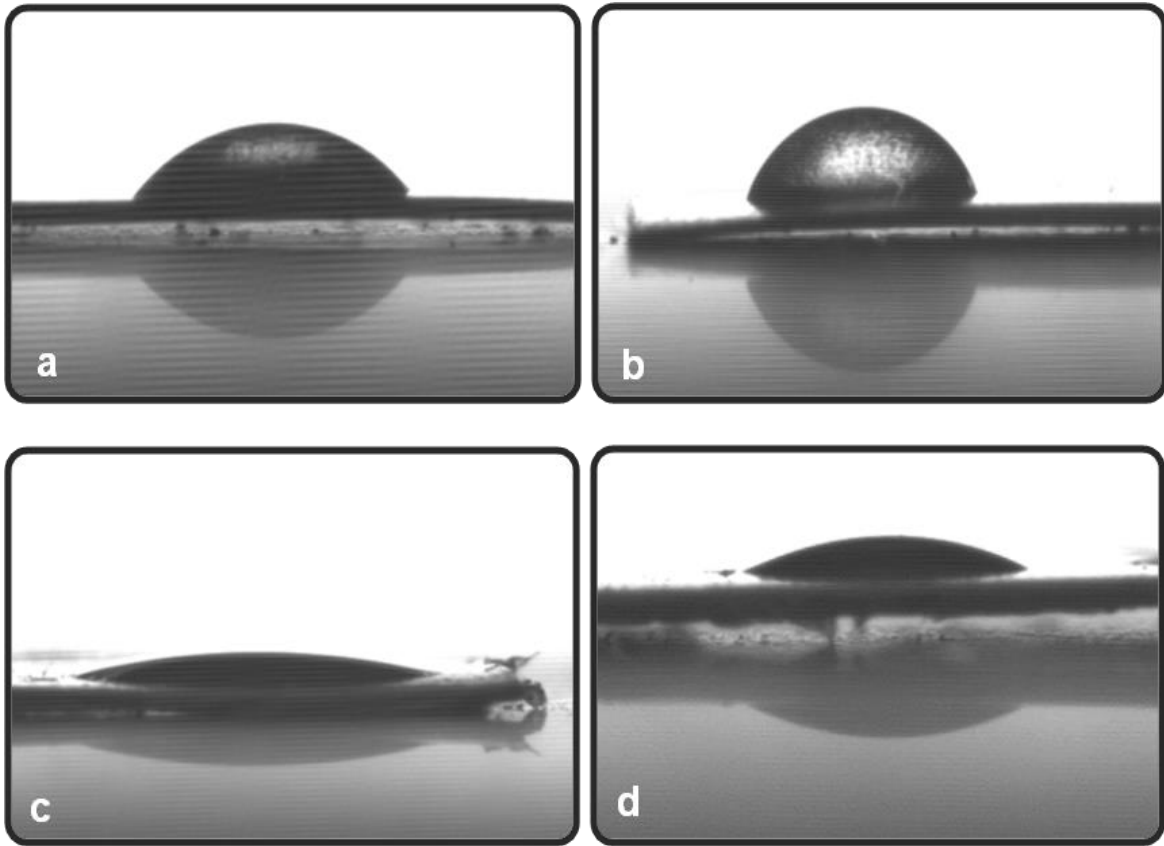
Şekil 4. 48. Ti yüzeylerdeki PEO nanofiberlerin SEM görüntüleri (5 KX, sağ üst görüntüler 30 KX) ve bu nanofiberlere ait çap dağılımları. a) Ti-yPEOf, b) Ti-yPEOf/UV12 ve c) Ti-pPEOf/UV12



Şekil 4. 49. PEO nanofiber kaplı titanyum yüzeylerin AFM ve SEM görüntüleri. a) Ti-yPEOf/UV12, b) Ti-pPEOf/UV12 (3-boyutlu); 24 saat şişme sonrası Ti-yPEOf/UV12 c) 2-boyutlu (sağ üst SEM görüntüsü), d) 3-boyutlu görüntü; 24 sa şişme sonrası Ti-pPEOf/UV12 e) 2-boyutlu (sağ üst SEM görüntüsü) ve f) 3-boyutlu

4.2.4.2. Su temas açısı ölçümleri

PEO nanofiber kaplanmış ve kaplanmamış yüzeylerde yapışık damla metodu kullanılarak gerçekleştirilen su temas açısı ölçümleri sonucunda elde edilen sonuçlar Ti-y için $49.1^{\circ} \pm 2.7^{\circ}$, Ti-p için $64.5^{\circ} \pm 4.7^{\circ}$, Ti-yPEOf/UV12 için $12.0^{\circ} \pm 2.6^{\circ}$, Ti-pPEOf/UV12 için ise $20.0^{\circ} \pm 2.1^{\circ}$ olmuştur. Yüzeyin pürüzlendirilmesi ile ortaya çıkan su temas açısındaki artış Ti-p yüzeylerin Ti-y yüzeylere göre daha hidrofobik olmasına yol açmıştır (Şekil 4.50 a ve b). Hidrofobisitede ortaya çıkan buna benzer bir artış yüzeylerin nanofiberler kaplanması sonrasında da ortaya çıkmıştır (Şekil 4.50 c ve d).



Şekil 4. 50. a) Ti-y, b) Ti-p, c) Ti-yPEOf/UV12 ve d) Ti-pPEOf/UV12 yüzeylerindeki su damlasına ait fotoğraflar (t=0)

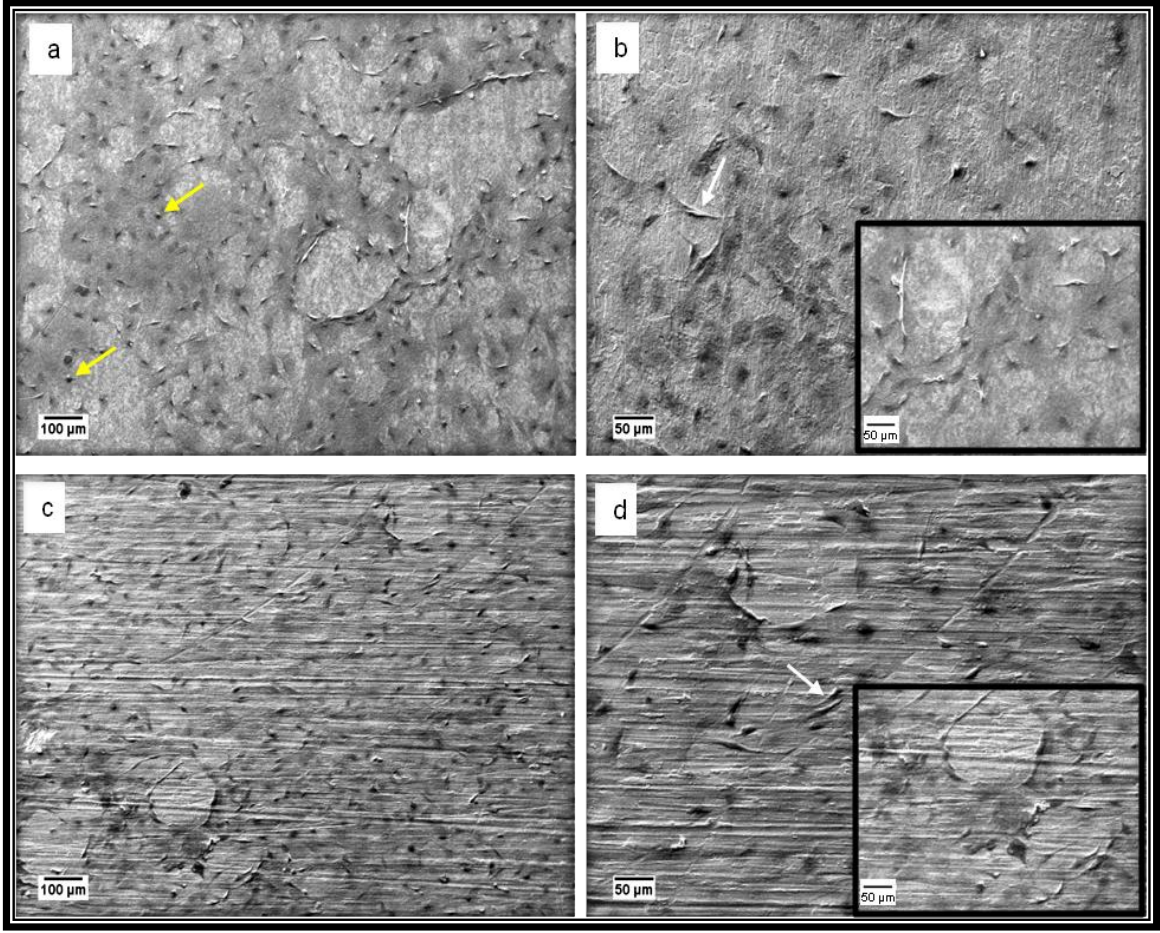
4.2.4.3. Hücre/bakteri kültürü çalışmaları

MC3T3-E1 hücrelerinin ve *S. epidermidis* bakterilerinin titanyum yüzeylerde 4 saatlik inkübasyon sonrası tutunma davranışları SEM analizi ile belirlenmeye çalışmıştır. Aynı zamanda hücrelerin 4, 24 ve 48 saat sonundaki üreme davranışları MTT analizi ile takip edilmiştir. Yüzey modifikasyonunun hücre/bakteri yapışmasına etkisi üzerine elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

i. MC3T3-E1 hücrelerinin üreme ve yapışma davranışlarının incelenmesi

4 saatlik inkübasyon periyodu sonunda elde edilen SEM görüntülerinden, hücrelerin Ti-y yüzeyler üzerine tutunduğu gözlenmektedir (Şekil 4.51 a ve b). Aynı zamanda hücrelerin sitoplazmik uzantıları aracılığı ile Ti-y yüzey üzerinde yayılmaya başladığı da görülmektedir (Şekil 4.51 b). Yüzeylerde, küresel formdaki hücrelerin yanı sıra fibroblastik morfolojiyi kazanmış hücrelerin varlığı da görülmektedir. Küresel morfolojiye sahip hücreler, yüzeye henüz tutunma gerçekleştirememiş olan hücrelerdir. Ti-p yüzeylerdeki hücre morfolojisi incelendiğinde ise, hücre morfolojisinin küresel formdan uzaklaştığı gözlenmektedir (Şekil 4.51 c ve d). Hücrelerin Ti-p yüzeylere daha fazla tutunma eğilimi göstermesinin nedeni olarak, Ti-p yüzeyindeki pürüzlendirmeye bağlı topografik değişim gösterilebilir. Hücrelerin bu davranışı, yüzeye tutunmada pürüzlülüğünün önemini ortaya çıkmaktadır. Hücre yoğunluğu bakımından da, Ti-p yüzeylerde Ti-y yüzeylere göre daha fazla sayıda hücre olduğu görülmektedir. Yüzey pürüzlülüğünün MC3T3-E1 hücrelerinin tutunma eğilimini artırması nedeniyle, yıkama işlemi sonrasında Ti-p yüzeyinde kalabilen hücre sayısı Ti-y yüzeylere göre daha fazla olmuştur.

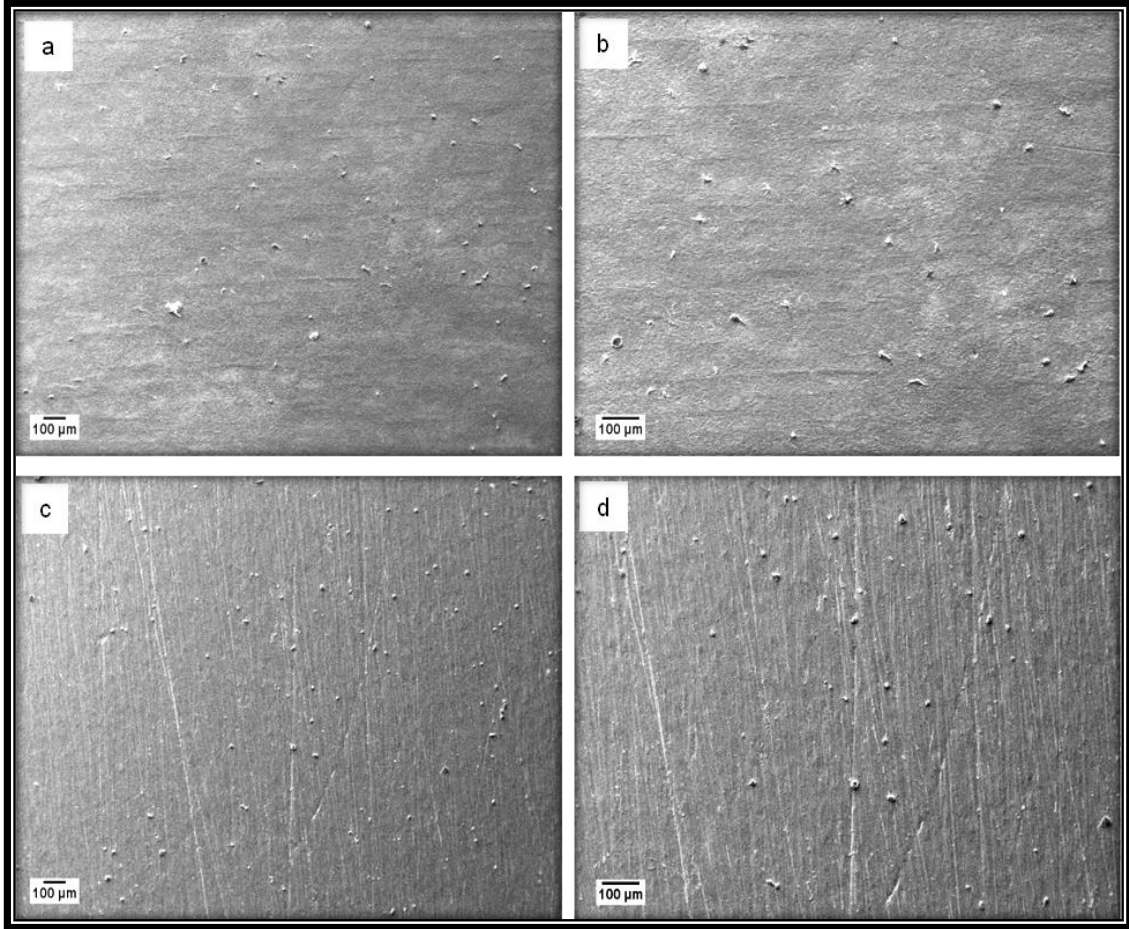
Literatürde yapılan çalışmalarda, yüzey pürüzlülüğünün osteoblast farklılaşmasını, çoğalmasını ve matris üretimini etkilediği gösterilmiştir [225, 226]. Neoh ve ark. [227] tarafından yapılan bir çalışmada, Ti yüzeylerdeki farklı yüzey pürüzlülüğünün, osteoblast hücrelerinin Ti yüzeylere yapışmasına farklı düzeyde etkisi olmuş, daha pürüzlü yüzeylerde osteoblast yapışmasının daha fazla olduğu bildirilmiştir. Yüzey pürüzlülüğünün hücre yapışmasına etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada ise, bir grup Ti implantın yüzeyi kum püskürtme ve asitle dağlama işlemiyle, diğer bir grubun yüzeyi ise zımparalama ile çizikler oluşturularak pürüzlendirilmiştir [228]. Çizikli yüzeyin, kumlama ve asitle dağlama yapılan yüzeye göre daha iyi hücre bağlanması gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise düz, pürüzlü ve gözenekli Ti yüzeylere kültüre edilen osteoblastların Ti yüzeylere sıkı bir şekilde yapıştığı, ECM sentezi ve sonrasında mineralizasyonun pürüzlü ve gözenekli yüzeylerde önemli derecede arttığı gösterilmiştir [229].



Şekil 4. 51. (a, b) Ti-y ve (c, d) Ti-p yüzeylerdeki MC3T3-E1 hücrelerinin 4 saat inkübasyon sonrası SEM görüntüleri; sarı oklar küresel morfolojideki hücreleri, beyaz oklar ise yayılmaya başlayan hücreleri göstermektedir (a ve c 250X; b ve d 500X (sağ alt görüntüler 750X))

Ti yüzeylerinin kaplanarak fiberlerin çapraz bağlanması sonrasında elde edilen Ti-yPEOf/UV12 ve Ti-pPEOf/UV12 yüzeylerde hücresel yoğunluk bakımından kaplanmamış yüzeylere göre belirgin bir azalma gözlenmektedir (Şekil 4.52). Hücrelerin hem birbiri ile hem de üzerinde buldukları yüzey ile etkileşimi, hücre-hücre ve hücre-malzeme arasında gerçekleşen sitoplazmik bağlantılar aracılığı ile olmaktadır. Tutundurucu bağlantı birimleri adı verilen bu birimler, bir hücrenin iskeletini komşu hücrenin iskeletine ve/veya yüzey üzerine bağlayarak hücrenin yerini sağlamlaştırır. PEO nanofiberler ile kaplama yapılan Ti yüzeylerde, ilk 4 saatlik hücre kültürü sonunda gözlenen küresel hücre morfolojisi ve yüzeylerde oldukça az sayıdaki hücrenin varlığı, yüzey üzerinde hücre yapışmasında etkili olan etkileşimlerin sağlanmadığını göstermektedir (Şekil 4.52 a-d). Yüzeylerde birkaç hücrenin tutunma belirtisi olarak çok az miktarda sitoplazmik uzantı

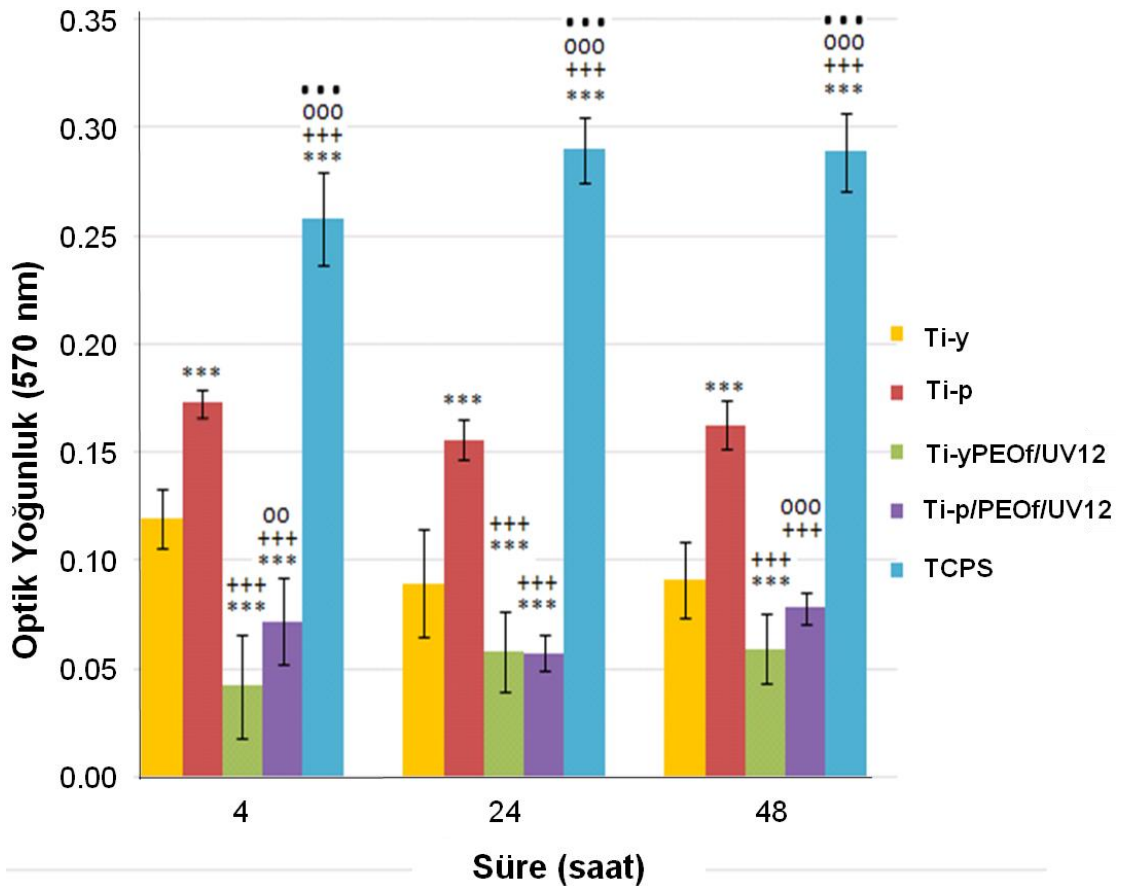
oluşturduğu görülsede de tam bir yapışmanın belirtisi olan geniş sitoplazmik yayılma görülmemektedir. Bu doğrultuda, hücrelerin küresel morfolojide kalması ve sayıca azlığı, PEO fiber kaplamanın hücre tutunması ve yapışmasını azaltıcı yönde etkilediğini göstermektedir. İmplant yüzeyine kaplanan PEO fiberlerin polimer zincirlerinin sterik bir itme uygulayarak yüksek bir bariyer göstermesi ve aynı zamanda yüksek derecede su etkileşimi sonucu ortaya çıkan osmotik itme sonucunda hücresel yapışma azalmıştır.



Şekil 4. 52. (a, b) Ti-yPEOf/UV12 ve (c, d) Ti-pPEOf/UV12 yüzeylerdeki MC3T3-E1 hücrelerinin 4 saat inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (a ve c 150X, b ve d 250X)

Tüm yüzeylere preosteoblast hücrelerinin ekimini izleyen ilk 4 saatlik inkübasyon sonunda alınan MTT absorpsanları, yüzeyler üzerinde hücresel aktivitenin devam ettiğini göstermektedir (Şekil 4.53). Ayrıca Ti-y ve Ti-p yüzeylerden elde edilen MTT değerleri karşılaştırıldığında; Ti-p yüzeylerdeki mitokondriyal aktivitenin Ti-y yüzeylere göre daha yüksek olması, pürüzlendirmeye bağlı olarak hücrelerin yüzeye daha kısa sürede uyum sağlaması ve metabolik aktivitelerini Ti-y

yüzeylerdeki hücelere göre daha fazla arttırması şeklinde yorumlanabilir. Bu durum, topografik detayların hücre-yüzey etkileşimi açısından önemini ortaya koymaktadır. Ti-yPEOf/UV12 ve Ti-pPEOf/UV12 yüzeyler üzerindeki hücresel aktivite değerlendirildiğinde ise, bu yüzeyler üzerinde kaplama yapılmayan yüzeylere göre hücresel aktivitenin gerilemesine bağlı olarak MTT absorbansında belirgin bir ölçüde azalma meydana gelmiştir. PEO fiberler yüzeylerde hidrofilitiyi arttırarak hücre tutunmasını azaltıcı etki göstermiştir. Bu yüzeylerden alınan düşük miktardaki MTT değeri, yıkama işleminden sonra yüzeyde kalan az miktardaki hücreden alınan değerdir. Ti-yPEOf/UV12 yüzeyler ile Ti-pPEOf/UV12 yüzeyler arasındaki MTT absorbansları değerlendirildiğinde, pürüzlendirmeye bağlı ortaya çıkan Ti yüzey topografisindeki değişim, nanofiberlerin yüzey üzerindeki topografisini de değiştirmiş ve hücrelerin yüzey üzerindeki aktiviteleri Ti-p yüzeylere benzer şekilde arttırmıştır.



Şekil 4. 53. MTT analizi ile Ti-y, Ti-p, Ti-yPEOf/UV12, Ti-pPEOf/UV12 ve TCPS yüzeylerdeki hücre canlılığının takibi (İstatistiksel anlam farklılığı, n=3 *** p<0.001 (Ti-y kontrol grubudur); +++ p<0.001 (Ti-p kontrol grubudur); ooo p<0.001 (Ti-yPEOf/UV12 kontrol grubudur); ** p<0.001 (Ti-pPEOf/UV12 kontrol grubudur))

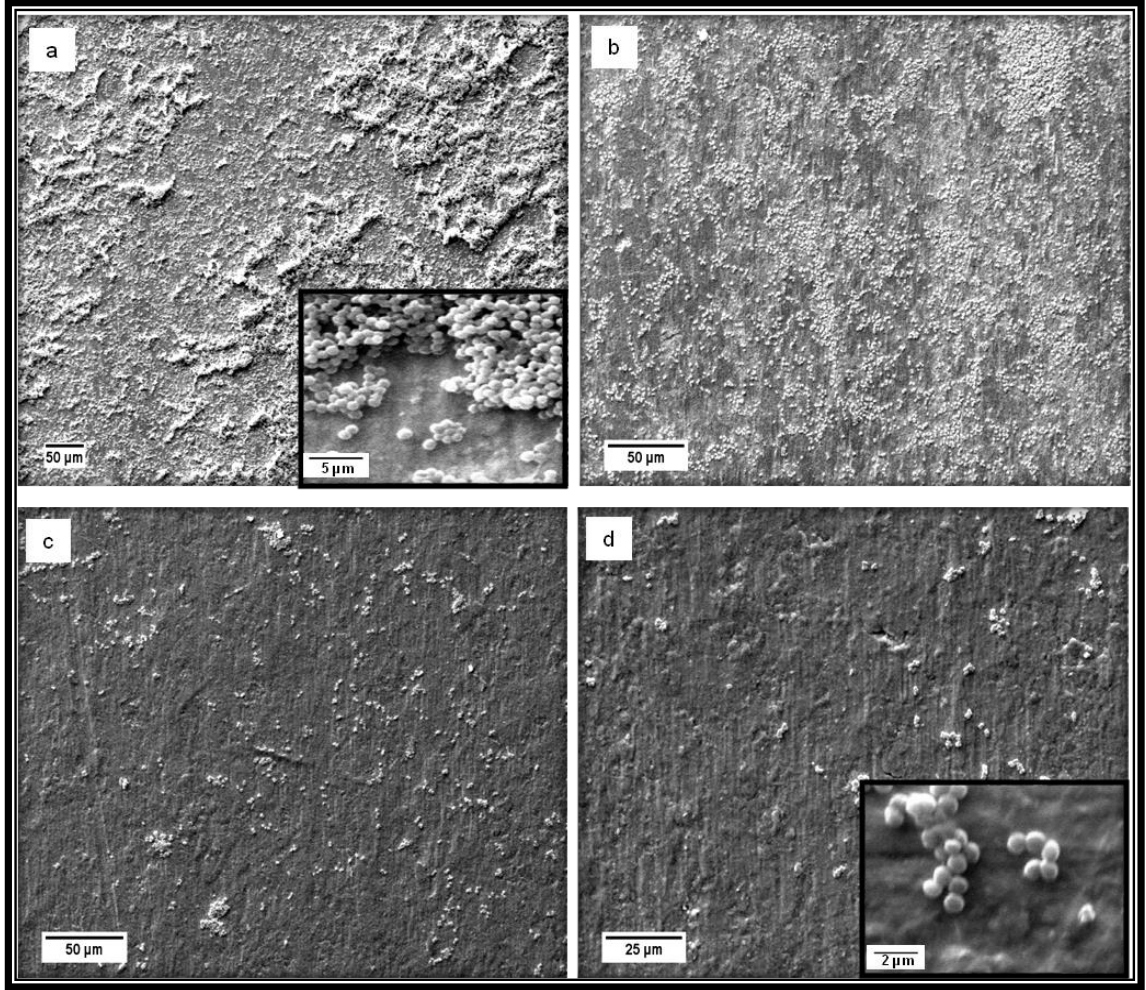
24 ve 48 saatlik inkübasyon sonundaki MTT sonuçları değerlendirildiğinde; yüzey pürüzlülüğünün hücresel aktiviteye olan etkisi, ilk 4 saatlik inkübasyonda görülen hücresel aktiviteye benzer şekilde devam etmiştir. PEO fiber kaplı yüzeyler ise, hücresel aktiviteyi kaplanmamış olanlara göre düşük tutmayı sürdürmektedir.

ii. S. epidermidis bakterilerinin üreme ve yapışma davranışlarının incelenmesi

Ti ve alaşımları sahip oldukları mükemmel özellikleri nedeniyle ortopedik ve dişçilik uygulamalarında implant malzemeleri olarak geniş çapta kullanılmaktadır. Ti implantların kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan enfeksiyona bağlı sorunların önüne geçebilmek amacıyla antibiyotiklerin kullanılması, zamanla *S. epidermidis* gibi antibiyotiğe dirençli organizmaların gelişimine ve yayılmasına yol açabilmektedir [182]. Bu bakımdan, son dönemdeki çabalar antibiyotiğe bağımlı olmayan, fakat mikrobiyal kolonileşme sürecini engellemeyi amaçlayan yüzeylerin elde edilmesine odaklanmıştır. Tez çalışmasının devam eden bu bölümünde, PEO fiber kaplamanın bakteri tutunması üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla Ti-y ve Ti-yPEOf/UV12 yüzeylerde, biyofilm oluşturan *S. epidermidis* türü kullanılarak bakteri kültürü çalışmaları yapılmıştır.

24 saatlik kültür periyodu sonunda, örnekler SEM ile görüntülenmiştir (Şekil 4.54). Yıkama prosedürü sonrasında yüzeyde kalan bakteri yoğunluğunun fazlalığı dikkat çekicidir. İnkübasyon sonunda Ti-y yüzeyleri bakteri yoğunluğu açısından değerlendirildiğinde, bakterilerin yüzey üzerine tutunarak tüm yüzeyi kapladığı ve üremeye devam ettiği görülmektedir (Şekil 4.54 a ve b). Yüzey üzerinde bakterilerin koloniler halinde yığın yapılar oluşturmak suretiyle yüzeyi kapladığı görülmektedir. Bakteri hücrelerinin bu şekilde yığınlar oluşturarak üremesinin, yüzeyde biyofilm oluşumunun varlığına işaret ettiği belirtilmektedir [230].

Ti-yPEOf/UV12 yüzeylerin SEM görüntüleri incelendiğinde, PEO fiberlerin bakteri tutunmasını önemli ölçüde azaltıcı etki gösterdiği görülmektedir (Şekil 4. 54 c ve d). Bakterilerin yapışma davranışlarındaki bu azalmanın, daha önce ifade edildiği gibi PEO fiberlerin sterik itmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. PEO fiber kaplı yüzeylerdeki bakteri yoğunluğu, Ti yüzeylerdeki bakteri yoğunluğuna göre oldukça azdır. Örnek yüzeylerinde inkübe edilen bakterilerin üremeye devam ettiği düşünüldüğünde, yeni oluşan kolonilerin Ti-yPEOf/UV12 yüzeyler üzerinde kalıcı olamayacağı ifade edilebilir.



Şekil 4. 54. (a, b) Ti-y (x500 (sağ alt görüntü 15 KX), 1 KX) ve (c, d) Ti-PEOf/UV12 (1 KX, 2 KX (sağ alt görüntü 30 KX)) yüzeylerindeki *S. epidermidis* bakterilerinin 24 saat inkübasyon sonrası SEM görüntüleri

Literatürde elektroğirmiş fiberler ile Ti yüzeylerin kaplanmasına yönelik sınırlı sayıda çalışma mevcut olmasının yanında saf PEO fiberlerle kaplanan yüzeylerde hücresel yapışmanın incelendiği bir çalışma mevcut değildir. Bir çalışmada, gentamisin yüklü PEO/poli(laktid-ko-glikolik asit) elektroğirmiş fiberlerle kaplı Ti implantların kaplanmamış olanlara göre önemli ölçüde *S. aureus* yapışmasını azalttığı belirlenmiştir [231]. Başka bir çalışmada, Ti diskler elektroğirmiş PLGA veya PLGA/kollajen fiberlerle kaplanmış ve ayrıca fiber örgülere nanohidroksiapatit biriktirilerek bu yüzeyler üzerinde hücresel davranışlar incelenmiştir [232]. Hücre yapışmasının ve çoğalmasının hidroksiapatit biriktirilmiş PLGA/kollajen fiberlerde daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Gatti ve ark. [233] tarafından yapılan bir çalışmada ise elektroğirmiş antimikrobiyal peptid LL-37 içeren PEO nanofiber örgülerin *Escherichia coli* üremesine karşı etkili olduğu belirtilmiştir.

Biyomalzemelerin vücut ile ilk etkileşimlerinin hemen sonrasında plazma proteinlerinin yüzeye tutunması, tutunmaya etki eden diğer parametrelerin yanında spesifik hücre/bakteri-malzeme etkileşimi açısından da önemlidir. Yüzey üzerinde oluşan bu protein tabakası bakteriyel yapışmayı da tetikleyecektir. Ti implantlarda bakteriyel enfeksiyonun oluşmasını engellemek amacıyla kullanılan PEO/PEG tabanlı kaplamalar, aynı zamanda bakteriyel enfeksiyonu tetikleyen protein adsorpsiyonunun azaltılmasında da bakteri/hücre yapışmasını engelleyici mekanizmalar yoluyla etkili olmaktadır. Malzeme-bakteri/hücre etkileşimlerinin daha detaylı aydınlatılmasında, tutunma-yapışma gibi yaşamsal olaylarda rol oynayan süreçlerin belirlenebilmesi açısından daha ileri araştırmalar gerekmektedir. Ayrıca Bölüm 2.2.2.3'de açıklanan çalışmalara benzer olarak, Ti yüzeylerin bakteri/protein dirençli olmasının yanında doku ile de tam uyumlu olması beklenir. Bir implantın doku ile tam uyumu, ilgili doku ile tam entegrasyonu ile mümkün olabilmektedir. Bu bakımdan, Ti implantlar bir yandan bakterilere karşı direnç gösterirken diğer yandan da hücresel bütünleşmeyi teşvik etmelidirler. Bu yüzden implantların doku ile entegrasyonunun artırılması için çeşitli ek yüzey modifikasyonlarına ihtiyaç vardır. Dahası implantların vücut içi ortamda uygulanabilirliğinin araştırılması da uzun dönemli kullanılacak implantların başarısında kritik bir gerekliliktir.

Sunulan bu tez çalışmasında, Ti yüzeyler ekstra bir modifikasyon işlemine ihtiyaç duyulmadan, sahip olduğu birçok avantajı ile öne çıkan elektroçirme tekniği kullanılarak modifiye edilmişlerdir. Bu amaçla hücre/bakteri/protein yapışmasını engellediği iyi bilinen PEO'dan nanofiberler üretilerek bu fiberlerle implant yüzeylerinde kararlı bir kaplama elde edilmiş ve bu kaplamanın bakteri/memeli hücre tutunması üzerinde azaltıcı yönde bir etki gösterdiği belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular ışığında, uygulanması basit bir teknik olan elektroçirme tekniğinin polimerik yüzeylerde istenilen özellikte desenlerin oluşturulmasında kullanılabileceği ve desenlenen yüzeylerin hücresel davranışları etkileyebileceği belirlenmiş, nanotopografinin kontrol edilmesi ile doku mühendisliği kapsamında daha işlevsel biyomalzemelerin üretilebileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, implanta bağlı enfeksiyonların azaltılması veya engellenmesi amacıyla, elektroçirme tekniğinin implant yüzeylerin kaplanmasında ek bir modifikasyon işlemine ihtiyaç duyulmaksızın kullanılabileceği yorumu yapılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Yang, Y., Leong, K.W., Nanoscale surfacing for regenerative medicine, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2, 478-495, **2010**.
- [2] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., *Molecular Biology of The Cell*, Garland, New York, **1994**.
- [3] Kim, Y., Seo, S., Moon, H., Yo, M., Park, Y., Kim, B., Cho, C., Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications, *Biotechnology Advances* 26, 1-21, **2008**.
- [4] Khor, E., Lim, L.Y., Implantable applications of chitin and chitosan, *Biomaterials*, 24, 23-39 **2003**.
- [5] Çapkın, M., Çakmak, S., Kurt, F.Ö., Gümüşderelioğlu, M., Şen, B.H., Türk, B.T., Deliloğlu G.S.İ., Random/aligned electrospun PCL/PCL-collagen nanofibrous membranes: comparison of neural differentiation of rat AdMSCs and BMSCs, *Biomedical Materials*, 7, 045013, **2012**.
- [6] Lord, M.S., Foss, M., Besenbacher, F., Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response, *Nano Today*, 5, 66-78, **2010**.
- [7] Sill, T.J., von Recum, H.A., Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials*, 29, 1989-2006, **2008**.
- [8] Chua, P.H., Neoh, K.G., Kang, E.T., Wang, W., Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion, *Biomaterials*, 29, 1412-1421, **2008**.
- [9] Harris, L.G., Tosatti, S., Wieland, M., Textor, M., Richards, R.G., Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly (l-lysine)-grafted-poly (ethylene glycol) copolymers, *Biomaterials*, 25, 4135-4148, **2004**.
- [10] Desai, N.P., Hossainy, S.F.A., Hubbell, J.A., Surface-immobilized polyethylene oxide for bacterial repellence, *Biomaterials*, 13, 417-420, **1992**.
- [11] Bjorling, M., Interaction between surfaces with attached poly(ethylene oxide) chains, *Macromolecules*, 25, 3956-3970, **1992**.
- [12] Gümüşderelioğlu, M., Maviş, M., Karakeçili A., Kahraman, S.A., Çakmak, S., Tıǧlı, S., Demirtaş, T.T., Aday, S., Doku Mühendisliğinde Nanoteknoloji, *Bilim ve Teknik: Yeni Ufuklara*, 1-12, **2007**.
- [13] Anselme, K., Davidson, P., Popa, A.M., Giazzon, M., Liley, M., Ploux, L., The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale, *Acta Biomaterialia*, 6, 3824-3846, **2010**.
- [14] Blitterswijk, V.C., Tissue Engineering, *Academic Press Series in Biomedical Engineering*, A, **2008**.
- [15] Demir, A., Seventekin N., Kitin, kitosan ve genel kullanım alanlari, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3, 92-103, **2009**.

- [16] Knaul, J.Z., Hudson, S.M., Creber, K.A.M., Crosslinking of chitosan fibers with dialdehydes: Proposal of a new reaction mechanism, *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 37, 1079-1094, **1999**.
- [17] Vílchez, S., Jovancic, P., Manich, A.M., Julià, M.R., Erra, P., Chitosan Application on Wool Before Enzymatic Treatment, *Journal of applied polymer science*, 98, 1938-1946, **2005**.
- [18] Chung, T.W., Lu, Y.F., Wang, S.S., Lin, Y.S., Chu, S.H., Growth of human endothelial cells on photochemically grafted Gly-Arg-Gly-Asp (GRGD) chitosans, *Biomaterials*, 23, 4803-4809, **2002**.
- [19] Francis Suh, J.K., Matthew, H.W.T., Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, *Biomaterials*, 21, 2589-2598, **2000**.
- [20] Muzzarelli, C., Muzzarelli, R.A.A., Natural and artificial chitosan–inorganic composites, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92, 89-94, **2002**.
- [21] Mizuno, K., Yamamura, K., Yano, K., Osada, T., Saeki, S., Takimoto, N., Sakurai, T., Nimura, Y., Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 64, 177-181, **2003**.
- [22] Chupa, J.M., Foster, A.M., Sumner, S.R., Madihally, S.V., Matthew, H.W.T., Vascular cell responses to polysaccharide materials: in vitro and in vivo evaluations, *Biomaterials*, 21, 2315-2322, **2000**.
- [23] Tıǧlı, R.S., Karakeçili, A. Gümüşderelioǧlu, M., In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1665-1674, **2007**.
- [24] Haipeng, G., Yinghui, Z., Jianchun, L., Yandao, G., Nanming, Z., Xiufang, Z., Studies on nerve cell affinity of chitosan-derived materials, *Journal of Biomedical Materials Research*, 52, 285-295, **2000**.
- [25] Lee, J.E., Kim, K.E., Kwon, I.C., Ahn, H.J., Lee, S.H., Cho, H., Effects of the controlled-released TGF- β 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold, *Biomaterials*, 25, 4163-4173, **2004**.
- [26] Gelse, K.P., E. Aigner, T., Collagens—structure, function, and biosynthesis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 1531-1546, **2003**.
- [27] Yang, C., Hillas, P.J., Báez, J.A., Nokelainen, M., Balan, J., Tang, J., Spiro, R., Polarek, J.W., The application of recombinant human collagen in tissue engineering, *BioDrugs*, 18, 103-119, **2004**.
- [28] Anonim, How to Build Collagen Gives You the Keys to Joint and Muscle Pain Relief, <http://www.joint-muscle-relief.com/how-to-build-collagen.html>, (Temmuz, **2013**).
- [29] Rosso, F., Marino, G., Giordano, A., Barbarisi, M., Parmeggiani, D., Barbarisi, A., Smart materials as scaffolds for tissue engineering, *Journal of cellular physiology*, 203, 465-470, **2005**.
- [30] Anonim, Collagen and Natural Gut Strings, http://web.mit.edu/3.082/www/team1_f02/collagen.html, (Temmuz, **2013**).

- [31] Lee, C.H., Singla, A., Lee, Y., Biomedical applications of collagen, *International Journal of Pharmaceutics*, 221, 1-22, **2001**.
- [32] Kim, B., Baez, C.E., Atala, A., Biomaterials for tissue engineering, *World journal of urology*, 18, 2-9, **2000**.
- [33] Seal, B.L., Otero, T.C., Panitch, A., Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 34, 147-230, **2001**.
- [34] Gunatillake, P.A., Adhikari, R., Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *European Cells and Materials*, 5, 1-16, **2003**.
- [35] Kaya, B.F., *Mikro/Nanotopografik PCL Membranların Hazırlanması ve Antibakteriyal/Hücreyel Özelliklerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.
- [36] Gümüşderelioğlu, M., Dalkıranoglu, S., Aydın Tıgılı, S.R., Çakmak, S., A novel dermal substitute based on biofunctionalized electrospun PCL nanofibrous matrix, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 98, 461-472, **2011**.
- [37] Lowery, J.L., Datta, N., Rutledge, G.C., Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly(epsilon-caprolactone) fibrous mats, *Biomaterials*, 31, 491-504, **2010**.
- [38] Schnell, E., Klinkhammer, K., Balzer, S., Brook, G., Klee, D., Dalton, P., Mey, J., Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and a collagen/poly-epsilon-caprolactone blend, *Biomaterials*, 28, 3012-3025, **2007**.
- [39] Shalumon, K.T., Anulekha, K.H., Chennazhi, K.P., Tamura, H., Nair, S.V., Jayakumar, R., Fabrication of chitosan/poly(caprolactone) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, 571-576, **2011**.
- [40] Biggs, M.J.R., R.G., Dalby, M.J., Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions, *Nanomedicine*, 6, 619-633, **2010**.
- [41] Norman, J.J., Desai, T.A., Methods for fabrication of nanoscale topography for tissue engineering scaffolds, *Annals of Biomedical Engineering*, 34, 89-101, **2006**.
- [42] Gong, H., Freddo, T.F., Johnson, M., Age-related changes of sulfated proteoglycans in the normal human trabecular meshwork, *Experimental Eye Research*, 55, 691-709, **1992**.
- [43] Anonim, <http://www.personal.psu.edu/users/s/b/sbk142/nanolith.html>, (Temmuz, **2013**).
- [44] Ma, P.X., Zhang, R., Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix, *Journal of Biomedical Materials Research*, 46, 60-72, **1999**.
- [45] Junkin, M., Wong, P.K., Probing cell migration in confined environments by plasma lithography, *Biomaterials*, 32, 1848-1855, **2011**.
- [46] Reneker, D.H.Y., A.L., Electrospinning jets and polymer nanofibers, *Polymer*, 49, 2387-2425, **2008**.

- [47] Kameoka, J., Orth, R., Yang, Y., Czaplowski, D., Mathers, R., Coates, G.W., Craighead, H.G., A scanning tip electrospinning source for deposition of oriented nanofibres, *Nanotechnology*, 14, 1124, **2003**.
- [48] Choi, J.S., Lee, S.W., Jeong, L., Bae, S.H., Min, B.C., Youk, J.H., Park, W.H., Effect of organosoluble salts on the nanofibrous structure of electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), *International Journal of Biological Macromolecules*, 34, 249-256, **2004**.
- [49] Jarusuwannapoom, T., Hongrojanawiwat, W., Jitjaicham, S., Wannatong, L., Nithitanakul, M., Pattamaprom, C., Koombhongse, P., Rangkupan, R., Supaphol, P., Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers, *European Polymer Journal*, 41, 409-421, **2005**.
- [50] Son, W.K., Youk, J.H., Lee, T.S. Park, W.H., The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly (ethylene oxide) fibers, *Polymer*, 45, 2959-2966, **2004**.
- [51] Lee, K.H., Kim, H.Y., Bang, H.J., Jung, Y.H., Lee, S.G., The change of bead morphology formed on electrospun polystyrene fibers, *Polymer*, 44, 4029-4034, **2003**.
- [52] Hsu, C.M., Shivkumar, S., N, N-Dimethylformamide Additions to the Solution for the Electrospinning of Poly (ϵ -caprolactone) Nanofibers, *Macromolecular Materials and Engineering*, 289, 334-340, **2004**.
- [53] Zhao, S., Wu, X., Wang, L., Huang, Y., Electrospinning of ethyl–cyanoethyl cellulose/tetrahydrofuran solutions, *Journal of Applied Polymer Science*, 91, 242-246, **2004**.
- [54] Lim, S.H., Mao, H.Q., Electrospun scaffolds for stem cell engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 1084-1096, **2009**.
- [55] Niu, H., Wang, X., Lin, T., Needleless electrospinning: developments and performances, *Nanofibers-Production, Properties and Functional Applications*, **2011**.
- [56] Shi, J., Wang, L., Chen, Y., Microcontact printing and lithographic patterning of electrospun nanofibers, *Langmuir*, 25, 6015-6018, **2009**.
- [57] Bini, T.B., Gao, S., Tan, T.C., Wang, S., Lim, A., Hai, L.B., Ramakrishna, S., Electrospun poly (L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer nanofibre tubes for peripheral nerve regeneration, *Nanotechnology*, 15, 1459, **2004**.
- [58] Gupta, D., Venugopal, J., Prabhakaran, M.P., Dev, V.R., Low, S., Choon, A.T., Ramakrishna, S., Aligned and random nanofibrous substrate for the in vitro culture of Schwann cells for neural tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 5, 2560-2569, **2009**.
- [59] Nisbet, D.R., Yu, L.M.Y., Zahir, T., Forsythe, J.S., Shoichet, M.S., Characterization of neural stem cells on electrospun poly(epsilon-caprolactone) submicron scaffolds: evaluating their potential in neural tissue engineering, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 19, 623-634, **2008**.

- [60] Subramanian, A., Vu, D., Larsen, G.F., Lin, H.Y., Preparation and evaluation of the electrospun chitosan/PEO fibers for potential applications in cartilage tissue engineering, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 16, 861-873, **2005**.
- [61] Li, W.J., Danielson, K.G., Alexander, P.G., Tuan, R.S., Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly (ϵ -caprolactone) scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67, 1105-1114, **2003**.
- [62] Yoshimoto, H., Shin, Y.M., Terai, H., Vacanti, J.P., A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 24, 2077-2082, **2003**.
- [63] Bhattarai, N., Edmondson, D., Veiseh, O., Matsen, A.F., Zhang, M., Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility, *Biomaterials*, 26, 6176-6184, **2005**.
- [64] Min, B.M., Lee, G., Kim, S.H., Nam, Y.S., Lee, T.S., Park, W., Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro, *Biomaterials*, 25, 1289-1297, **2004**.
- [65] Min, B.M., Jeong, L., Nam, Y.S., Kim, J.M., Kim, J.Y., Park, W.H., Formation of silk fibroin matrices with different texture and its cellular response to normal human keratinocytes, *International Journal of Biological Macromolecules*, 34, 223-230, **2004**.
- [66] Pan, H., Jiang, H., Chen, W., Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-co-glycolide, *Biomaterials*, 27, 3209-3220, **2006**.
- [67] Zhou, Y., Yang, D., Chen, X., Xu, Q., Lu, F., Nie, J., Electrospun water-soluble carboxyethyl chitosan/poly (vinyl alcohol) nanofibrous membrane as potential wound dressing for skin regeneration, *Biomacromolecules*, 9, 349-354, **2007**.
- [68] Liu, Y., Ji, Y., Ghosh, K., Clark, R.A.F., Huang, L., Rafailovich, M.H., Effects of fiber orientation and diameter on the behavior of human dermal fibroblasts on electrospun PMMA scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 90, 1092-1106, **2009**.
- [69] Li, W.J., Laurencin, C.T., Caterson, E.J., Tuan, R.S., Ko, F.K., Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research*, 60, 613-621, **2002**.
- [70] Rho, K.S., Jeong, L., Lee, G., Seo, B.M., Park, Y.J., Hong, S.D., Roh, S., Cho, J.J., Park, W.H., Min, B.M., Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing, *Biomaterials*, 27, 1452-1461, **2006**.
- [71] Nivison-Smith, L., Weiss, A.S., Alignment of human vascular smooth muscle cells on parallel electrospun synthetic elastin fibers, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100, 155-161, **2012**.

- [72] Stitzel, J., Liu, J., Lee, S. J., Komura, M., Berry, J., Soker, S., Lim, G., Van D.M., Czerw, R., Yoo, J.J., Controlled fabrication of a biological vascular substitute, *Biomaterials*, 27, 1088-1094, **2006**.
- [73] Mo, X.M., Xu, C.Y., Kotaki, M., and Ramakrishna, S., Electrospun P (LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation, *Biomaterials*, 25, 1883-1890, **2004**.
- [74] Schindler, M., Ahmed, I., Kamal, J., Nur, E.K.A., Grafe, T.H., Young Chung, H., Meiners, S., A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vivo-like organization and morphogenesis for cells in culture, *Biomaterials*, 26, 5624-5631, **2005**.
- [75] Kim, B., Park, H., Lee, S.H., and Sigmund, W.M., Poly (acrylic acid) nanofibers by electrospinning, *Materials Letters*, 59, 829-832, **2005**.
- [76] Meng, W., Kim, S.Y., Yuan, J., Kim, J.C., Kwon, O.H., Kawazoe, N., Chen, G., Ito, Y., Kang, I.K., Electrospun PHBV/collagen composite nanofibrous scaffolds for tissue engineering, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18, 81-94, **2007**.
- [77] Li, M., Mondrinos, M.J., Gandhi, M.R., Ko, F.K., Weiss, A.S., Lelkes, P.I., Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering, *Biomaterials*, 26, 5999-6008, **2005**.
- [78] Sisson, K., Zhang, C., Farach-Carson M.C., Chase, D.B., Rabolt J.F., Fiber diameters control osteoblastic cell migration and differentiation in electrospun gelatin, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 94, 1312-1320, **2010**.
- [79] McNamara, L.E., McMurray, R.J., Biggs, M.J.P., Kantawong, F., Oreffo, R.O.C., Dalby, M.J., Nanotopographical control of stem cell differentiation, *Journal of Tissue Engineering*, 1, **2010**.
- [80] Carrel, A., Burrows, M.T., Cultivation in vitro of malignant tumors, *The Journal of Experimental Medicine*, 13, 571-575, **1911**.
- [81] Weiss, P., Garber, B., Shape and Movement of Mesenchyme Cells as Functions of the Physical Structure of the Medium: Contributions to a Quantitative Morphology, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 38, 264, **1952**.
- [82] Clark, P., Connolly, P., Curtis, A.S., Dow, J.A., Wilkinson, C.D., Cell guidance by ultrafine topography in vitro, *Journal of Cell Science*, 99, 73-77, **1991**.
- [83] Wójciak-Stothard, B., Curtis, A.S.G., McGrath, M., Sommer, I., Wilkinson, C.D.W., Monaghan, W., Role of the cytoskeleton in the reaction of fibroblasts to multiple grooved substrata, *Cell Motility and The Cytoskeleton*, 31, 147-158, **1995**.
- [84] Clark, P., Connolly, P., Curtis, A.S., Dow, J.A., Wilkinson, C.D., Topographical control of cell behaviour. I. Simple step cues, *Development*, 99, 439-448, **1987**.
- [85] Dalby, M.J., Riehle, M.O., Yarwood S.J., Wilkinson C.D., Curtis A.S., Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: response to a micro-grooved topography, *Experimental Cell Research*, 284, 272-280, **2003**.

- [86] Wojciak, B., Crossan, J., Curtis, A., Wilkinson, C., Grooved substrata facilitate in vitro healing of completely divided flexor tendons, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 6, 266-271, **1995**.
- [87] Webster, T.J., Ergun, C., Doremus, R.H., Siegel, R.W., Bizios, R., Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics, *Biomaterials*, 22, 1327-1333, **2001**.
- [88] Eisenbarth, E., Meyle, J., Nachtigall, W., Breme, J., Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts, *Biomaterials*, 17, 1399-1403, **1996**.
- [89] Dalby, M.J., Giannaras, D., Riehle, M.O., Gadegaard, N., Affrossman, S. Curtis, A.S.G., Rapid fibroblast adhesion to 27nm high polymer demixed nano-topography, *Biomaterials*, 25, 77-83, **2004**.
- [90] Juliano, R.L., Haskill, S., Signal transduction from the extracellular matrix, *Journal of Cell Biology*, 120, 577-577, **1993**.
- [91] Burridge, K., Chrzanowska-Wodnicka, M., Focal adhesions, contractility, and signaling, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12, 463-519, **1996**.
- [92] Cowles, E.A., DeRome, M.E., Pastizzo, G., Brailey, L.L., Gronowicz, G.A., Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development, *Calcified Tissue International*, 62, 74-82, **1998**.
- [93] Dalby, M.J., Gadegaard, N., Riehle, M.O., Wilkinson, C., Curtis, A., Investigating filopodia sensing using arrays of defined nano-pits down to 35 nm diameter in size, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 2005-2015, **2004**.
- [94] Miller, D.C., Thapa, A., Haberstroh, K.M., Webster, T.J., Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly (lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features, *Biomaterials*, 25, 53-61, **2004**.
- [95] Choudhary, S., Haberstroh, K.M., Webster, T.J., Enhanced functions of vascular cells on nanostructured Ti for improved stent applications, *Tissue Engineering*, 13, 1421-1430, **2007**.
- [96] Keddie, J.L., Jones, R.A.L., Cory, R.A., Size-dependent depression of the glass transition temperature in polymer films, *Europhysics Letters*, 27, 59, **1994**.
- [97] Ellison, C.J., Torkelson, J.M., The distribution of glass-transition temperatures in nanoscopically confined glass formers, *Nature Materials*, 2, 695-700, **2003**.
- [98] Yang, Y., Liu, D., Xie, Y., Lee, L.J., Tomasko, D.L., Low-Temperature Fusion of Polymeric Nanostructures Using Carbon Dioxide, *Advanced Materials*, 19, 251-254, **2007**.
- [99] Yang, Y., Cheng, M.M.C., Hu, X., Liu, D., Goyette, R.J. Lee, L.J., Ferrari, M., Low-pressure carbon dioxide enhanced polymer chain mobility below the bulk glass transition temperature, *Macromolecules*, 40, 1108-1111, **2007**.

- [100] Webster, T.J., Schadler, L.S., Siegel, R.W., Bizios, R., Mechanisms of enhanced osteoblast adhesion on nanophase alumina involve vitronectin, *Tissue Engineering*, 7, 291-301, **2001**.
- [101] Den Braber, E.T., De Ruijter, J.E., Ginsel, L.A., Von Recum, A.F. Jansen, J.A., Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces, *Journal of Biomedical Materials Research*, 40, 291-300, **1998**.
- [102] Hornekaer, L., Baurichter, A., Petrunin, V.V., Luntz, A.C. Kay, B.D., Al-Halabi, A., Influence of surface morphology on D2 desorption kinetics from amorphous solid water, *The Journal of Chemical Physics* 122, 124701, **2005**.
- [103] van der Flier, A., Sonnenberg, A., Function and interactions of integrins, *Cell and Tissue Research*, 305, 285-298, **2001**.
- [104] von der Mark, K., Park, J., Bauer, S., Schmuki, P., Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix, *Cell and Tissue Research*, 339, 131-153, **2010**.
- [105] Ratner, B.D., *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston,, **2004**.
- [106] Kasemo, B., Biological surface science, *Surface Science*, 500, 656-677, **2002**.
- [107] Variola, F., Brunski, J.B., Orsini, G., Oliveira, P.T., Wazen, R., Nanci, A., Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives, *Nanoscale*, 3, 335-353, **2011**.
- [108] Hersel, U., Dahmen, C., Kessler, H., RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond, *Biomaterials*, 24, 4385-4415, **2003**.
- [109] Dalby, M.J., Yarwood, S.J., Riehle, M.O., Johnstone, H.J.H., Affrossman, S., Curtis, A.S.G., Increasing fibroblast response to materials using nanotopography: morphological and genetic measurements of cell response to 13-nm-high polymer demixed islands, *Experimental Cell Research*, 276, 1-9, **2002**.
- [110] Andersson, A.S., Bäckhed, F., von Euler, A., Richter-Dahlfors, A., Sutherland, D., Kasemo, B., Nanoscale features influence epithelial cell morphology and cytokine production, *Biomaterials*, 24, 3427-3436, **2003**.
- [111] Andersson, A.S., Brink, J., Lidberg, U., Sutherland, D.S., Influence of systematically varied nanoscale topography on the morphology of epithelial cells, *IEEE Transactions NanoBioscience*, 2, 49-57, **2003**.
- [112] Wójciak-Stothard, B., Curtis, A., Monaghan, W., Macdonald, K., Wilkinson, C., Guidance and Activation of Murine Macrophages by Nanometric Scale Topography, *Experimental Cell Research*, 223, 426-435, **1996**.
- [113] Rice, J.M., Hunt, J.A., Gallagher, J.A., Hanarp, P., Sutherland, D.S., Gold, J., Quantitative assessment of the response of primary derived human osteoblasts and macrophages to a range of nanotopography surfaces in a single culture model in vitro, *Biomaterials*, 24, 4799-4818, **2003**.

- [114] Webster, T.J., Ergun, C., Doremus, R.H., Siegel, R.W., Bizios, R., Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics, *Journal of Biomedical Materials Research*, 51, 475-483, **2000**.
- [115] Dalby, M.J., McCloy, D., Robertson, M., Agheli, H., Sutherland, D., Affrossman, S., Oreffo, R.O., Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies, *Biomaterials*, 27, 2980-2987, **2006**.
- [116] Park, J., Bauer, S., Mark, K.V.D., Schmuki, P., Nanosize and vitality: TiO₂ nanotube diameter directs cell fate, *Nano Letters*, 7, 1686-1691, **2007**.
- [117] Brammer, K.S., Oh, S., Gallagher, J.O., Jin, S., Enhanced Cellular Mobility Guided by TiO₂ Nanotube Surfaces, *Nano Letters*, 8, 786-793, **2008**.
- [118] Park, J., Bauer, S., Schmuki, P., Mark, K.V.D., Narrow window in nanoscale dependent activation of endothelial cell growth and differentiation on TiO₂ nanotube surfaces, *Nano Letters*, 9, 3157-3164, **2009**.
- [119] Miller, D.C., Haberstroh, K.M., Webster, T.J., Mechanism(s) of increased vascular cell adhesion on nanostructured poly(lactic-co-glycolic acid) films, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 73A, 476-484, **2005**.
- [120] Belyanskaya, L., Weigel, S., Hirsch, C., Tobler, U., Krug, H.F., Wick, P., Effects of carbon nanotubes on primary neurons and glial cells, *Neurotoxicology*, 30, 702-711, **2009**.
- [121] Silva, G.A., Nanomedicine: shorting neurons with nanotubes, *Nature Nanotechnology*, 4, 82-3, **2009**.
- [122] Yim, E.K.F., Reano, R.M., Pang, S.W., Yee, A.F., Chen, C.S., Leong, K.W., Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells, *Biomaterials*, 26, 5405-5413, **2005**.
- [123] Xu, C.Y.I., R., Kotaki, M., Ramakrishna, S., Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering, *Biomaterials*, 25, 877-886, **2004**.
- [124] Zhu, B., Zhang, Q., Lu, Q., Xu, Y., Yin, J., Hu, J., Wang, Z., Nanotopographical guidance of C6 glioma cell alignment and oriented growth, *Biomaterials*, 25, 4215-4223, **2004**.
- [125] Yang, F., Murugan, R., Wang, S., Ramakrishna, S., Electrospinning of nano/micro scale poly (L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering, *Biomaterials*, 26, 2603-2610, **2005**.
- [126] Andersson, A.S., Olsson, P., Lidberg, U., Sutherland, D., The effects of continuous and discontinuous groove edges on cell shape and alignment, *Experimental Cell Research*, 288, 177-188, **2003**.
- [127] Pattison, M., Wurster, S., Webster, T., Haberstroh, K., Three-dimensional, nano-structured PLGA scaffolds for bladder tissue replacement applications, *Biomaterials*, 26, 2491-2500, **2005**.
- [128] Milner, K.R., Siedlecki, C.A., Submicron poly (L-lactic acid) pillars affect fibroblast adhesion and proliferation, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 82, 80-91, **2007**.
- [129] Feng, Z.Q., Chu, X.H., Huang, N.P., Leach, M.K., Wang, G., Wang, Y.C., Ding, Y.T., Gu, Z.Z., Rat hepatocyte aggregate formation on discrete

- aligned nanofibers of type-I collagen-coated poly (L-lactic acid), *Biomaterials*, 31, 3604-3612, **2010**.
- [130] Dalby, M.J., Childs, S., Riehle, M.O., Johnstone, H.J.H., Affrossman, S., Curtis, A.S.G., Fibroblast reaction to island topography: changes in cytoskeleton and morphology with time, *Biomaterials*, 24, 927-935, **2003**.
- [131] Dalby, M.J., Riehle, M.O., Johnstone, H., Affrossman, S., Curtis, A.S. G., In vitro reaction of endothelial cells to polymer demixed nanotopography, *Biomaterials*, 23, 2945-2954, **2002**.
- [132] Lim, J.Y., Hansen, J.C., Siedlecki, C.A., Hengstebeck, R.W., Cheng, J., Winograd, N., Donahue, H.J., Osteoblast adhesion on poly (L-lactic acid)/polystyrene demixed thin film blends: effect of nanotopography, surface chemistry, and wettability, *Biomacromolecules*, 6, 3319-3327, **2005**.
- [133] Sjoström, T., Dalby, M.J., Hart, A., Tare, R., Oreffo, R.O., Su, B., Fabrication of pillar-like titania nanostructures on titanium and their interactions with human skeletal stem cells, *Acta Biomaterialia*, 5, 1433-1441, **2009**.
- [134] Fan, Y.W., Cui, F.Z., Chen, L.N., Zhai, Y., Xu, Q.Y., Lee, I.S., Adhesion of neural cells on silicon wafer with nano-topographic surface, *Applied Surface Science*, 187, 313-318, **2002**.
- [135] Buttiglieri, S., Pasqui, D., Migliori, M., Johnstone, H., Affrossman, S., Sereni, L., Wratten, M.L., Barbucci, R., Tetta, C., Camussi, G., Endothelization and adherence of leucocytes to nanostructured surfaces, *Biomaterials*, 24, 2731-2738, **2003**.
- [136] Dalby, M.J.R., M.O., Sutherland, D.S., Agheli, H., Curtis, A.S.G., Changes in fibroblast morphology in response to nano-columns produced by colloidal lithography, *Biomaterials*, 25, 5415-5422, **2004**.
- [137] Yang, J.Y., Ting, Y.C., Lai, J.Y., Liu, H.L., Fang, H.W., Tsai, W.B., Quantitative analysis of osteoblast-like cells (MG63) morphology on nanogrooved substrata with various groove and ridge dimensions, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 90A, 629-640, **2009**.
- [138] Lim J.Y., D., A.D., Zhou, Z., Hansen, J.C., Siedlecki, C.A., Hengstebeck, R.W., Cheng, J., Winograd, N., Donahue, H.J., The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography, *Biomaterials*, 28, 1787-1797, **2007**.
- [139] Yim, E.K., Pang, S.W., Leong, K.W., Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage, *Experimental Cell Research*, 313, 1820-1829, **2007**.
- [140] Teixeira, A.I., McKie, G.A., Foley, J.D., Bertics, P.J., Nealey, P.F., Murphy, C.J., The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography, *Biomaterials*, 27, 3945-3954, **2006**.
- [141] Xu, C., Inai, R., Kotaki, M., Ramakrishna, S., Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering, *Tissue Engineering*, 10, 1160-1168, **2004**.

- [142] Woo, K.M., Chen, V.J., Ma, P.X., Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67, 531-537, **2003**.
- [143] Li, W.J., Tuli, R., Okafor, C., Derfoul, A., Danielson, K.G., Hall, D.J., Tuan, R.S., A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, 26, 599-609, **2005**.
- [144] Chua, K.N., Lim, W.S., Zhang, P., Lu, H., Wen, J., Ramakrishna, S. Leong, K.W., Mao, H.Q., Stable immobilization of rat hepatocyte spheroids on galactosylated nanofiber scaffold, *Biomaterials*, 26, 2537-2547, **2005**.
- [145] Thapa, A., Miller, D.C., Webster, T.J., Haberstroh, K.M., Nano-structured polymers enhance bladder smooth muscle cell function, *Biomaterials*, 24, 2915-2926, **2003**.
- [146] Thapa, A., Webster, T.J., Haberstroh, K.M., Polymers with nano-dimensional surface features enhance bladder smooth muscle cell adhesion, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67, 1374-1383, **2003**.
- [147] Izman, S., Abdul-Kadir, M.R., Anwar, M. Nazim, E.M., Rosliza, R., Shah, A., Hassan, M.A., Surface Modification Techniques for Biomedical Grade of Titanium Alloys: Oxidation, Carburization and Ion Implantation Processes, *Titanium Alloys - Towards Achieving Enhanced Properties for Diversified Applications*, **2012**.
- [148] Sargeant, T.D., *Biomaterials for orthopaedic implants and bone regeneration*, Doktora Tezi, Northwestern University, Evanston, **2007**.
- [149] Jeyachandran, Y.L., Narayandass, S.K., Mangalaraj, D., Bao, C.Y., Li, W., Liao, Y.M., Zhang, C.L., Xiao, L.Y., Chen, W.C., A study on bacterial attachment on titanium and hydroxyapatite based films, *Surface and Coatings Technology*, 201, 3462-3474, **2006**.
- [150] Liu, X., Chu, P.K., Ding, C., Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 47, 49-121, **2004**.
- [151] Donlan, R.M., Biofilms and device-associated infections, *Emerging Infectious Diseases*, 7, 277, **2001**.
- [152] Archibald, L.K., Gaynes, R.P., Hospital-acquired infections in the United States: the importance of interhospital comparisons, *Infectious Disease Clinics of North America*, 11, 245-255, **1997**.
- [153] Sudağidan, M., Erdem, İ., Çavuşoğlu, C., Çiftçioğlu, M., Biyomalzemelerden izole edilen staphylococcus epidermidis suşlarının yüzey özelliklerinin belirlenmesi, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 44, 93-103, **2010**.
- [154] Campoccia, D., Montanaro, L., Arciola, C.R., The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance, *Biomaterials*, 27, 2331-2339, **2006**.
- [155] Mao, C., Qiu, Y., Sang, H., Mei, H., Zhu, A., Shen, J., Lin, S., Various approaches to modify biomaterial surfaces for improving hemocompatibility, *Advances in Colloid and Interface Science*, 110, 5-17, **2004**.

- [156] Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, 284, 1318-1322, **1999**.
- [157] Katsikogianni, M., Missirlis, Y.F., Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions, *European Cells & Materials*, 8, 37-57, **2004**.
- [158] Cho, S.H., Naber, K., Hacker, J., Ziebuhr, W., Detection of the icaA/BC gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19, 570-575, **2002**.
- [159] Anonim, Biyofilm oluşum süreci, <http://www.iab.kit.edu/microbio/489.php> (Temmuz, **2013**).
- [160] Stewart, P.S., William, J.C., Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *The Lancet*, 358, 135-138, **2001**.
- [161] Pavithra, D., Doble, M., Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants—issues and prevention, *Biomedical Materials*, 3, 034003, **2008**.
- [162] Cunliffe, D., Smart, C.A., Alexander, C., Vulfson, E.N., Bacterial adhesion at synthetic surfaces, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4995-5002, **1999**.
- [163] Baier, R.E., Meyer, A.E., Natiella, J.R., Natiella, R.R., Carter, J.M., Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results, *Journal of Biomedical Materials Research*, 18, 337-355, **1984**.
- [164] Brodbeck, W.G., Patel, J., Voskerician, G., Christenson, E., Shive, M.S., Nakayama, Y., Matsuda, T., Ziats, N.P., Anderson, J.M., Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 10287-10292, **2002**.
- [165] Herrmann, M., Vaudaux, P.E., Pittet, D., Auckenthaler, R., Lew, P.D., Schumacher-Perdreau, F., Peters, G., Waldvogel, F.A., Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material, *Journal of Infectious Diseases*, 158, 693-701, **1988**.
- [166] Vendra, V.K., Wu, L., Krishnan, S., *Polymer Thin Films for Biomedical Applications*, in *Nanotechnologies for the Life Sciences*. 2007, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [167] Gregory, P., Huglin, M.B., Viscosity of aqueous and alkaline solutions of poly(ethylene oxide), *Die Makromolekulare Chemie*, 187, 1745-1755, **1986**.
- [168] Bailey, F.E., Callard, R.W., Some properties of poly(ethylene oxide) in aqueous solution, *Journal of Applied Polymer Science*, 1, 56-62, **1959**.
- [169] Kingshott, P., Griesser, H.J., Surfaces that resist bioadhesion, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 4, 403-412, **1999**.
- [170] Borgens, R.B., Bohnert, D., Rapid recovery from spinal cord injury after subcutaneously administered polyethylene glycol, *Journal of Neuroscience Research*, 66, 1179-1186, **2001**.

- [171] Stavisky, R.C., Britt, J.M., Zuzek, A., Truong, E., Bittner, G.D., Melatonin enhances the in vitro and in vivo repair of severed rat sciatic axons, *Neuroscience Letters*, 376, 98-101, **2005**.
- [172] Mori, Y., Nagaoka, S., Takiuchi, H., Kikuchi, T., Noguchi, N., Tanzawa, H., Noishiki, Y., A new antithrombogenic material with long polyethyleneoxide chains, *American Society for Artificial Internal Organs*, 28, 459-463, **1982**.
- [173] Merrill, E.A., Salzman, E.W., Polyethylene oxide as a biomaterial, *Society for Artificial Internal Organs Journal*, 6, 60-64, **1983**.
- [174] Gombotz, W.R., Guanghai, W., Horbett, T.A., Hoffman, A.S., Protein adsorption to poly (ethylene oxide) surfaces, *Journal of Biomedical Materials Research*, 25, 1547-1562, **1991**.
- [175] Mike, J., *Biomedical Polymers*, Woodhead Publishing Limited and Maney Publishing, **2007**.
- [176] Chapman, R.G., Ostuni, E., Liang, M.N., Meluleni, G., Kim, E., Yan, L., Pier, G., Warren, H.S., Whitesides, G.M., Polymeric thin films that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacteria, *Langmuir*, 17, 1225-1233, **2001**.
- [177] Krishnan, S., Weinman, C.J., Ober, C.K., Advances in polymers for anti-biofouling surfaces, *Journal of Materials Chemistry*, 18, 3405-3413, **2008**.
- [178] Lee, J.H., Lee, H.B., Andrade, J.D., Blood biocompatibility of poly(ethylene oxide) surfaces *Progress in Polymer Science*, 20 1043 – 1079, **1995**
- [179] Ostuni, E., Chapman, R.G., Holmlin, R.E., Takayama, S., Whitesides, G.M., A survey of structure-property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein, *Langmuir*, 17, 5605-5620, **2001**.
- [180] Zhang, F., Kang, E.T., Neoh, K.G., Wang, P., Tan, K.L., Surface modification of stainless steel by grafting of poly (ethylene glycol) for reduction in protein adsorption, *Biomaterials*, 22, 1541-1548, **2001**.
- [181] Han, D.K., Park, K.D., Hubbell, J.A., Kin, Y.H., Surface characteristics and biocompatibility of lactide-based poly (ethylene glycol) scaffolds for tissue engineering, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 9, 667-680, **1998**.
- [182] Roosjen, A., Kaper, H.J., van der Mei, H.C., Norde, W., Busscher, H.J., Inhibition of adhesion of yeasts and bacteria by poly (ethylene oxide)-brushes on glass in a parallel plate flow chamber, *Microbiology*, 149, 3239-3246, **2003**.
- [183] Koegler, W.S., Griffith, L.G., Osteoblast response to PLGA tissue engineering scaffolds with PEO modified surface chemistries and demonstration of patterned cell response, *Biomaterials*, 25, 2819-2830, **2004**.
- [184] Arciola, C.R., Bustanji, Y., Conti, M., Campoccia, D., Baldassarri, L., Samori, B., Montanaro, L., Staphylococcus epidermidis–fibronectin binding and its inhibition by heparin, *Biomaterials*, 24, 3013-3019, **2003**.
- [185] Peacock, S.J., Foster, T.J., Cameron, B.J., Berendt, A.R., Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate

- adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells, *Microbiology*, 145, 3477-3486, **1999**.
- [186] Fowler, T., Wann, E.R., Joh, D., Johansson, S., Foster, T.J., Hook, M., Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins, *European Journal of Cell Biology*, 79, 672-9, **2000**.
- [187] Maddikeri, R.R., Tosatti, S., Schuler, M., Chessari, S., Textor, M., Richards, R.G., Harris, L.G., Reduced medical infection related bacterial strains adhesion on bioactive RGD modified titanium surfaces: a first step toward cell selective surfaces, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84, 425-435, **2008**.
- [188] Zhang, F., Zhang, Z., Zhu, X., Kang, E.T., Neoh, K.G., Silk-functionalized titanium surfaces for enhancing osteoblast functions and reducing bacterial adhesion, *Biomaterials*, 29, 4751-4759, **2008**.
- [189] Raynor, J.E., Petrie, T.A., Garcia, A.J., Collard, D.M., Controlling cell adhesion to titanium: functionalization of poly [oligo (ethylene glycol) methacrylate] brushes with cell-adhesive peptides, *Advanced Materials*, 19, 1724-1728, **2007**.
- [190] Erbil, H.Y., Surface Tension of Polymers, *CRC Press Inc., Boca Raton, USA*, 262 – 270, **1997**.
- [191] Berger, J.R., M., Mayer, J.M., Felt, O., Peppas, N.A., Gurny, R., Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 19-34, **2004**.
- [192] Krajewska, B., Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials, *Separation and Purification Technology*, 41, 305-312, **2005**.
- [193] Tang, Z.G., Black, R.A., Curran, J.M., Hunt, J.A., Rhodes, N.P., Williams, D.F., Surface properties and biocompatibility of solvent-cast poly [ϵ -caprolactone] films, *Biomaterials*, 25, 4741-4748, **2004**.
- [194] Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S.V., Tamura, H., Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications, *Biotechnology Advances*, 28, 142-150, **2010**.
- [195] Schiffman, J.D., Schauer, C.L., One-step electrospinning of cross-linked chitosan fibers, *Biomacromolecules*, 8, 2665-2667, **2007**.
- [196] Ohkawa, K., Minato, K., Kumagai, K., Hayashi, S., Yamamoto, H., Chitosan nanofiber, *Biomacromolecules*, 7, 3291-3294, **2006**.
- [197] Ignatova, M., Manolova, N., Rashkov, I., Electrospun Antibacterial Chitosan-Based Fibers, *Macromolecular Bioscience*, 13, 860-872, **2013**.
- [198] Ohkawa, K., Cha D., Kim, H., Nishida, A., Yamamoto, H., Electrospinning of chitosan, *Macromolecular Rapid Communications*, 25, 1600-1605, **2004**.
- [199] Van Natta F.J., H.J.W., Carruthers W.H., Polymerization and ring formation, ϵ -caprolactone and its polymers, *Journal of American Chemical Society*, 56, 455–459, **1934**.

- [200] Woodruff, M.A., Hutmacher, D.W., The return of a forgotten polymer—polycaprolactone in the 21st century, *Progress in Polymer Science*, 35, 1217-1256, **2010**.
- [201] Lopez-Perez, P., da Silva, R., Serra, C., Pashkuleval, A., Reis, R., Surface phosphorylation of chitosan significantly improves osteoblast cell viability, attachment and proliferation, *Journal of Materials Chemistry*, 20, 483-491, **2010**.
- [202] Anonim, Collectors for Electrospun Nanofibers, [http://www.electrospinning.com/Collectors for electrospun nanofibers.html](http://www.electrospinning.com/Collectors%20for%20electrospun%20nanofibers.html) (Temmuz, **2013**).
- [203] He, L., Liao, S., Quan, D., Ma, K., Chan, C., Ramakrishna, S., Lu, J., Synergistic effects of electrospun PLLA fiber dimension and pattern on neonatal mouse cerebellum C17. 2 stem cells, *Acta Biomaterialia*, 6, 2960-2969, **2010**.
- [204] Tian, F., Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Khademhosseini, A., Yokoyama, Y., Estrada, G.G., Kobayashi, H., Quantitative analysis of cell adhesion on aligned micro and nanofibers, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84, 291-299, **2008**.
- [205] Ma, J., He, X., Jabbari, E., Osteogenic differentiation of marrow stromal cells on random and aligned electrospun poly (L-lactide) nanofibers, *Annals of Biomedical Engineering*, 39, 14-25, **2011**.
- [206] Shang, S., Yang, F., Cheng, X., Walboomers, X.F., Jansen, J.A., The effect of electrospun fibre alignment on the behaviour of rat periodontal ligament cells, *European Cells & Materials*, 19, 180-192, **2010**.
- [207] Choi, J.S., Lee, S.J., Christ, G.J., Atala, A., Yoo, J.J., The influence of electrospun aligned poly(ϵ -caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes, *Biomaterials*, 29, 2899-2906, **2008**.
- [208] Teixeira, A.I., Abrams, G.A., Bertics, P.J., Murphy, C.J., Nealey, P.F., Epithelial contact guidance on well-defined micro-and nanostructured substrates, *Journal of Cell Science*, 116, 1881-1892, **2003**.
- [209] Gümüşderelioğlu, M., Kaya, B.F., Beşkardeş, I.G., Comparison of epithelial and fibroblastic cell behavior on nano/micro-topographic PCL membranes produced by crystallinity control, *Journal of Colloid and Interface Science*, 358, 444-453, **2011**.
- [210] Patel, S., Kurpinski, K., Quigley, R., Gao, H., Hsiao, B.S., Poo, M.M., Li, S., Bioactive nanofibers: synergistic effects of nanotopography and chemical signaling on cell guidance, *Nano Letters*, 7, 2122-2128, **2007**.
- [211] Ohkawa, K., Kim, H., Lee, K., Yamamoto, H., Electrospun non-woven fabrics of poly (ϵ -caprolactone) and their biodegradation by pure cultures of soil filamentous fungi, *Macromolecular Symposia*, 216, 301-306, **2004**.
- [212] Buchko, C.J., Chen, L.C., Shen, Y., Martin, D.C., Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films, *Polymer*, 40, 7397-7407, **1999**.
- [213] Lee, K.H., Kim, H.Y., La, Y.M., Lee, D.R., Sung, N.H., Influence of a mixing solvent with tetrahydrofuran and N, N-dimethylformamide on electrospun

- poly (vinyl chloride) nonwoven mats, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 40, 2259-2268, **2002**.
- [214] Tomihata, K., Ikada, Y., Crosslinking of hyaluronic acid with glutaraldehyde, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 35, 3553-3559, **1997**.
- [215] Blanes, M., Gisbert, M.J., Marco, B., Bonet, M., Gisbert, J., Balart, R., Influence of glyoxal in the physical characterization of PVA nanofibers, *Textile Research Journal*, 80, 1465-1472, **2010**.
- [216] Doycheva, M., Petrova, E., Stamenova, R., Tsvetanov, C., Riess, G., UV-induced cross-linking of poly (ethylene oxide) in aqueous solution, *Macromolecular Materials and Engineering*, 289, 676-680, **2004**.
- [217] Doytcheva, M., Dotcheva, D., Stamenova, R., Orahovats, A., Tsvetanov, C., Leder, J., Ultraviolet-induced crosslinking of solid poly (ethylene oxide), *Journal of Applied Polymer Science*, 64, 2299-2307, **1997**.
- [218] Doytcheva, M., Dotcheva, D., Stamenova, R., Tsvetanov, C., UV-initiated crosslinking of poly (ethylene oxide) with pentaerythritol triacrylate in solid state, *Macromolecular Materials and Engineering*, 286, 30-33, **2001**.
- [219] Zhou, C., Wang, Q., Wu, Q., UV-initiated crosslinking of electrospun poly (ethylene oxide) nanofibers with pentaerythritol triacrylate: Effect of irradiation time and incorporated cellulose nanocrystals, *Carbohydrate Polymers*, 87, 1779-1786, **2012**.
- [220] Albinska, J., Ulański, P., Rosiak, J.M., Radiation-induced degradation and crosslinking of poly (ethylene oxide) in solid state, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 253, 339-344, **2002**.
- [221] Savaş, H., Güven, O., Investigation of active substance release from poly (ethylene oxide) hydrogels, *International Journal of Pharmaceutics*, 224, 151-158, **2001**.
- [222] Doytcheva, M., Stamenova, R., Zvetkov, V., Tsvetanov, C.B., UV irradiation-induced crosslinking of solid poly (ethylene oxide) modified with tetraalkyl ammonium salt, *Polymer*, 39, 6715-6721, **1998**.
- [223] Spasova, M., Stoilova, O., Manolova, N., Rashkov, I., Altankov, G., Preparation of PLLA/PEG nanofibers by electrospinning and potential applications, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 22, 62-76, **2007**.
- [224] Lou, C.W., Lin, J.H., Yen, K.C., Lu, C.T. Lee, C.Y., Preparation of Polyethylene Oxide/Chitosan fiber membranes by electrospinning and the evaluation of biocompatibility, *Textile Research Journal*, 78, 254-257, **2008**.
- [225] Martin, J.Y., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Schraub, D.M., Simpson, J., Lankford, J., Dean, D.D., Cochran, D.L., Boyan, B.D., Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63), *Journal of Biomedical Materials Research*, 29, 389-401, **1995**.
- [226] Kieswetter, K., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Cochran, D.L., Simpson, J., Dean, D.D., Boyan, B.D., Surface roughness modulates the local

- production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells, *Journal of Biomedical Materials Research*, 32, 55-63, **1996**.
- [227] Neoh, K.G., Hu, X., Zheng, D., Kang, E.T., Balancing osteoblast functions and bacterial adhesion on functionalized titanium surfaces, *Biomaterials*, 33, 2813-2822, **2012**.
- [228] Jayaraman, M., Meyer, U., Bühner, M., Joos, U., Wiesmann, H.P., Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro, *Biomaterials*, 25, 625-631, **2004**.
- [229] Groessner-Schreiber, B., Tuan, R.S., Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces in vitro, *Journal of Cell Science*, 101, 209-217, **1992**.
- [230] Carey, A.G., *Growth and biofilm formation by Staphylococcus epidermidis and other relevant contaminant bacteria during storage of platelet concentrates*, PhD Thesis, Department of Biochemistry, Microbiology & Immunology Faculty of Medicine University of Ottawa, Canada, **2011**.
- [231] Li, L.L., Wang, L.M., Xu, Y., Lv, L.X., Preparation of gentamicin-loaded electrospun coating on titanium implants and a study of their properties in vitro, *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 132, 897-903, **2012**.
- [232] Ravichandran, R., Ng, C.Ch., Liao, S, Pliszka, D., Raghunath, M., Ramakrishna, S., Chan, C.K., Biomimetic surface modification of titanium surfaces for early cell capture by advanced electrospinning, *Biomedical Materials*, 7, 015001, **2012**.
- [233] Gatti, J.W., Smithgall, M.C., Paranjape, S.M., Rolfes, R.J., Paranjape, M., Using electrospun poly (ethylene-oxide) nanofibers for improved retention and efficacy of bacteriolytic antibiotics, *Biomedical Microdevices*, 1-7, **2013**.

EK

ŞİŞME ÇALIŞMALARI İLE İLGİLİ VERİLER

Aşağıda bölüm 3.2.3'de verilen yöntem ile gerçekleştirilmiş olan fiber örgülerin su içeriğinin saptanması çalışmalarına ait bulgular verilmiştir. Şişme oranı (ort), n=3 için Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanan ortalama değerlerdir.

UV12 uygulanmış %7.5 (w/w) PETA içeren PEO fiber örgülerin 37°C'de kuruma süresine bağlı şişme tablosu

Kuruma Süresi (gün)	Ağırlıklar (g)	1. Örnek	2. Örnek	3. Örnek	Ort.	S. Sapma	% Şişme	Gözlem
	Kuru	0.0037	0.0033	0.0024	0.0031	0.0007		
	Şişme Süresine Göre Kurulmuş	0.0226	0.0233	0.0202	0.0220	0.0016	603.2	şişme sırasında küçülme ve büzülme
1	1. sa	0.0368	0.0378	0.0288	0.0345	0.0049	1000.0	
	24. sa	0.0433	0.0418	0.0309	0.0387	0.0068	1134.0	
	48. sa	0.0382	0.0393	0.0250	0.0342	0.0080	990.4	
		0.0054	0.0057	0.0028	0.0046	0.0016		
3	10. dak	0.0454	0.0486	0.0240	0.0393	0.0134	748.9	şişme sırasında küçülme ve büzülme
	1. sa	0.0505	0.0582	0.0262	0.0450	0.0167	870.5	
	24. sa	0.0611	0.0709	0.0311	0.0544	0.0207	1073.4	
	48. sa	0.0663	0.0759	0.0336	0.0586	0.0222	1164.8	kararlılık iyi
	72. sa	0.0698	0.0789	0.0346	0.0611	0.0234	1218.7	
		0.0025	0.0018	0.0024	0.0022	0.0004		
6	10. dak	0.0194	0.0128	0.02	0.0174	0.0040	679.1	şişme sırasında büzülme ve bir miktar küçülme
	1. sa	0.0197	0.0125	0.0194	0.0172	0.0041	670.1	
	24. sa	0.0245	0.0158	0.0264	0.0222	0.0057	895.5	
	48. sa	0.0254	0.017	0.028	0.0235	0.0057	950.8	kararlılık iyi
	72. sa	0.0308	0.0188	0.0317	0.0271	0.0072	1113.4	
	96. sa	0.0301	0.0191	0.0333	0.0275	0.0074	1131.3	
		0.0029	0.0033	0.0026	0.0029	0.0004		
8	10. dak	0.0215	0.0215	0.0198	0.0209	0.0010	613.6	şişme sırasında büzülme ve küçülme az
	1. sa	0.0217	0.0213	0.0196	0.0209	0.0011	611.4	
	24. sa	0.0315	0.0251	0.0259	0.0275	0.0035	837.5	
	48. sa	0.0343	0.0277	0.0294	0.0305	0.0034	938.6	kararlılık iyi
	72. sa	0.0337	0.0297	0.0290	0.0308	0.0025	950.0	

UV12 uygulanmamış %7.5 (w/w) PETA içeren PEO fiber örgülerin 37°C'de kuruma süresine bağlı şişme tablosu

Kuruma Süresi (gün)	Ağırlıklar (g)	1. Örnek	2. Örnek	3. Örnek	Ort.	S. Sapma	% Şişme	Gözlem
	Kuru	0.0023	0.0027	0.0024	0.0025	0.0002		
	Şişme Süresine Göre							
1	10. dak	0.0157	0.0182	0.0155	0.0165	0.0015	567.57	şişme sırasında küçülme ve büzülme UV12'ye göre daha fazla jelleşme aşırı jelleşme
	1. sa	0.0223	0.0283	0.0215	0.0240	0.0037	874.32	
	24. sa	X	X	X			X	
3		0.0015	0.002	0.0026	0.0020	0.0006		şişme sırasında küçülme ve büzülme kararlılık iyi
	10. dak	0.0139	0.0205	0.0228	0.0191	0.0046	837.70	
	1. sa	0.0143	0.0222	0.0236	0.0200	0.0050	885.25	
	24. sa	0.0171	0.0258	0.0286	0.0238	0.0060	1072.13	
	48. sa	0.0194	0.0275	0.0309	0.0259	0.0059	1175.41	
	72. sa	0.0178	0.0278	0.0315	0.0257	0.0071	1163.93	
6		0.0027	0.0028	0.0028	0.0028	0.0001		şişme sırasında büzülme ve UV12'ye göre daha çok küçülme kararlılık iyi
	10. dak	0.0232	0.0273	0.0236	0.0247	0.0023	792.77	
	1. sa	0.0255	0.0283	0.0248	0.0262	0.0019	846.99	
	24. sa	0.0326	0.0374	0.0328	0.0343	0.0027	1138.55	
	48. sa	0.0353	0.0398	0.0359	0.0370	0.0024	1237.35	
	72. sa	0.0381	0.0447	0.0389	0.0406	0.0036	1366.27	
	96. sa	0.0365	0.044	0.0363	0.0389	0.0044	1307.23	
8		0.0016	0.0026	0.0033	0.0025	0.0009		şişme sırasında büzülme ve küçülme az kararlılık iyi
	10. dak	0.0138	0.0219	0.0282	0.0213	0.0072	752.00	
	1. sa	0.0148	0.0221	0.0291	0.0220	0.0072	780.00	
	24. sa	0.0186	0.0278	0.0370	0.0278	0.0092	1012.00	
	48. sa	0.0210	0.0424	0.0446	0.0360	0.0130	1340.00	
	72. sa	0.0222	0.0426	0.0459	0.0369	0.0128	1376.00	

UV12 uygulanmış %10 (w/w) PETA içeren PEO fiber örgülerin 37°C'de kuruma süresine bağlı şişme tablosu

Kuruma Süresi (gün)	Ağırlıklar (g)	1. Örnek	2. Örnek	3. Örnek	Ort.	S. Sapma	% Şişme	Gözlem
	Kuru	0.0036	0.0022	0.0018	0.0025	0.0009		
	Şişme Süresine Göre							
1	10. dak	0.0251	0.0196	0.0186	0.0211	0.0035	732.89	şişme sırasında küçülme ve büzülme
	1. sa	0.0405	0.0219	0.0201	0.0275	0.0113	985.53	
	24. sa	0.0465	0.0285	0.0248	0.0333	0.0116	1213.16	
	48. sa	0.0476	0.0298	0.0261	0.0345	0.0115	1261.84	
	72. sa	0.0425	0.0284	0.0242	0.0317	0.0096	1151.32	jelleşmede artış
		0.0028	0.0019	0.0043	0.0030	0.0012		
3	10. dak	0.0252	0.0144	0.0368	0.0255	0.0112	748.89	şişme sırasında küçülme ve büzülme
	1. sa	0.0255	0.0158	0.0394	0.0269	0.0119	796.67	
	24. sa						-100.00	
	48. sa	0.0339	0.0217	0.0571	0.0376	0.0180	1152.22	
	72. sa	0.0347	0.0219	0.0601	0.0389	0.0194	1196.67	
	96. sa	0.0357	0.0214	0.0637	0.0403	0.0215	1242.22	kararlılık iyi
		0.0052	0.0025	0.0041	0.0039	0.0014		
6	10. dak	0.0420	0.0198	0.0329	0.0316	0.0112	702.54	büzülme yok, küçülme az
	1. sa	0.0410	0.0204	0.0334	0.0316	0.0104	703.39	
	24. sa	0.0469	0.0239	0.0391	0.0366	0.0117	831.36	
	48. sa	0.0483	0.0250	0.0440	0.0391	0.0124	894.07	
	72. sa	0.0533	0.0261	0.0470	0.0421	0.0142	971.19	
	96. sa	0.0558	0.0270	0.0498	0.0442	0.0152	1023.73	kararlılık iyi
		0.0030	0.0017	0.0043	0.0030	0.0013		
8	10. dak	0.0195	0.0117	0.0271	0.0194	0.0077	547.78	küçülme ve büzülme yok
	24. sa	0.0189	0.0121	0.0301	0.0204	0.0091	578.89	
	48. sa	0.0203	0.0145	0.0317	0.0222	0.0088	638.89	
	72. sa	0.0226	0.0157	0.0361	0.0248	0.0104	726.67	
	96. sa	0.0251	0.0165	0.0369	0.0262	0.0102	772.22	kararlılık iyi

UV12 uygulanmamış %10 (w/w) PETA içeren PEO fiber örgülerin 37°C'de kuruma

süresine bağlı şişme tablosu

Kuruma Süresi (gün)	Ağırlıklar (g)	1. Örnek	2. Örnek	3. Örnek	Ort.	S. Sapma	% Şişme	Gözlem
	Kuru	0.0021	0.0044	0.0040	0.0035	0.0012		
	Şişme Süresine Göre							
1	10. dak	0.0162	0.0259	0.0243	0.0221	0.0052	532.38	şişme sırasında küçülme ve büzülme
	1. sa	0.0205	0.0406	0.0384	0.0332	0.0110	847.62	
	24. sa	X	X	X	X			aşırı jelleşme
3		0.0027	0.0034	0.0023	0.0028	0.0006		
	10. dak	0.0250	0.0313	0.0232	0.0265	0.0043	846.43	şişme sırasında küçülme ve büzülme
	1. sa	0.0281	0.0358	0.0252	0.0297	0.0055	960.71	
	48. sa	0.0406	0.0513	0.0357	0.0425	0.0080	1419.05	
	72. sa	0.0400	0.0496	0.0336	0.0411	0.0081	1366.67	kararlılık iyi
6		0.0016	0.0016	0.0027	0.0020	0.0006		
	10. dak	0.0118	0.0130	0.0236	0.0161	0.0065	720.34	büzülme yok küçülme az
	1. sa	0.0114	0.0132	0.0225	0.0157	0.0060	698.31	
	24. sa	0.0144	0.0160	0.0281	0.0195	0.0075	891.53	
	48. sa	0.0155	0.0174	0.0320	0.0216	0.0090	1000.00	
	72. sa	0.0156	0.0184	0.0344	0.0228	0.0101	1059.32	
	96. sa	0.0172	0.0193	0.0354	0.0240	0.0100	1118.64	kararlılık iyi
8		0.0049	0.0032	0.0040	0.0040	0.0009		
	10. dak	0.0352	0.0223	0.0305	0.0293	0.0065	627.27	küçülme ve büzülme yok
	1. sa	0.0362	0.0233	0.0304	0.0300	0.0065	642.98	
	24. sa	0.0488	0.0284	0.0410	0.0394	0.0103	876.86	
	48. sa	0.0543	0.0300	0.0422	0.0422	0.0122	945.45	
	72. sa	0.0682	0.0301	0.0466	0.0483	0.0191	1097.52	
	96. sa	0.0700	0.0312	0.0450	0.0487	0.0197	1108.26	kararlılık iyi

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Murat Şimşek
Doğum Yeri : Artvin
Medeni Hali : Evli
E-posta : muratsimsek08@gmail.com
Adresi : Atatürk Mah. Şehit Adil Arınmış Sok. 9-14 Sincan-Ankara

Eğitim

Lise : Sincan Lisesi
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik Bölümü
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Bil. Ens. Biyomühendislik ABD
Doktora : Hacettepe Üni. Fen Bil. Ens. Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce-ileri derecede

İş Deneyimi

Öğretim Görevlisi- Ahmet Yesevi Üni. Uzaktan Eğitim Fakültesi (04/2006-07/2009)
Satış Aplikasyon Sorumlusu- Radmed A.Ş. (04/2006-07/2008)
Büro Memuru - Hacettepe Üniversitesi Öğrenci Evleri (1999 -2004)

Deneyim Alanları

Doku mühendisliği, biyomalzemeler, elektroçirme.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Elektroçirme ile Nanodesenlenmiş Kitosan Yüzeylerde Hücresel Davranışların İncelenmesi (110M381 nolu Tübitak Projesi, proje bursiyeri, 2011)-Bütçesi: 25,000 TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Chitosan and PCL Membranes Patterned via Electrospinning: Effect of Underlying Chemistry and Pattern Characteristics on Epithelial/Fibroblastic Cell Behaviour. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2012;100A, 3332–3343.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- **Murat Şimşek**, Sevcan Dalkıranıoğlu Aldemir, and MenemŒe GümüŒdereliođlu, 'Electrospun PEO Nanofiber-Coated Titanium Surfaces', 19th International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED2013), 12–15 Kasım 2013, KuŒadası, İzmir (sözlü sunum).
- **Murat Şimşek**, Soner Çakmak, and MenemŒe GümüŒdereliođlu, 'Polyethylene Oxide Nanofibers: Effects of Electrospinning and Crosslinking Conditions', 19th International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED2013), 12–15 Kasım 2013, KuŒadası, İzmir (poster).
- **Murat Şimşek**, Sevcan Dalkıranıoğlu Aldemir, and MenemŒe GümüŒdereliođlu, 'Electrospun PEO Nanofiber-Coated Titanium Surfaces', EuroNanoForum,18-20 Haziran 2013, Dublin (İrlanda) (poster)
- **Murat Şimşek**, Merve Çapkın, AyŒe Karakeçili and MenemŒe GümüŒdereliođlu, 'Different Cellular Morphologies on Polycaprolactone Membranes Patterned with Aligned and Random Nanofibers', 8. Nanobilim ve Nanoteknoloji Kongresi, 25-29 Haziran 2012, Ankara (poster).
- **Murat Şimşek**, Merve Çapkın, AyŒe Karakeçili and MenemŒe GümüŒdereliođlu, 'Cell-Material Interactions on Patterned Chitosan and PCL Surfaces', 17. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, 23-25 Kasım 2011, Ankara (sözlü sunum).
- **Murat Şimşek**, Merve Çapkın, AyŒe Karakeçili ve MenemŒe GümüŒdereliođlu, 'Elektroeğirme ile NanodesenlenmiŒ Yüzeyleerde Hücre Morfolojisinin Görüntülenmesi', 20. Elektron Mikroskopi Kongresi, 25-28 Ekim 2011, Antalya (sözlü sunum).
- **Murat Şimşek**, Merve Çapkın, AyŒe Karakeçili and MenemŒe GümüŒdereliođlu, 'Investigation of Cellular Morphology on Nanopatterned Chitosan Membranes via Electrospinning', 7. Türkiye Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı 27 Haziran-1 Temmuz 2011, İstanbul (poster).