

**P3HB VE PBA POLİMERLERİ İKİLİ KARIŞIMLARININ  
DOKU İSKELESİ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**EVALUATION OF BINARY BLENDS OF P3HB AND PBA  
POLYMERS AS A TISSUE SCAFFOLD**

**Elvan KONUK**

**Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**

**Tez Danışmanı**

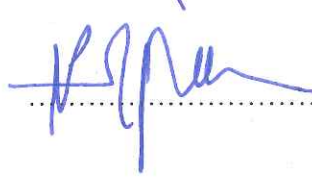
Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

**Elvan KONUK**' un hazırladığı "P3HB ve PBA Polimerleri İkili Karışımlarının Doku İskelesi Olarak Değerlendirilmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Necdet SAĞLAM  
Başkan



Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU  
Danışman



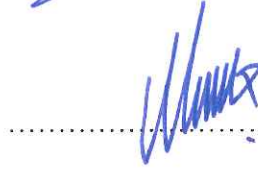
Prof. Dr. Mehlika PULAT  
Üye



Doç. Dr. Eylem GÜVEN  
Üye



Yrd. Doç. Dr. Murat ŞİMŞEK  
Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

- Tezimin/Raporumun 19/06/2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

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

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

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

19 / 06 / 2017



Elvan KONUK

*Aykut'a ve aydınlık yarınlara...*

## ETİK

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

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

beyan ederim.

14/06/2017



ELVAN KONUK

## ÖZET

### **P3HB VE PBA POLİMERLERİ İKİLİ KARIŞIMLARININ DOKU İSKELESİ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**ELVAN KONUK**

**Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**

**Haziran 2017, 93 sayfa**

Tez çalışması kapsamında bir biyopoliester olan poli-3-hidroksibutirat (P3HB), hidrojen transfer polimerizasyonu ile sentezlenen ve daha önce hiçbir doku mühendisliği çalışmasında kullanılmamış olan poli- $\beta$ -alanin (PBA), PBA kopolimeri poli( $\beta$ -alanin-ko-etilenoksit) (PMBA), PBA türevi poli(N-(3-metoksipropil)- $\beta$ -alanin) (PNMPBA) poliamitleri ile katkılanarak yeni bir doku iskelesi malzemesi üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu katkılama ile aynı zamanda P3HB'nin olumsuz özelliklerinin giderilmesi de amaçlanmıştır. Doku iskelesi üretimi için, dondurarak kurutma ve elektroçirgeme yöntemleri kullanılmıştır.

Dondurarak kurutma yöntemiyle %5 P3HB ve P3HB'ye oranla kütlece %2, %5 ve %10 oranlarında PBA, PNMPBA ve PMBA içeren P3HB 3 boyutlu (3B) süngerimsi doku iskeleleri elde edilmiştir. İskeleler üzerinde basma mekanik testleri uygulanmış, P3HB ve %2 PBA içeren doku iskelelerinde sıkıştırma direnci değerleri sırasıyla  $14.00 \pm 0.00$  kPa ve  $5.66 \pm 1.04$  kPa olarak, elastik modül değerleri ise sırasıyla  $27.40 \pm 0.00$  kPa ve  $12.06 \pm 3.20$  kPa olarak bulunmuştur. Yapılan katkılamaların P3HB'nin kristal yapısına olan etkisini araştırmak amacıyla X-ışını kırınımı (XRD) analizi gerçekleştirilmiştir. P3HB'nin kristalinitesi %52.70 olarak bulunurken; %2 PBA, PNMPBA ve PMBA katkılaması yapılmış grupların kristalinitesi sırasıyla %48.84, %42.50 ve %46.84; %5 PBA, PNMPBA ve PMBA katkılaması yapılmış grupların kristalinitesi sırasıyla %46.46, %46.01 ve %46.61; %10 PBA, PNMPBA ve PMBA katkılaması yapılmış grupların kristalinitesi ise sırasıyla

%36.91, %41.21 ve %46.27 olarak bulunmuştur. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonuçları değerlendirilmiş, ve dondurarak kurutma yöntemi ile üretilen iskelelerin doku mühendisliği uygulamalarına uygun olmadığı tespit edilmiştir.

Elektroegirme aşamasında geleneksel elektroegirme ve ıslak elektroegirme teknikleri kullanılarak sırasıyla 2 boyutlu (2B) ve 3B fibröz doku iskeleleri elde edilmiştir. Geleneksel elektroegirme için %5 (w/v) P3HB ve %10 PBA (w/w) hekzafloroizopropanol (HFIP) içerisinde çözdürülmüş ve elektroegirme koşullarının optimizasyonundan sonra 15 kV voltaj, 22.5 cm şırınga-toplayıcı uzaklığı ve 1.0 mL/sa akış hızı optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Islak elektroegirme için ise %10 (w/v) P3HB ve %10 (w/v) PBA HFIP içerisinde çözdürülmüş ve elektroegirme koşullarının optimizasyonundan sonra 15 kV voltaj, 1 mL/sa akış hızı ve 16.5 cm şırınga-toplayıcı uzaklığı koşulları seçilmiştir.

Geleneksel elektroegirme yöntemiyle üretilen %5 P3HB ve %10 PBA katkılı P3HB fiberlerin çapları sırasıyla  $4.44 \pm 1.81 \mu\text{m}$  ve  $3.21 \pm 1.82 \mu\text{m}$ , ıslak elektroegirme ile üretilen %10 P3HB ve %10 PBA katkılı P3HB fiberlerin çapları ise sırasıyla  $5.08 \pm 1.57 \mu\text{m}$  ve  $5.12 \pm 1.63 \mu\text{m}$  olarak bulunmuştur. Çekme testleri geleneksel elektroegirme ile üretilen 2B fibröz matrislere uygulanmıştır. İskelelerin çekme dirençleri sırasıyla 4.00 MPa ve 8.20 MPa olarak bulunurken, elastik modül değerleri sırasıyla 152.00 MPa ve 290.00 MPa olarak bulunmuştur. Ayrıca 2B iskeleler üzerinde su temas açısı ölçümleri gerçekleştirilmiştir. İskelelerin su temas açıları %5 P3HB için  $88.30 \pm 19.90^\circ$ , %10 PBA katkılı P3HB için  $48.90 \pm 9.00^\circ$ 'dir. Su alım kapasitesi ölçümleri ise ıslak elektroegirme yöntemi ile üretilen doku iskeleleri ile yapılmıştır. Üç boyutlu fibröz doku iskelelerinin su alım kapasiteleri %10 P3HB için  $356.70 \pm 25.00$  olarak, %10 PBA katkılı P3HB için ise  $443.60 \pm 101.10$  olarak hesaplanmıştır.

Hücrel uyumluluğun incelenebilmesi için P3HB ve PBA katkılı P3HB fibröz 3B iskeleler ile MC3T3-E1 preosteoblastik hücre hattı kullanılarak hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla mitokondriyal canlılık analizi (MTT) ve hücre morfolojisinin takibi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak PBA katkılmasının P3HB'nin doku mühendisliği açısından olumsuzluk yaratan yüksek kristalinite, yüksek hidrofobisite gibi olumsuz özelliklerini iyileştirdiği ve mekanik açıdan olumlu özellikler katarak hücrel uyumluluğu arttırdığı tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Poli-3-hidroksibutirat; poli- $\beta$ -alanin; doku iskelesi; dondurarak kurutma; geleneksel elektroegirme; ıslak elektroegirme.

## **ABSTRACT**

### **EVAULATION OF BINARY BLENDS OF P3HB AND PBA POLYMERS AS A TISSUE SCAFFOLD**

**ELVAN KONUK**

**Master of Science, Nanotechnology and Nanomedicine Division**

**Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**

**June 2017, 93 pages**

In the thesis study, to produce a novel tissue engineering material, a biopolyester poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) reinforced with poly- $\beta$ -alanine (PBA), PBA copolymer poly( $\beta$ -alanine-co-ethyleneoxide (PMBA), PBA derivative poly(N-(3-methoxypropyl)- $\beta$ -alanine) (PNMPBA) polyamides, which were synthesized by hydrogen transfer polymerization, were used for the first time in the field of tissue engineering. Elimination of negative features of P3HB by reinforcement was also aimed. Freeze drying and electrospinning methods were selected for the production of tissue scaffolds.

Five percent P3HB and P3HB reinforced with PBA, PNMPBA and PMBA with 2%, 5% and 10% by mass relative to P3HB 3-dimensional (3D) sponge-like tissue scaffolds were obtained by freeze-drying method. Mechanical compression tests were applied on the scaffolds and the compressive strength values were found as  $14.00 \pm 0.00$  kPa and  $5.66 \pm 1.04$  kPa, the elastic modulus values were found as  $27.40 \pm 0.00$  kPa and  $12.06 \pm 3.20$  kPa for the P3HB and 2% PBA scaffolds, respectively. X-ray diffraction (XRD) analysis was performed to investigate the effect of the reinforcement on the crystal structure of P3HB. The crystallinity of the P3HB is found as 52.70%; and the crystallinity of the 2% PBA, PNMPBA and PMBA doped groups were 48.84%, 42.50% and 46.84%; the crystallinity of the 5% PBA, PNMPBA and PMBA doped groups was 46.46%, 46.01% and 46.61%, the crystallinity of 10% PBA, PNMPBA and PMBA doped groups were 36.91%, 41.21% and



46.27%, respectively. According to the characterization results, it has been determined that the scaffolds which produced with freeze-drying method were not suitable for tissue engineering applications.

Two-dimensional (2D) and 3D fibrous tissue scaffolds were obtained by using conventional electrospinning and wet electrospinning techniques, respectively. For conventional electrospinning, 5% (w/v) P3HB and 10% PBA (w/w) were dissolved in hexafluoroisopropanol (HFIP) and 15 kV voltage, 22.5 cm syringe-collector distance and 1.0 mL/h flow rate have been determined as convenient conditions after optimization of electrospinning conditions. For wet electrospinning, 10% (w/v) P3HB and 10% (w/v) PBA were dissolved in HFIP and 15 kV voltage, 16.5 cm syringe-collector distance and 1 mL/h flow rate conditions were selected after optimization of the electrospinning conditions.

Diameters of 5% P3HB and 10% PBA doped P3HB fibers produced by conventional electrospinning method were  $4.44\pm 1.81\ \mu\text{m}$  and  $3.21\pm 1.82\ \mu\text{m}$ , and the diameters of 10% P3HB and 10% PBA doped P3HB fibers produced by wet electrospinning were  $5.08\pm 1.57\ \mu\text{m}$  and  $5.12\pm 1.63\ \mu\text{m}$ , respectively. Tensile tests were performed on 2D fibrous matrices produced by conventional electrospinning. The tensile strengths of the scaffolds were found as 4.00 MPa and 8.20 MPa, while the elastic modulus values were found as 152.00 MPa and 290.00 MPa, respectively. In addition, water contact angle analysis was performed on 2D fiber scaffolds. The water contact angles of the scaffolds were found  $88.30\pm 19.90^\circ$  for 5% P3HB and  $48.90\pm 9.00^\circ$  for P3HB with 10% PBA, respectively. Water uptake capacity measurements were performed with tissue scaffolds produced by wet electrospinning. The water uptake capacities of three dimensional fibrous tissue scaffolds were found  $356.70\pm 25.00\%$  for 10% P3HB and  $443.60\pm 101.10\%$  for P3HB doped 10% PBA.

Cell culture studies were carried out with P3HB and PBA doped P3HB fibrous 3B scaffolds and MC3T3-E1 preosteoblastic cell line to examine cellular compatibility. For determining cell viability and cell morphology mitochondrial viability assay (MTT) and scanning electron microscope (SEM) analysis were applied, respectively.

In conclusion, it has been found that PBA doping enhance P3HB's some negative properties in terms of tissue engineering such as high crystallinity, high hydrophobicity and it improves cellular compatibility by adding positive mechanical aspects.

**Key words:** Poly-3-hydroxybutyrate, poly- $\beta$ -alanine, tissue scaffold, freeze-drying, traditional electrospinning, wet electrospinning.

## TEŞEKKÜR

Öğrencilik hayatım boyunca bana yol gösteren, hatalarımı gösterip her zaman daha iyi olmam için yönlendiren, destek veren, dinleyen, bilim insanı kimdir; bilim nasıl yapılır sorularının cevabını öğreten, kendime güvenmediğim ve inanmadığım dönemlerde bile bana inanan ve güvenen, hayallerimi gerçekleştirmem için her zaman motive eden, büyük bir ailenin içine dahil olmamı sağlayan, sadece danışmanım değil aynı zamanda her anlamda öğretmenim olan çok sevdiğim ve saygı duyduğum pek kıymetli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu**'na teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin ana fikrini oluşturan, kullandığım polimerleri büyük uğraşlar ile bana sağlayan **Yrd. Doç. Dr. Efkan Çatiker** hocama emekleri ve yardımları için teşekkürlerimi sunarım.

Gerçek dostlukların mumla arandığı bugünlerde bana gerçek bir dost olan, arkadaşım, destekçim, laboratuvara ilk geldiğim günden beri beni büyük bir sabır ile yetiştiren, zor günlerimde beni içtenlikle dinleyen, yardımcı olan, birlikte sohbet etmekten, gülmekten, ağlamaktan, yemek yapmaktan, eğlenmekten büyük zevk aldığım, her koşulda uyuyakalmasıyla yarım kalan filmlerimizin başrol oyuncusu ponçık **Tüçe'me** teşekkürlerimi sunarım.

Soğukkanlılığı, sevecenliği, içtenliği ve desteğiyle her daim hayatımda bulunmasını istediğim, bilimsel sohbetlerinden ve çalışmalarından çok şey öğrendiğim, hiçbir sorumu cevapsız bırakmayan canım arkadaşım ve dostum toştoshum **Şeymatoş'uma**, günlerimize neşe ve umut saçan, pozitif düşünceleriyle her zaman bizi karamsarlıktan kurtaran Heidi'miz **Ebruş'uma**, obsesifliği ile hem kendini hem bizi darlayan ama tertemiz kalbi ile hepsini unutturan **Arş. Gör. Demet Çakır'a**, kahkahalarıyla labımızı inleyen **Meltem Gamze Öztürk'e**, sakinliği ve sevecenliği ile bana her zaman ablalık yapan, üstün bilgisiyile bir o kadar da şey öğreten **Dr. Anıl Sera Çakmak'a**, laboratuvarımızı çekip çeviren, her derdimizi dinleyen, gönlü kocaman **Özge Ekin Akdere'ye**, hızlı hızlı konuşmalarına hala alışamadığım, kendi alanındaki bilgisini ve azmini örnek aldığım **Yrd. Doç. Dr. Merve Çapkın Yurtsever'e**, laboratuvarımızın doktoru, her sorunumuza çare bulan **Dr. Gamze Dereli Can'a**, sohbetine doyum olmayan canım hocamız **Dr. Damla Çetin Altındal'a**, Polyanna'mız **Yrd. Doç. Dr. Işıl Gerçek Beşkardeş'e**, her sabah laboratuvarı birlikte açtığım **Gökçe Kaynak Bayrak'a**,

Birlikte çalışmaktan mutlu olduğum, hepsinden çok şey öğrendiğim, **Yrd. Doç. Dr. Murat Şimşek'e**, **Dr. Soner Çakmak'a**, **Dr. Tuğrul Tolga Demirtaş'a**, **Gülseren Irmak'a**, **Arş. Gör. Ülkü Bozoğlu'na**, **Sena Koç**, **Tülay Selin Ertekin**, **Gülnihal Tok** ve **Aslı Sena Karanfil**, **Burcu Sarıkaya'ya**, tanıdığım herkesin taklidini mükemmel bir şekilde yapabilen **Atakan Tevlek'e**,

Hayatıma anlam, sevgi, saygı, içtenlik ve anlayış katan, her koşulda destek olan, beni sürekli mutlu etmeye çalışan, isteklerime ve hayallerime ulaşmaya çalışırken yanımda yürüyen, kendimi bulmamı sağlayan, beni ben yapan **Aykut Tokak'a**,

Kocaman adam olsa da hala benim küçük kardeşim olarak kalacak olan **Cem Noyan Konuk'a**, beni bugünlere getiren, hayatı öğreten, destekleyen annem **Meral Konuk** ve babam **Cüneyt Konuk'a**, asla başımızdan eksik olmamasını dilediğim pamuk kurbağam **Ferhunde Özel'e**,

**Sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.**

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER .....	v
ÇİZELGELER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Doku Mühendisliği ve Doku Mühendisliği Yaklaşımları .....	3
2.2. Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Biyomalzemeler.....	6
2.2.1. Polimerik biyomalzemeler.....	9
2.2.2. Seramik biyomalzemeler .....	14
2.2.3. Kompozit biyomalzemeler .....	16
2.3. Doku İskelesi Üretim Yöntemleri.....	17
2.3.1. Dondurarak kurutma yöntemi.....	19
2.3.2. Elektroğirme yöntemi .....	20
2.3.2.1. Üç boyutlu fibröz doku iskeleleri üretiminde kullanılan elektroğirme yöntemleri .....	24
2.4. Poli (3-hidroksibütirat) (P3HB)'nin Yapısı ve Fiziksel Özellikleri .....	26
2.4.1. P3HB'nin doku mühendisliğinde kullanımı .....	30
2.5. Poli-β-alanin (PBA) ve Türevleri'nin Yapısı ve Fiziksel Özellikleri.....	34
2.5.1. PBA ve türevlerinin doku mühendisliğinde kullanımı .....	35
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	37
3.1. Kullanılan Malzemeler .....	37
3.2. P3HB ve PBA/türevleri ile Katkılanmış Doku İskelelerinin Üretimi .....	38
3.2.1. Dondurarak kurutma yöntemi.....	39
3.2.2. Elektroğirme yöntemi .....	40
3.2.2.1. Geleneksel elektroğirme .....	40
3.2.2.2. Üç boyutlu elektroğirme .....	41
3.3. Doku İskelelerinin Karakterizasyonu .....	42

3.3.1. Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin karakterizasyonu .	42
3.3.1.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi .....	42
3.3.1.2. Mekanik dayanım testleri .....	42
3.3.1.3. Enzimatik ve hidrolitik bozunma testleri.....	43
3.3.1.4. X ışını kırınımı (XRD) analizi.....	43
3.3.1.5. Sitotoksosite testleri.....	43
3.3.2. Elektroğirme yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin karakterizasyonu .....	44
3.3.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi .....	44
3.3.2.2. Mekanik dayanım testleri .....	44
3.3.2.3. Su alım kapasitesi ölçümü .....	45
3.3.2.4. Su temas açısı (WCA) ölçümü .....	45
3.4. Hücre Kültür Çalışmaları .....	45
3.4.1. MC3T3-E1 hücre hattı ile yapılan hücre kültür çalışmaları .....	45
3.4.1.1. SEM analizi .....	46
3.4.1.2. MTT analizi .....	46
3.4.1.3. İstatistiksel analiz .....	47
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	48
4.1. P3HB ve PBA Polimerleri.....	48
4.1.1. Polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu .....	49
4.1.1.1. Poli- $\beta$ -alanin (PBA) sentezi ve karakterizasyonu.....	49
4.2. P3HB ve PBA/Türevleri ile Katkılanmış Doku İskelelerinin Üretimi .....	53
4.2.1. Dondurarak kurutma yöntemi.....	53
4.2.2. Elektroğirme yöntemi .....	54
4.2.2.1. Geleneksel elektroğirme .....	54
4.2.2.2. Üç boyutlu elektroğirme .....	54
4.3. Doku İskelelerinin Karakterizasyonu .....	55
4.3.1. Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin karakterizasyonu .	55
4.3.1.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi .....	56
4.3.1.2. Mekanik dayanım testleri .....	59
4.3.1.3. Enzimatik ve hidrolitik bozunma testleri.....	61
4.3.1.4. X ışını kırınımı (XRD) analizi.....	63
4.3.1.5. Sitotoksosite testleri.....	64
4.3.2. Elektroğirme yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin karakterizasyonu .....	65
4.3.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi .....	65
4.3.2.2. Mekanik dayanım testleri .....	69

4.3.2.3. Su alım kapasitesi ölçümü .....	71
4.3.2.4. Su temas açısı (WCA) ölçümü .....	72
4.4. Hücre Kültürü Sonuçları.....	75
4.4.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi .....	76
4.4.2. MTT analizi .....	78
5. GENEL SONUÇLAR .....	80
6. KAYNAKLAR.....	84
ÖZGEÇMİŞ.....	93

## ŞEKİLLER

### Sayfa

Şekil 2.1. Doku mühendisliğinde “top-down” ve “bottom-up” yaklaşımlar.....	4
Şekil 2.2. Doku iskelesi temelli doku mühendisliği yaklaşımındaki işlem basamaklarının şematik gösterimi.....	5
Şekil 2.3. Doku mühendisliğinde ideal doku oluşum süreci .....	6
Şekil 2.4. Doku mühendisliğinde kullanılan bazı doğal polimerler, a) Kollajen, b) Aljinat, c) Kitosan.....	10
Şekil 2.5. Doku mühendisliğinde kullanılan bazı sentetik polimerler, a) Polilaktik asit (PLA), b) Poliglikolik asit (PGA), c) Polikaprolakton (PCL) .....	12
Şekil 2.6. Sentetik polimerlerde hidrolitik bozunma, a) Kütleli bozunma, b) Yüzey erozyonu .....	13
Şekil 2.7. Doku mühendisliğinde kullanılan bazı seramikler, a) Biyoinert seramikler; sırasıyla alüminyum oksit ( $Al_2O_3$ /alümina), zirkonyum oksit ( $ZrO_2$ /zirkonia) ve titanyum oksit ( $TiO_2$ ), b) Kalsiyum fosfat, c) Hidroksiapatit .....	15
Şekil 2.8. Kompozit doku iskeleleri a) Kollajen-GAG (CG) doku iskelesi, b) Hidroksiapatit (HA) doku iskelesi, c) Kollajen-Hidroksiapatit (CHA) kompozit doku iskelesi, d) İki fazlı kompozit doku iskelesi .....	16
Şekil 2.9. Parçacık uzaklaştırma yöntemleri, a) çözücü-döküm/parçacık uzaklaştırma, b) eriyik kalıplama/parçacık uzaklaştırma .....	17
Şekil 2.10. Gaz köpükleştirme yönteminde gaz kabarcıklarının oluşumu ( $P_{gaz}$ : Gaz basıncı, $P^*_{gaz}$ : Kısmi basınç) .....	18
Şekil 2.11. a) Faz diyagramı, b) Dondurarak kurutma sistemi.....	19
Şekil 2.12. Taylor konisinin zamana bağlı oluşumu .....	20
Şekil 2.13. Elektroğirme düzeneği bileşenleri .....	21
Şekil 2.14. İskele mimarisinin hücre tutunması ve yayılması üzerine etkisi [20] .....	24

Şekil 2.15. Üç boyutlu fibröz doku iskelesi üretim yöntemleri, a) Geleneksel elektroğirme ile üretilmiş fibröz tabakaların bir araya getirilmesi, b) Toplayıcı modifikasyonu, c) İki boyutlu fiberlerin katmanlar halinde toplanması, d) Islak elektroğirme .....	25
Şekil 2.16. PHA polimerleri, a) PHA polimerlerinin genel kimyasal yapısı, b) P3HB polimerinin kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2.17. P3HB kopolimer ve kompozitlerini içeren iskelelerin bazı in vivo uygulamaları, a) Desellülarize domuz aort kapağı/PHBHHx hibrit kalp valfi, b) Tavşan abdominal aorta implante edilen PHBHHx/desellülarize vasküler hibrit yaması, c) İki aylık postoperatif dönemde 10 cm PHBHHx özofagusta oluşan kalın bir hücre tabakası, d) Sıçanların siyatik sinirinde 10 mm'lik kusurları köprüleyen PHBHHx sinir kabloları, e) TCP, PHBHHx ve P(3HB-4HB-3HHx) iskeleler üzerinde insan MSC'lerin osteojenik farklılaşması, f) Kıkırdak hasarlarını onaran PHBHHx implant ([23]'ten değiştirilerek).....	31
Şekil 2.18. a) $\alpha$ -alanin (sol) ve $\beta$ -alanin (sağ) yapıları, b) Poli- $\beta$ -alanin'in moleküler yapısı .....	34
Şekil 2.19. PBA kopolimeri ve PBA türevi, a) Poli( $\beta$ -alanin-ko-etilenoksit) (PMBA), b) poli(N-(3-metoksipropil)- $\beta$ -alanin)) (PNMPBA) .....	35
Şekil 3.1. Dondurarak kurutma yöntemiyle doku iskelesi eldesi aşamaları. 1) P3HB polimerine %2, %5 ve %10 (w/v) oranlarında sırasıyla PBA, PNMPBA ve PMBA katkılanmasının yapılması. 2) Polimer çözeltisine eklenen gözenek yapıcı ajan ile emülsiyon oluşturulması. 3) Ön dondurma aşaması. 4) Dondurarak kurutma ile 3B gözenekli doku iskelesi eldesi.....	40
Şekil 3.2. Geleneksel elektroğirme yöntemiyle 2B fibröz doku iskelesi eldesi aşamaları	41
Şekil 3.3. Islak elektroğirme yöntemiyle 3B fibröz doku iskelesi eldesi aşamaları .....	42
Şekil 4.1. PBA polimerinin akrilamitin hidrojen transfer polimerizasyonu ile sentezi.....	49
Şekil 4.2. Poli- $\beta$ -alaninin (PBA) FTIR spektrumu .....	50
Şekil 4.3. Poli- $\beta$ -alaninin (PBA) <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....	51
Şekil 4.4. Poli- $\beta$ -alaninin genişletilmiş <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....	52
Şekil 4.5. Poli- $\beta$ -alaninin (PBA) DSC termogramı.....	52
Şekil 4.6. Dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanmış doku iskeleleri a) %5 (w/v) P3HB, b) %5 (w/v) P3HB-%10 (w/w) PBA, c) %5 (w/v) P3HB-%10 (w/w) PNMPBA, d) %5 (w/v) P3HB-%10 (w/w) PMBA.....	55

Şekil 4.7. P3HB'nin %5'lik çözeltisiyle hazırlanan doku iskelelerinin üst ve alt yüzleri (farklı büyütme için kırmızı ölçek çubukları sırasıyla 100 µm, 20 µm, 10 µm ve 2 µm'yi temsil etmektedir) .....	56
Şekil 4.8. P3HB'nin %7.5'lük çözeltisiyle hazırlanan doku iskelelerinin üst ve alt yüzleri (farklı büyütme için kırmızı ölçek çubukları sırasıyla 100 µm, 20 µm, 10 µm ve 2 µm'yi temsil etmektedir) .....	57
Şekil 4.9. Kütlece %2, %5 ve %10 PBA ve türevlerini içeren P3HB (%5 w/v) iskelelerin, %5 P3HB (w/v) içeren iskeleler ile karşılaştırıldığı SEM fotoğrafları (Kırmızı ölçek çubuğu 20 µm'yi temsil etmektedir) .....	58
Şekil 4.10. Kütlece %2 PBA ve %10 PBA türevleri ile katkılanmış P3HB (%5 w/v) doku iskelelerinin 5 haftalık hidrolitik ve enzimatik bozunma analizi sonundaki SEM fotoğrafları (Kırmızı ölçek çubuğu 20 µm'yi temsil etmektedir) .....	61
Şekil 4.11. Dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen saf P3HB ve katkılama yapılmış P3HB iskelelerin XRD spektrumları, 1) %5 (w/v) P3HB, 2) %5 (w/v) P3HB-%2 (w/w) PBA, 3) %5 (w/v) P3HB-%5 (w/w) PBA, 4) %5 (w/v) P3HB-%10 (w/w) PBA, 5) %5 (w/v) P3HB-%2 (w/v) PMBA, 6) %5 (w/v) P3HB-%5 (w/v) PMBA, 7) %5 (w/v) P3HB-%10 (w/v) PMBA, 8) %5 (w/v) P3HB-%2 (w/v) PNMPBA, 9) %5 (w/v) P3HB-%5 (w/v) PNMPBA 10) %5 (w/v) P3HB-%10 (w/v) PNMPBA .....	63
Şekil 4.12. L929 hücrelerinin indirekt sitotoksikite testi sonucundaki canlılıkları. (İstatistiksel anlamlı farklılıklar • $p < 0.05$ aynı ekstrakt dilüsyonları için P3HB'nin kontrol grubu olduğu durum ve ** $p < 0.01$ %100 ekstrakt dilüsyonundaki P3HB kontrol grubu olduğu durum) .....	64
Şekil 4.13. Geleneksel elektroçirme yöntemi ile 15 kV voltaj, 22.5 cm şırınga-toplayıcı uzaklığı ve 1.0 mL/sa akış hızı parametrelerinde üretilmiş 2 boyutlu fiberlerin SEM fotoğrafları (sol-%10 w/v P3HB, sağ-%10 w/w PBA katkılanmış %10 w/v P3HB) (Kırmızı ölçek çubuğu sırasıyla 20 µm ve 2 µm'yi temsil etmektedir) .....	66
Şekil 4.14. Farklı parametrelerde ıslak elektroçirme işlemi ve farklı kurutma işlemi uygulanmış %10 (w/v) PBA katkılı %10 (w/v) P3HB fibröz doku iskelelerinin SEM fotoğrafları (Kırmızı ölçek çubuğu 100 µm'yi temsil etmektedir).....	67
Şekil 4.15. Islak elektroçirme yöntemi ile 15 kV voltaj, 16.5 cm şırınga-toplayıcı uzaklığı ve 1.0 mL/sa akış hızı parametrelerinde üretilmiş 2 boyutlu fiberlerin SEM fotoğrafları (sol-	



%10 (w/v) P3HB, sağ-%10 (w/w) PBA katkılanmış %10 (w/v) P3HB) (Kırmızı ölçek çubuğu sırasıyla 100 µm ve 20 µm'yi temsil etmektedir) .....	68
Şekil 4.16. Islak elektroğirme yöntemiyle hazırlanmış doku iskeleleri a) %5 (w/v) P3HB, b) %10 (w/v) P3HB-%10 (w/w) PBA .....	68
Şekil 4.17. Islak elektroğirme yöntemiyle elde edilen %10 (w/v) P3HB ve %10 (w/w) PBA katkılı %10 (w/v) P3HB fibröz doku iskelelerinin su alım kapasitesinin zamanla değişimi .....	71
Şekil 4.18. Hücre kültür çalışmasının 21. günündeki a) %10 (w/v) P3HB, b) %10 (w/w) PBA katkılı %10 (w/v) P3HB fibröz doku iskelelerinin fotoğrafları.....	75
Şekil 4.19. Hücre kültür çalışmasının 1, 7, 14 ve 21. günlerinde P3HB (%10 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%10 w/v) 3B fibröz doku iskelelerinin yüzeyindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM fotoğrafları (Kırmızı ölçek çubuğu sırasıyla 100 µm ve 20 µm'yi temsil etmektedir).....	76
Şekil 4.20. Hücre kültür çalışmasının 1, 7, 14 ve 21. günlerinde P3HB (%10 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%10 w/v) 3B fibröz doku iskelelerinin yüzeyindeki MC3T3-E1 hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$ , $\blacklozenge p < 0.05$ , $\blacklozenge\blacklozenge p < 0.01$ , $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge p < 0.001$ P3HB'nin üzerindeki hücrelerin ilk gün canlılık değerinin kontrol grubu olduğu durum, $*p < 0.05$ , $***p < 0.001$ aynı günde farklı grupların karşılaştırıldığı durum ve $\bullet\bullet p < 0.01$ %10 PBA içeren iskelelerin üzerindeki hücrelerin ilk gün canlılık değerinin kontrol grubu olduğu durum) .....	78

# ÇİZELGELER

## Sayfa

Çizelge 2.1. Doku iskelesi üretiminde kullanılan bazı biyomalzemeler .....	8
Çizelge 2.2. Doku mühendisliğinde kullanılan sentetik polimerlerin mekanik özellikleri ve bozunma davranışları ([14]'ten değiştirilerek) .....	14
Çizelge 2.3. Fiber morfolojisini etkileyen parametreler ([18]'den değiştirilerek) .....	21
Çizelge 2.4. PHA'ların tıbbi uygulamaları ([22]'den değiştirilerek) .....	27
Çizelge 2.5. PHA polimerlerinin çeşitli özelliklerinin karşılaştırılması, ([23]'ten değiştirilerek) .....	28
Çizelge 3.1. Dondurarak kurutma ve elektroğirme yöntemlerinde kullanılan polimerler ve katkılama oranları .....	39
Çizelge 4.1. PBA, PNMPBA ve PMBA'nın sentez koşulları ve özellikleri [94] .....	49
Çizelge 4.2. Dondurarak kurutma yöntemi ile üretilen doku iskelelerinin mekanik test sonuçları .....	60
Çizelge 4.3. P3HB ve PBA/türevleri ile katkılanmış P3HB doku iskelelerinin katkılamaya bağlı olarak değişen kristalinitesi (%) .....	64
Çizelge 4.4. Geleneksel elektroğirme yöntemi ile üretilen 2B ve ıslak elektroğirme yöntemi ile üretilen 3B doku iskelelerinin fiber çapları .....	69
Çizelge 4.5. Elektroğirme yöntemi ile üretilen doku iskelelerinin mekanik test sonuçları .....	70
Çizelge 4.6. Islak elektroğirme yöntemi ile üretilmiş 3B fibröz doku iskelelerinin denge durumundaki su alım kapasiteleri.....	71
Çizelge 4.7. P3HB ve PBA katkılı P3HB filmlerin su temas açısı değerleri .....	72
Çizelge 4.8. Farklı üretim teknikleri ile üretilmiş doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları özeti .....	74

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
Da	Dalton
G	giga
k	kilo
M	mega
$\mu$	mikro
m	mili
n	nano
N	Newton
Pa	Pascal
V	Volt

### Kısaltmalar

$\alpha$ -MEM	Minimum Essential Medium-Alfa Modifikasyonu
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
D-PBS	Dulbecco'nun fosfat tampon çözeltisi
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre – <i>Differential scanning calorimetry</i>
ECM	Hücre dışı matris – <i>Extracellular matrix</i>
EtOH	Etanol
FBS	Fötal sığır serumu – <i>Fetal Bovine Serum</i>
FTIR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi – <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GA	Glutaraldehit

HCl	Hidroklorik asit
HFIP	1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol
HMDS	Hekzametildisilazan
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür
P3HB	Poli-3-hidroksibutirat
PBA	Poli- $\beta$ -alanin
PBS	Fosfat tampon çözeltisi – <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PMBA	Poli( $\beta$ -alanin-ko-etilenoksit)
PNMPBA	Poli(N-(3-metoksipropil)- $\beta$ -alanin)
pH	Potansiyel hidrojen
PHA	Polihidroksialkonat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
TCPS	Hücre kültür kabı – <i>Tissue culture polystyrene</i>
UV	Ultraviyole
WC	Su alım kapasitesi
WCA	Su Temas Açısı – <i>Water Contact Angle</i>
XRD	X ışını kırınımı – <i>X Ray Diffraction</i>
$^1\text{H-NMR}$	Proton nükleer manyetik rezonans – <i>Proton nuclear magnetic resonance</i>
2B	İki boyutlu
3B	Üç boyutlu
v/v	Hacimce oran
w/v	Kütle-hacim oranı

# 1. GİRİŞ

İnsanın kendi doğasını anlama ve sorunlarına çözüm getirme arayışındaki yaklaşımlardan biri olan “doku mühendisliği”, son 30 yıldır üzerinde yoğun çalışmaların devam ettiği disiplinler arası bir bilimsel alanı oluşturmaktadır.

Kalıcı tedavi yöntemleri geliştirmeyi hedefleyen doku mühendisliği, insanın yaşam kalitesinin artırılmasında öncü bir konum üstlenmektedir. Mevcut tedavi yöntemlerinin yerini alacak yenilikçi ve etkili çözümler, söz konusu insan sağlığı olduğundan, birçok parametre göz önünde bulundurularak hayata geçirilmeye çalışılmaktadır. Bu parametrelerin temelinde geleneksel doku mühendisliği yaklaşımlarının ana bileşeni olan biyomalzeme seçimi yatar. Geçici olarak hasarlı bölgeyi dolduran, üzerindeki hücreler çoğalırken bir yandan bozunan, doku rejenerasyonunu sağlayan doku iskelelerinin üretiminde hala biyomalzeme kaynaklı sıkıntılar bulunmaktadır. Malzemelerin morfolojik, fiziksel, kimyasal, mekanik ve biyokimyasal özelliklerinin doğal doku özellikleriyle uyuşması ideal olarak istenen durumdur. Mevcut doğal ve sentetik polimerler, seramikler ve kompozit biyomalzemeler bu açıdan eksik kalmaktadır. Doğal dokuyu taklit edebilen malzemelerin geliştirilmesi amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. İnsan vücudu kompozit bir yapıdadır. Bu nedenle tek başına bir malzeme grubunun ilgili dokuyu taklit edebilmesi pek mümkün gözükmemektedir. Bu sorunun üstesinden gelebilmek için doğal ve sentetik polimer karışımları, seramik ve polimer kompozitleri hazırlanmaktadır. Ek olarak mevcut polimerlerin özelliklerinin iyileştirilebilmesi amacıyla polimerlere fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal çeşitli modifikasyonlar da yapılmaktadır.

Biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilme özelliklerine sahip olan poli-3-hidroksibutirat (P3HB), son yıllarda doku mühendisliği uygulamalarında üstün özellikleri nedeniyle sıklıkla karşımıza çıkan bir biyopoliesterdir [1]. P3HB'nin doku mühendisliği uygulamaları açısından olumsuzluk oluşturacak yüksek kristalinite [2,3], düşük biyobozunma hızı [4-6] ve yüksek hidrofobisite [7,8] kaynaklı bazı özellikleri de bulunmaktadır. Bu özelliklerin iyileştirilebilmesi için P3HB, aynı ya da farklı malzeme grupları ile veya çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlerle modifiye edilmelidir.

Sunulan tez çalışmasında P3HB, daha önce hiçbir çalışmada tek başına biyomalzeme olarak kullanılmamış olan ve ilk defa hidrojen transfer polimerizasyonu ile sentezlenen poli- $\beta$ -alanin (PBA), PBA kopolimeri poli( $\beta$ -alanin-ko-etilenoksit) (PMBA) ve PBA türevi poli(N-(3-metoksipropil)- $\beta$ -alanin) (PNMPBA) ile katkılanarak, P3HB'nin olumsuz özellikleri

giderilmeye çalışılmıştır. Doku iskelesi üretimi için **dondurarak kurutma** yöntemi ve **elektroegirme** olmak üzere 2 farklı üretim yöntemi kullanılmıştır. Elektroegirme aşamasında ise **geleneksel elektroegirme** ve **ıslak elektroegirme** olmak üzere 2 farklı elektroegirme tekniği ile doku iskeleleri üretilmiştir. Dondurarak kurutma yöntemiyle 3 boyutlu (3B) sünger benzeri doku iskeleleri elde edilirken; geleneksel elektroegirme ile 2 boyutlu (2B) fibröz, ıslak elektroegirme ile de 3B pamuksu fibröz doku iskeleleri elde edilmiştir.

Dondurarak kurutma yöntemi ile üretilmiş doku iskelelerinin morfolojik özellikleri, mekanik dayanımları, bozunma davranışları, kristal yapıları ve sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Ancak, bu yöntem ile üretilmiş olan doku iskelelerinin morfolojik ve mekanik olarak doku mühendisliği gerekliliklerini karşılamadığı tespit edilmiştir. Ardından P3HB'ye daha uygun olduğu düşünülen elektroegirme yöntemine geçilmiştir. Elektroegirme parametreleri optimize edilmiştir. Katkılama polimerleri olan PNMPBA ve PMBA'nın bu işlem için viskozite yetersizliğinden dolayı uygun olmadığı görülerek, çalışmalara yalnızca PBA katkılanması ile devam edilmiştir. Elektroegirme ile üretilmiş doku iskelelerinin morfolojik özellikleri, su alım kapasiteleri, mekanik dayanımları ve su temas açıları incelenmiştir. Daha önce hiçbir çalışmada doku iskelesi malzemesi olarak kullanılmamış olan P3HB ve PBA karışımlarından elde edilen iskelelerin hücre uyumluluğunun tespit edilebilmesi için 3B fibröz doku iskeleleri ile MC3T3-E1 pre-osteoblast hücre hattı kullanılarak 21 günlük hücre kültürü çalışması yapılmıştır. Deneysel bulgular değerlendirilerek uygun doku iskelesi seçilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

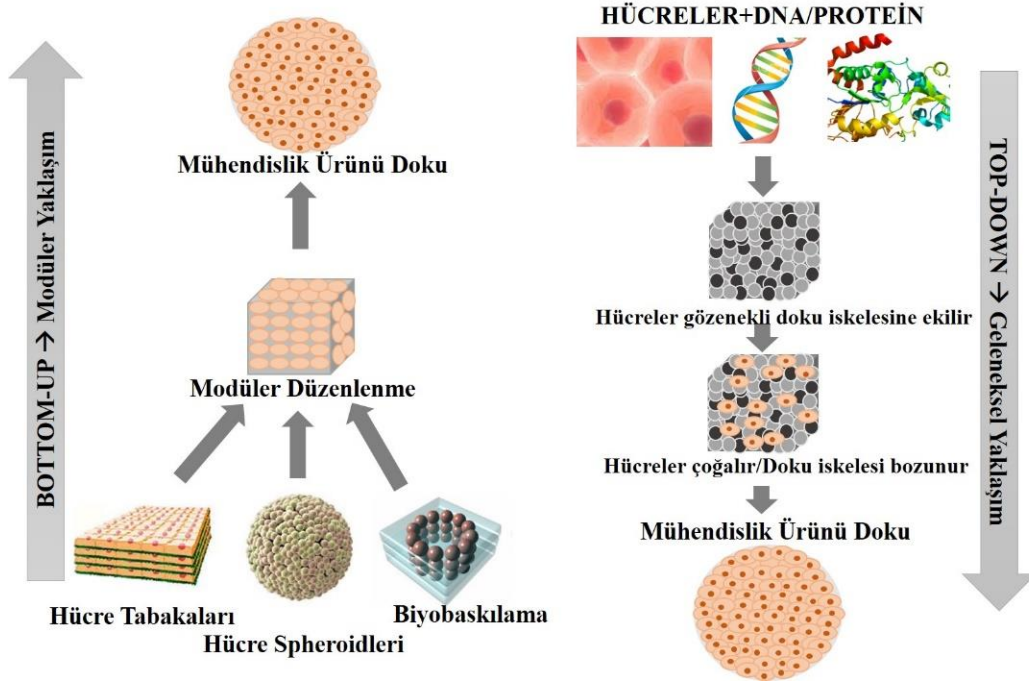
Tez çalışmasında yararlanılan literatür bilgileri bu bölümde özetlenmiştir. İlk bölümde doku mühendisliği ve doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemelerle ilgili bilgilendirme yapılmıştır. İkinci bölümde, doku iskelesi üretim yöntemleri incelenmiştir. Bu yöntemler arasından dondurarak kurutma ve elektroğirme yöntemleri tez çalışmasında kullanılan yöntemler olduğundan detaylı olarak açıklanmıştır. Son bölümde ise, tez çalışmasının temel doku iskelesi polimerleri olan P3HB ve PBA/türevleri hakkında bilgi verilmiş ve doku mühendisliği literatüründeki kullanımlarına ait bilgiler özetlenmiştir.

### 2.1. Doku Mühendisliği ve Doku Mühendisliği Yaklaşımları

Son yüzyılda özellikle çevresel koşulların ve insan yaşam şeklinin değişmesiyle birlikte, insanlık birçok hastalıkla karşı karşıya kalmıştır. Bu hastalıklar arasında çağımızın vebası sayılabilecek kanser, kalp krizi, diyabet, obezite, alerji, osteoporoz, Alzheimer ve depresyon önemli bir yer tutmaktadır. Bütün bunların yanında kazalara bağlı yaralanmalar, travmalar ve organ kayıpları insan yaşamını tehdit eden diğer etmenlerdir. Tüm bu durumlar, ilgili hasarlı doku veya organın rejenerasyonunu kolaylaştıracak tedavileri gerekli kılmaktadır. Mevcut tedavi yöntemleri hastadan alınan dokunun gene aynı hastaya ait hasarlı bölgeye aktarımı (otogreft), bir kişiden diğerine (allogreft) aktarımı veya hayvandan insana (zenogreft) aktarımı üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu tedaviler devrim niteliğinde birer çözüm olsa da, her üç teknikte de büyük sorunlar bulunmaktadır. Otogreftleri elde etme süreci oldukça pahalı ve ağırlı olmasının yanı sıra, donör bölge ile ilgili anatomik kısıtlamalar, morbidite ve hematoma da karşılaşılan diğer problemlerdir. Benzer şekilde, allogreftler ve zenogreftlerin tüm hastaların bu tedaviye erişimi için yeterli miktarda olmayışı, hastanın bağışıklık sistemi tarafından reddedilme riski ve donör kaynaklı enfeksiyon ve hastalıklar nedeniyle ciddi kısıtlamalara sahiptir [9].

Bu bağlamda karşımıza yeni bir bilim alanı çıkmaktadır; temelleri 16. yüzyıla kadar götürülebilen fakat kavramsal olarak 1988’de tanımlanan “doku mühendisliği” [10]. Doku mühendisliği; kimya, fizik, malzeme bilimi, mühendislik, hücre biyolojisi, genetik ve tıp gibi birçok bilim dalını bir araya getiren disiplinler arası bir bilimsel çalışma alanıdır. Doku mühendisliği, mevcut tedavi yöntemlerine alternatif olarak, hasarlı bölgeyi otogreft ya da allogreft eşlenikler ile değiştirmek yerine dokuyu taklit eden, koruyan veya iyileştiren biyolojik iskeleler geliştirmeyi amaçlamaktadır.

Bu amaçlar çerçevesinde ortaya konan ilk yaklaşımda hasarlı bölgede yeni doku oluşumunu sağlamak için membran formunda biyomalzemeler kullanılmıştır. İkinci yaklaşımda ise hücreler ilgili dokulardan izole edilmiş ve çeşitli tekniklerle manipüle edilerek vücuda yerleştirilmiştir. Üçüncü yaklaşımda biyomalzemelerin biyosinyal molekülleri ile modifikasyonu söz konusuken; son yaklaşımda hücreler, biyomalzemeler ve biyosinyal molekülleri birleştirilmiştir. Doku mühendisliğinde yukarıdan aşağıya (top-down) ve aşağıdan yukarıya (bottom-up) olmak üzere 2 farklı yaklaşım kullanılmaktadır (Şekil 2.1).

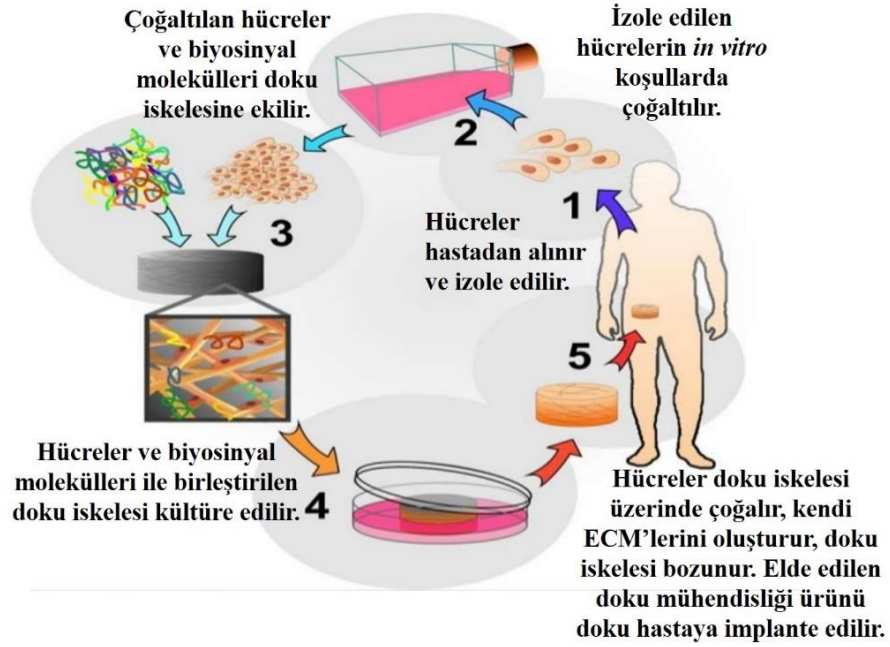


Şekil 2.1. Doku mühendisliğinde “top-down” ve “bottom-up” yaklaşımlar.

“Top-down” veya bir diğer deyişle doku-iskelesi temelli doku mühendisliği yaklaşımında biyoyumlu, biyobozunur, mekanik ve morfolojik olarak doğal dokuyu taklit edebilen polimerik, seramik veya kompozit yapıda, gözenekli doku iskeleleri kullanılmaktadır ve doku rejenerasyonunu sağlayacak sistem genel olarak hücre, doku iskelesi, biyoreaktör ve biyosinyal molekülleri bileşenlerinden oluşmaktadır. Uygulamalardaki başarı, dokuların ve organların yenilenmesi için uygun ortamı sağlayan, hücre dışı matrisi (ECM) taklit edebilen gözenekli 3 boyutlu iskele kullanımına büyük ölçüde bağlıdır. Doku oluşumu için şablon gibi davranan doku iskeleleri üzerine hücreler ekilir. Hücrelerin doğal ortamında maruz kaldığı kimyasal uyarınları taklit amacıyla büyüme faktörleri ortama eklenir ve mekanik uyarınları taklit için biyoreaktörler ile iskele-hücre bileşimi biyofiziksel uyarınlara tabi tutulur. Hücre ekilmiş doku iskeleleri, *in vitro* koşullarda kültüre edilirler. Bu yapı doğrudan hasarlı bölgeye implante edilebilir. Bir diğer durumda ise, geçici olarak destek görevi gören



doku iskelesi zamanla bozunur ve bu sırada hücreler kendi matrislerini oluşturarak doku oluşumunu gerçekleştirirler. Ardından elde edilen mühendislik ürünü doku hasarlı bölgeye implante edilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Doku iskelesi temelli doku mühendisliği yaklaşımındaki işlem basamaklarının şematik gösterimi.

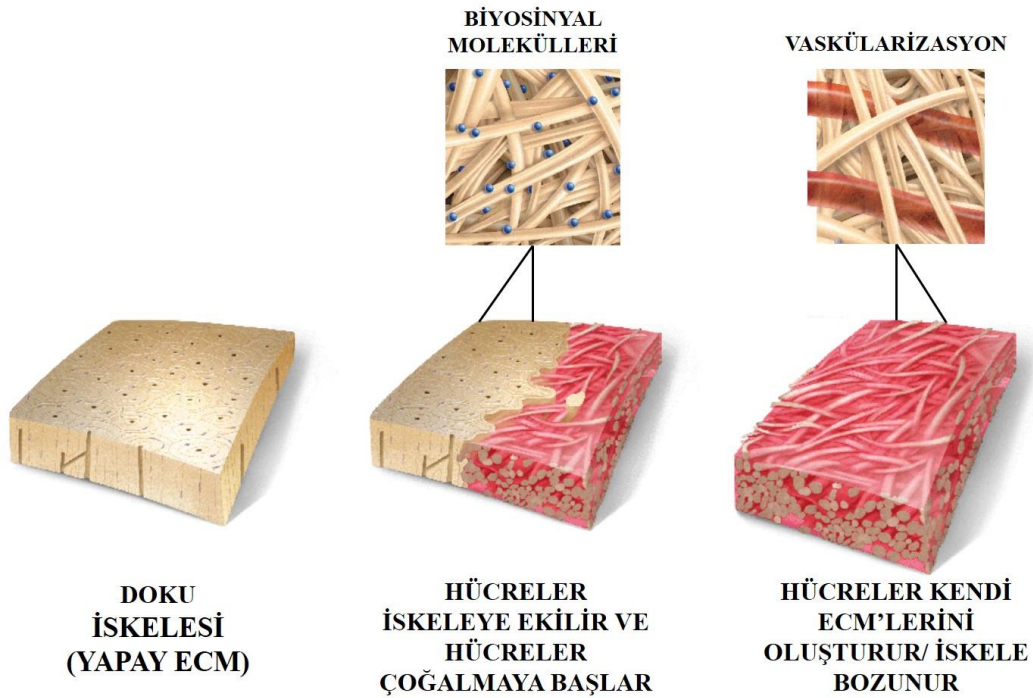
“Bottom-up” yaklaşımında ise hücre tabakaları, hücre agregatları, hücre modülleri ve biyobaskılama ile doku oluşumu gerçekleşmektedir. Özellikle son yıllarda hücre tabaka mühendisliği ve 3 boyutlu biyobaskılama yöntemleri oldukça popüler araştırma konularıdır. İskele temelli yaklaşımlarda genellikle difüzyon kısıtlamaları, yetersiz damarlanma, düşük hücre yoğunluğu, homojen olmayan hücresel dağılım ve iskelenin neden olduğu inflamatuvar yanıt temel problemlerdir. “Bottom-up” yaklaşım hücre temelli bir yaklaşım olduğundan bu problemlerin büyük bir kısmı örneğin, iskele kaynaklı fibrozis, makrofaj ve nötrofil aktivasyonu engellenebilmektedir. Ayrıca, doğal dokunun hücresel içeriğine benzer olarak yüksek hücre yoğunluğu elde edilebilmektedir. Fakat “bottom-up” yaklaşımlarda da çeşitli problemlerle karşılaşılmaktadır. Özellikle elde edilen yapının mekanik özelliklerinin yetersizliği, fazla maliyet gerektirmesi ve ölçeklendirmedeki problemler önemli kısıtlamalardır. Bu nedenle halen “top-down” yaklaşımdaki doku iskelelerinden kaynaklı sorunların çözümlenebilmesi için yeni biyomalzeme arayışı konusunda araştırmalar yoğun bir biçimde devam etmektedir.

## 2.2. Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Biyomalzemeler

Çeşitli biyomalzemelerden birçok teknik kullanılarak üretilen doku iskeleleri tasarlanırken, doku tipine bakılmaksızın, göz önünde bulundurulması gereken bazı temel noktalar bulunmaktadır. Bunlar; biyouyumluluk, biyobozunurluk, mekanik özellikler, iskele yapısı ve iskele üretim yöntemidir.

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak bir doku iskelesi için ilk ölçüt, biyouyumlu olması gerekliliğidir. Hücreler malzeme yüzeyine yapışmalı, doğal ortamlarındaki fonksiyonlarını göstermeli, yüzey üzerinde ve iskele içerisinde göç edebilmelidir. Ayrıca doku iskelesi, implantasyondan sonra yapının vücut tarafından reddiyle sonuçlanan inflamatuvar yanıtı neden olmamalıdır.

Doku mühendisliğinin amacı, vücudun kendi hücrelerinin ürettiği hücre dışı matrisin, zamanla, yerleştirilen iskelenin yerini almasını sağlamaktır (Şekil 2.3). Dolayısıyla doku iskelesi, hücrelerin kendi hücre dışı matrislerini üretmesine izin verecek şekilde biyolojik olarak parçalanabilir olmalıdır. Bu bozunumun yan ürünleri toksik olmamalı ve diğer organlar ile etkileşime girmeden vücuttan çıkabilmelidir. Bozunmanın doku oluşumuyla birlikte gerçekleşebilmesi için, kontrollü hücre infüzyonu ile birleştirilmiş bir inflamatuvar yanıt gereklidir.



Şekil 2.3. Doku mühendisliğinde ideal doku oluşum süreci.

İdeal olarak, doku iskelelerinin mekanik özellikleri implante edilecek anatomik bölge ile uyumlu ve implantasyon sırasında cerrahi müdahaleye izin verecek kadar da güçlü mekanik dayanıma sahip olmalıdır. Bu özellik tüm dokularda önem taşırken, özellikle kardiyovasküler ve ortopedik uygulamalar için bazı zorlukları beraberinde getirmektedir. Yeterli mekanik özelliklere sahip doku iskeleleri üretmek, kemik veya kırıkta mühendisliği alanında karşılaşılan en büyük güçlüklerden biridir. Doku iskeleleri implantasyon sonrasında dokunun kendini yeniden şekillendirme işleminin tamamlanmasına kadar yeterli mekanik dirence sahip olmalıdır. Bir diğer zorluk iyileşme oranlarının yaşa göre değişmesidir. Örneğin, genç bireylerde, kırıklar yaklaşık altı hafta içinde iyileşirken, bu durum yaşlılarda daha yavaştır. Her iki koşulda da hasar gören bölge 1 yıl sonra bile eski mekanik bütünlüğüne geri dönemez. Ortopedik uygulamalar için doku iskelesi tasarlanırken bu hususlar da dikkate alınmalıdır. Buna ek olarak bir malzemedeki gözeneklilik arttıkça mekanik dayanımı düşmektedir. Fakat gözeneklilik vaskülarizasyon ve filtrasyon için bir gerekliliktir. Bu nedenle mekanik özellikler ile gözenekli mimari arasında hücre infiltrasyonuna ve vaskülarizasyona izin veren bir dengenin doku iskelesinin başarısı açısından önemli bir parametre olduğu açıktır.

Doku iskelelerinin mimari yapısı doku mühendisliği açısından kritik öneme sahiptir. İskelenin merkez bölgesindeki bozunma, vaskülarizasyon eksikliği ve atık ürünlerin merkezden uzaklaştırılmaması iskele temelli doku mühendisliği yaklaşımlarındaki en büyük problemdir. İskeleler, hücrel penetrasyonu, besinlerin ve oksijenin infiltrasyonunu sağlamak için birbirine bağlı gözeneklere ve yüksek gözenekliliğe sahip olmalıdır. Ayrıca, atık ürünlerin iskele dışına taşınması için de içsel bağlantılı gözenekli bir yapıya ihtiyaç duyulmaktadır. Bir diğer kilit bileşen ise iskele gözeneklerinin ortalama gözenek boyutudur. Hücreler öncelikle malzeme yüzeyindeki kimyasal gruplar (ligandlar) vasıtasıyla iskele ile etkileşime girmektedir. ECM'in doğal bir bileşeni olan kollajenden üretilen doku iskeleleri, Arg-Gly-Asp (RGD) bağlanma sekansları adı verilen doğal ligandlara sahiptir. Fakat sentetik malzemelerden üretilen doku iskelelerinde bu ligandlar bulunmadığından protein adsorpsiyonu yoluyla hücreler ile etkileşime geçilmektedir. Ligand yoğunluğu, hücrelerin yapışabileceği bir gözenek içindeki mevcut yüzey olan spesifik yüzey alanından etkilenmektedir. Gözeneklerin hücrelerin yapı içerisine göç etmesine ve buralardaki ligandlara bağlanmasına izin verecek kadar büyük olmaları gerekirken aynı zamanda spesifik yüzey alanı oluşturarak kritik sayıdaki hücrenin efektif olarak iskeleye bağlanması için de yeterince küçük olmaları gerekmektedir [11,12]. Bu nedenle, herhangi bir iskele için,

kullanılan hücrenin türüne ve dokuya bağlı olarak değişebilen gözenek boyutlarının kritik bir aralığı mevcuttur.

Bir doku iskelesinin ya da doku mühendisliği ürünü olan bir yapının klinik ve ticari uygulanabilirliği, o ürünün maliyet açısından uygun ve seri üretim için ölçeklendirilebilir olmasına bağlıdır. Ölçeklendirilebilir imalat süreçlerinin iyi imalat uygulamaları (GMP) standardına göre geliştirilmesi, doku mühendisliği stratejilerinin klinikte başarı göstermesi açısından kritik öneme sahiptir. Bir diğer önemli faktör de, doku mühendisliği ürününün nasıl saklanacağını belirleyen, bir ürünün klinisyene teslim etme koşullarını belirlemektir. Klinisyenler, implantasyondan önce *in vitro* hücre kültürü gibi ilave cerrahi işlem gerektirmeksizin ürünün kullanılabilirliğini tercih etmektedir. Bununla birlikte, bazı doku türleri için bu mümkün değildir ve implantasyondan önce *in vitro* mühendislik gerekmektedir.

Çizelge 2.1. Doku iskelesi üretiminde kullanılan bazı biyomalzemeler

<b>Biyomalzeme Türü</b>	<b>Biyomalzeme</b>		
Seramik	Trikalsiyum Fosfat (TCP) Hidroksiapatit (HA)		
Sentetik Polimer	<b>Polilaktitler</b> Polilaktik asit (PLA) Poliglikolik asit (PGA) Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)	<b>Polihidroksialkonatlar</b> Poli 3-hidroksibutirat (P3HB) Poli 3-hidroksivalerat (PHBV)	<b>Polietilen glikol (PEG)</b> <b>Poliamitler</b> <b>Polianhidritler</b> <b>Polikaprolakton (PCL)</b>
	Doğal Polimer	Kollajen Hyaluronik asit Fibrin Aljinat Kitosan	

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak doku iskeleleri için son ölçüt yukarıda anlatılan özelliklerin hepsine bağlı olan, doku iskelesinin üretileceği biyomalzeme seçimidir. Biyomalzemeler; vücudun herhangi bir dokusunu, organını tedavi etmek, fonksiyonaltasını arttırmak veya değiştirmek için biyolojik sistemler ile arabirim oluşturmayı amaçlayan malzemelerdir. Biyomalzemeler, vücutla etkileşime girerek biyolojik süreçleri etkiler ve

doku rejenerasyonunu sağlar. Tipik olarak, doku iskelesi üretiminde üç ayrı biyomalzeme; seramik, sentetik polimer ve doğal polimer grubu kullanılır. Çizelge 2.1'de doku mühendisliğinde kullanılan seramik, sentetik polimer ve doğal polimer grupları örneklendirilerek verilmiştir. Tüm bu biyomalzeme gruplarının her birinin kendine özgü avantajlarının bulunmasının yanı sıra doğal doku taklit etmeyi kritik olarak etkileyen dezavantajları da bulunmaktadır. Bu nedenle farklı malzeme gruplarından oluşan kompozit iskele kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır [9].

### **2.2.1. Polimerik biyomalzemeler**

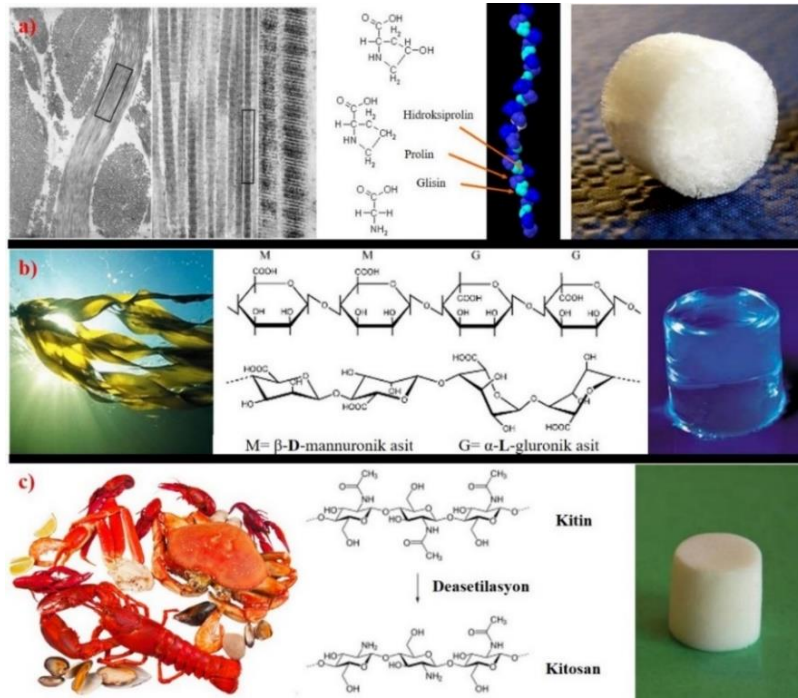
Biyolojik olarak bozunabilir polimerler doğal ve sentetik olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Doku mühendisliğinde kullanılan doğal polimerler genellikle memeli hücre dışı matrisinde bulunan kollajen, fibrin, glikozaminoglikan, hyaluronik asit ya da diğer canlılarda bulunan ancak memeli hücrelerine ve dokularına toksik etkiler yaratmayan aljinat, ipek ve kitosandır. Aşağıda sıklıkla kullanılan bazı doğal polimerler hakkında detaylı bilgi verilmiştir.

**Kollajen:** Biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan ve doğal bir polimer olan kollajen, omurgalılarda en fazla bulunan protein yapısıdır. Yaklaşık 1000 aminoasit dizisinden oluşur ve üçlü alfa heliks yapısına sahiptir. Kollajen alfa heliks yapısında Gly-X-Y tripeptit dizileri sıklıkla tekrarlanan birimlerdir. X ve Y birimlerinde genellikle prolin ve lizin veya bu aminoasitlerin modifiye hali olan hidroksiprolin ve hidroksilizin bulunurken, alfa heliks yapı bütünlüğünü koruyan glisin ise moleküldeki üçüncü konumda her zaman bulunmaktadır. Hidroksiprolin ve glisinler arasındaki hidrojen bağları da yapıya kararlılık kazandırır. I. tip deri, kemik ve tendonda, II. tip kıkırdakta, III. tip kan damarları, deri ve iç organların parankimasında, IV. tip epitel hücrelerin bazal membranında ve son olarak V. tip deri, plasenta, kemik ve düz kaslarda olmak üzere insan vücudunda genetik açıdan beş farklı tip kollajen yapısı bulunmaktadır. Tip I, II ve III en fazla bulunan ve en fazla ipliksi yapıdaki kollajen tipleridir. Doğal kollajende lizin ve hidroksilizin arasında çapraz bağlanma lizil oksidaz enzimi ile gerçekleştirilirken, biyomalzeme uygulamalarında ise gama radyasyonu, glutaraldehit veya karbodiimid gibi çapraz bağlayıcı ajanlar ile gerçekleştirilir. Çapraz bağlama işlemi, biyolojik parçalanma oranını düşürmek, çekme direncini arttırmak ve çözünürlüğü azaltmak için kullanılmaktadır [13].

**Aljinat:** Aljinat, kahverengi alglerin veya yosunların birincil yapısal polimeri olan aljinik asitin tuz formudur. Aljinat, üronat monosakkaritleri olan d-mannuronik asit ve  $\alpha$ -l-gluronik asit kopolimer bileşiminden türetilir. Bu negatif yüklü monomerin, M birimlerinin veya G birimlerinin dönüşümlü veya tekrar eden birimlerindeki miktar ve dağılım, elde edildiği

canlıya ve canlının yaşına bağlıdır. Aljinatın hidrojel oluşturma kabiliyeti, çok değerlikli kation grupları ile G birimlerindeki karboksilat grupları arasındaki iyonik bağlanma vasıtasıyla gerçekleşen çapraz bağlanmaya bağlıdır. Bu anyonik bileşimlerin oldukça hidratlanmış (% 99'a kadar) doğası, materyalin yüzey karakterini son derece hidrofilik hale getirir [13].

**Kitosan:**  $\beta(1-4)$  konumundan bağlı D-glukozamin (GlcN) monosakkaritlerinin, N-asetilglukozamin (GlcNac)'lerin arasına rastgele girmesi ile oluşan kitosan, pozitif yüklü bir polisakkarittir. Kitosan, eklem bacaklı dış iskeletinin birincil yapısı olan kitinin bir türevidir. Kitinden farklı olarak GlcNac monosakkaritleri glikozamin (Glc) ile yer değiştirmiştir. Kitosanın jel oluşturma kabiliyeti, komşu Glc monosakkaritlerindeki serbest amin grupları arasında oluşan hidrojen bağlarından kaynaklanmaktadır. Amin gruplarının protonlanması hidrojen bağının derecesini düşürdüğünden, bu reaksiyon oldukça pH bağımlıdır. Kitosan normal olarak alkalik koşullar altında ( $pH > 7$ ) jel formunda iken,  $pH 5$ 'in altında düştüğünde tamamen çözünür formdadır. Ticari olarak temin edilebilen kitosan, bileşim bakımından oldukça değişken olabilir. Deasetilasyon dereceleri (DA) %50 ile %90 arasında değişkenlik gösterebilirken, moleküler ağırlıkları 300 ile 1000 kDa arasındadır [13]. Şekil 2.4'te doku mühendisliğinde kullanılan bazı doğal polimerlerin elde edildiği kaynak, moleküler yapısı ve bu polimerler ile elde edilen iskele fotoğrafları verilmiştir.



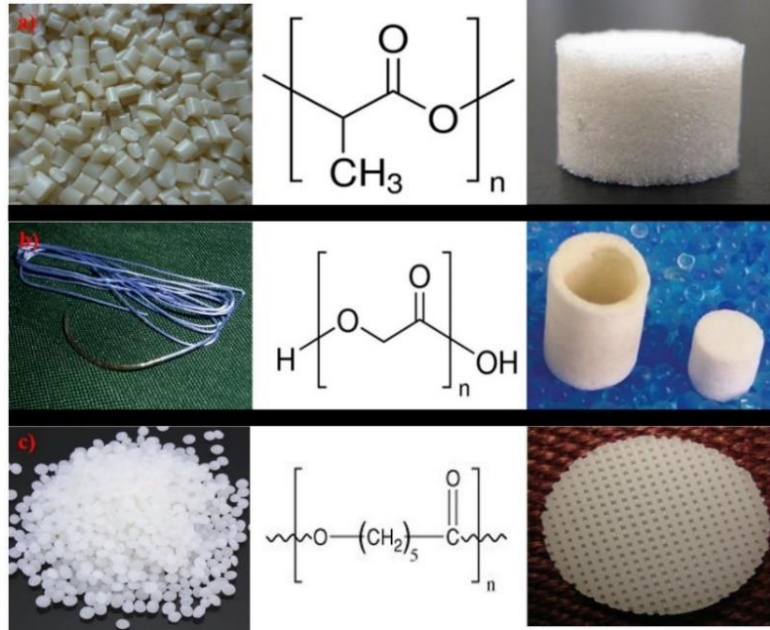
Şekil 2.4. Doku mühendisliğinde kullanılan bazı doğal polimerler, a) Kollajen, b) Aljinat, c) Kitosan.

Doğal polimerler, moleküler ve makroskopik seviyede, yüksek oranda organize bir yapıya sahiptir ve bu özellikleri nedeniyle doğal dokuları taklit açısından oldukça avantajlıdırlar. Yüksek biyouyumluluğa ve biyobozunurluğa sahip olmalarının yanı sıra implante edildikleri bölgede, doku ile hücre arasındaki etkileşim mekanizmalarını uyarabilirler. Bu nedenle doku mühendisliği uygulamalarında doğal polimerler sıklıkla tercih edilmektedir. Fakat doğal polimerler biyolojik dokulardan izole edildiğinden ürünler arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bununla birlikte, doğal polimerler genellikle hücreleri yönlendirmek için önemli sinyaller gönderebilen bölgeler içeriyor olsa da, bu biyoaktivite immojenite ile ilgili sorunlara neden olabilir [14], ayrıca düşük mekanik dayanıma ve patojen barındırma riskine sahiptirler. Doğal polimerlerin bozunumu çoğunlukla enzimatik süreçlere dayandığından, bireyin özgün enzim etkinliğine bağlı olarak, polimerin bozunma hızı hastadan hastaya değişebilmektedir [15].

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan bir diğer polimer grubu ise sentetik polimerler olup, çok kullanılan örnekleri Çizelge 2.1’de verilmiştir. PGA, PLA ve bunların kopolimerleri Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylıdır. Cerrahi dikişlerde 20 yılı aşkın süredir kullanılmakta olan PLA ve PGA için olumlu klinik raporlar bulunmaktadır. PLA ailesi en çok kullanılan sentetik biyomalzemelerdir. Laktit/glikolit kopolimerlerinde monomer oranlarının değiştirilmesiyle farklı fiziksel özellikler ve bozunma süreleri elde edilebilmektedir. Poli-L-laktit (PLLA) ve PGA yüksek kristalin yapılarından dolayı yavaş bozunurken, bunların kopolimerleri (PLGA) amorf yapıda olup daha hızlı bozunmaktadır.

**Poliglikolik asit (PGA):** PGA ve homopolimerleri diğer biyolojik olarak parçalanabilir polimerlere kıyasla, genellikle %35-75 aralığında kristaliniteye sahip polimerlerdir. Camsı geçiş sıcaklıkları 25°C ile 65°C arasında değişirken, erime sıcaklıkları 185°C ile 225°C arasında değişmektedir. Neredeyse tüm glikolit ve homopolimerleri eritilerek ekstrüzyon ve kalıplama işlemlerine tabi tutulabilmektedir. Yüksek derecedeki kristalinitesi nedeniyle, PGA hekzafloroizopropanol (HFIP) gibi yüksek halojen içeriğine sahip çözücüler dışında organik çözücülerde çözünmez. Bozunma ürünü olan glikolik asit insan vücuduna toksik değildir. Hidrofilik yapısı nedeniyle, implantasyondan 2 hafta sonra mekanik dayanımını hızla (%50) kaybeder. Yaklaşık 4 hafta sonra bozunma ürünlerinin emilimi başlarken, tam emilim yaklaşık 4 ile 6 ay arasında gerçekleşir [15].

**Polilaktik asit (PLA):** PGA'ya yapısal olarak çok benzer olmasına rağmen, PLA yapısındaki alfa karbon üzerinde asılı metil grubunun varlığı nedeniyle kimyasal, fiziksel ve mekanik özellikler açısından PGA'dan oldukça farklıdır. Bu yapı PLA'nın alfa karbonunda kiraliteye ve L, D ve DL izomerlerinin oluşumuna neden olur. PLLA yaklaşık 65°C camsı geçiş sıcaklığı ve yaklaşık 170-180°C erime sıcaklığına sahip yarı-kristalin yapıda nispeten sert bir malzemedir. PGA'ya göre daha az kristalin olan PLLA, %35 kristaliniteye sahiptir. Molekül ağırlığına bağlı olarak yaklaşık 200-250°C sıcaklık aralığında eritilebilir. Buna karşılık, poli (D, L-laktit) (PDLA), molekül ağırlığına bağlı olarak 50-60°C aralığında camsı geçiş sıcaklığına sahip, amorf ve şeffaf bir polimerdir. Dolayısıyla, PDLA'nın bozunma hızı PLLA'ninkinden daha fazladır. Polimer iskelenin boyutuna ve kalınlığına bağlı olarak PDLA'nın hidrolizi 2-12 aylık bir süre içinde tamamlanabilir. Molekül ağırlığı, kristalinite ve kopolimer bileşiminin bozunma hızını etkilediği bilinmesine rağmen, bu polimerlerin *in vitro* ve *in vivo* bozunmalarının bazı yönleri hala tam olarak anlaşılammıştır [15].



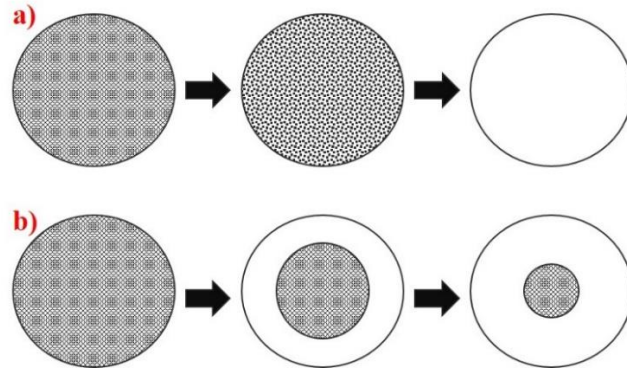
Şekil 2.5. Doku mühendisliğinde kullanılan bazı sentetik polimerler, a) Polilaktik asit (PLA), b) Poliglikolik asit (PGA), c) Polikaprolakton (PCL).

**Polikaprolakton (PCL):** E-kaprolaktonun halka açma polimerizasyonu ile elde edilen PCL, 58-63°C arasında erime sıcaklığına ve 260°C'de camsı geçiş sıcaklığına sahip yarı kristalin bir polimerdir. PCL homopolimerinin tekrar eden moleküler yapısı beş adet polar olmayan metilen grubundan ve nispeten daha polar bir grup olan ester grubundan oluşur. Bu yapı, yüksek olefinik içeriği ve hidrolitik olarak dengesiz alifatik-ester bağlantısının varlığı ile biyolojik olarak parçalanabilmektedir. PCL doku ile uyumlu olarak kabul edilmektedir ve



Avrupa'da biyolojik olarak parçalanabilen sütür olarak kullanılmaktadır. Fakat oldukça uzun bozunma süresine (2 yıl) sahip olduğundan, biyoemilimini hızlandırmak için D,L-laktit ile çeşitli kopolimerleri sentezlenmektedir [15]. Şekil 2.5'te doku mühendisliğinde kullanılan bazı sentetik polimerlere ait reçine formu, kimyasal yapısı ve bu polimerle elde edilen iskele yapıları verilmiştir.

Sentetik biyolojik olarak parçalanabilir polimerler kimyasal olarak sentezlendiğinden moleküler ağırlıklarını ve moleküler ağırlık dağılımlarını kontrol etmek mümkündür. Molekül ağırlığı değiştirilerek, polimerin bozunma hızı, fiziksel ve mekanik özellikleri değiştirilebilmektedir. Sentetik polimerlerde bozunma genellikle hidroliz ile yüzey erozyonu veya kütsel bozunma yoluyla gerçekleşmektedir (Şekil 2.6). Enzimatik ortam da polimerin bozunmasına yardımcı mekanizma olarak görülebilmektedir. Hidroliz ile bozunma tercih edilen bir bozunma türüdür. Çünkü herhangi bir lokal inflamasyon, pH değişikliği, implant parçalanması olmadıkça hidroliz ile bozunma hızı insandan insana değişmemektedir [14].



Şekil 2.6. Sentetik polimerlerde hidrolitik bozunma, a) Kütsel bozunma, b) Yüzey erozyonu.

Bu avantajlara ek olarak öngörülebilir, kontrol edilebilir ve tekrarlanabilir özelliklerinin bulunması, kolay işlenebilirlik, yüksek mekanik dayanım, modifiye edilebilirlik özellikleri de sentetik polimerlerin tercih sebepleri arasında gösterilebilmektedir. Çizelge 2.2'de doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan bazı polimerler, mekanik özellikleri ve bozunma süreleri verilmiştir. Avantajlarının yanında düşük biyoyumluluk ve monomer ve polimerizasyon kaynaklı safsızlık gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bu nedenle sentetik polimerler doğal polimerle karıştırılarak veya çeşitli ECM bileşeni proteinlerle yüzey modifikasyonu yapılarak kullanılmaktadır. Ayrıca çeşitli fiziksel ve mekanik özelliklerini iyileştirmek için de diğer sentetik polimerlerle karıştırılabilmektedirler.

Çizelge 2.2. Doku mühendisliğinde kullanılan sentetik polimerlerin mekanik özellikleri ve bozunma davranışları ([14]’ten değiştirilerek)

Polimerik sistem	Çekme Modülü (GPa)	Çekme Direnci (MPa)	Bükme Direnci (MPa)	Bozunma süresi veya mekanik özellik kaybı
PGA	6.5–7.0	57–100	120–218	Tam kütle kaybı 60–80 gün
PLA veya PLLA	2.0–5.1	10–75	45–145	Tam kütle kaybı 2–5 yıl; %50 mekanik özellik kaybı yarı-kristalin yapı için 1 ay, amorf yapı için 5 ay
PDLLA	3.5	60	130	Tam kütle kaybı 0.5–1 yıl
Polikarbonat	1.4–1.8	40–60	-	16 haftada % 40 kütle kaybı, 1 yılda %50 kütle kaybı
Selüloz asetat	1.6	26.5	-	180 günde %6 kütle kaybı
Titanyum*	115	550–1000	980	Biyoinert
Paslanmaz çelik*	210	500–1500	400–800	Biyoinert
İnsan kortikal kemiği*	7–25	50–160	195–235	-

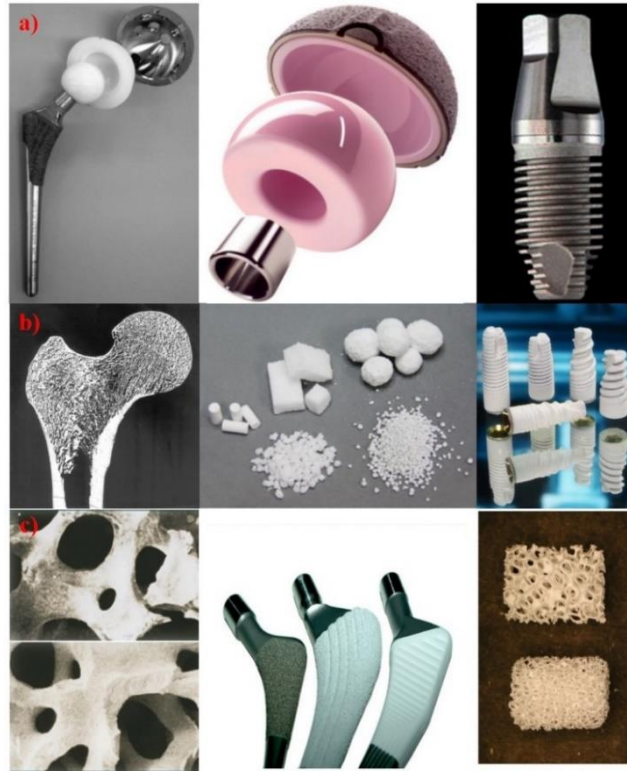
\*Titanyum, paslanmaz çelik ve insan kortikal kemiği karşılaştırma amacıyla verilmiştir.

### 2.2.2. Seramik biyomalzemeler

Vücudun zarar gören veya işlevini yitiren organlarının onarımı, yeniden yapılandırılması veya yerini alması amacıyla özel olarak tasarlanan bir diğer malzeme grubu da seramik ya da biyoseramiklerdir. Biyoseramikler, biyoinert, biyoaktif ve biyoemilebilir seramikler olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Biyoinert seramikler, alüminyum oksit ( $Al_2O_3$ /alümina), zirkonyum oksit ( $ZrO_2$ /zirkonia) ve titanyum oksit ( $TiO_2$ ), biyoseramik grubunun ilk nesil ürünleridir. Dokuyla biyolojik olarak etkileşime girmezler ve bozunmazlar. Yüksek mekanik dayanım ve korozyon direncine, düşük sürtünme katsayısına sahiptirler. Genellikle kalça ve diz implantlarında kullanılmaktadırlar.

Biyoaktif seramikler, kalsiyum fosfat (CP), hidroksiapatit (HA) ve biyocam, ikinci nesil ürünlerdir. Doku ile etkileşime giren biyouyumlu, yüksek osteointegrasyon kapasitesine sahip seramiklerdir. İnsan vücudundaki kemiklerin %60’ı kalsiyum fosfattan oluşmaktadır. Kalsiyum fosfat gözenekli, içerdiği Ca/P oranına göre farklı bozunma oranına sahip, bulunduğu ortama göre kararlılık gösteren bir yapıdadır. Genellikle metalik implant malzemeleri üzerinde kaplama olarak kullanılmaktadır. Hidroksiapatit ise kemiğin inorganik

yapısında bulunan bir diğer seramiktir. Doğada elmadan sonra bilinen en sert malzemedir. Sert olmasına karşın oldukça kırılıgandır ve esnekliği çok azdır. Kemik yapısında bulunan HA sitokiyometrik olmayan apatit yapısındadır. İçeriğindeki Ca/P oranı sitokiyometrik HA'ten (1.67) daha düşüktür. Yapay olarak üretilen HA ve CP'ın içeriklerindeki Ca/P oranının doğal dokuya benzemesi gereklidir. Bunun yanında hidroksiapatit, osteokondüktif özelliklere sahiptir. Biyoaktif camlara ise  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$  ve  $\text{P}_2\text{O}_5$  içeren biyocamlar örnek olarak verilebilir. İçerdikleri kalsiyum, sodyum ve fosfor nedeniyle implant ve doğal doku arasında kimyasal bağlanma gerçekleşmektedir. Ayrıca Bioglass® adıyla piyasada ticari olarak bulunabilen biyocam malzemeler de bulunmaktadır. Biyoemilebilir seramikler, trikalsiyum fosfat (TCP), oktakalsiyum fosfat (OCP), ise üçüncü nesil biyoseramiklerdir. Biyoemilebilir seramikler kendisini çevreleyen doku tarafından bozunabilme ve emilebilme özelliğine sahiptir [15]. Şekil 2.7'de doku mühendisliği ve implant uygulamalarında kullanılan bazı seramikler verilmiştir.



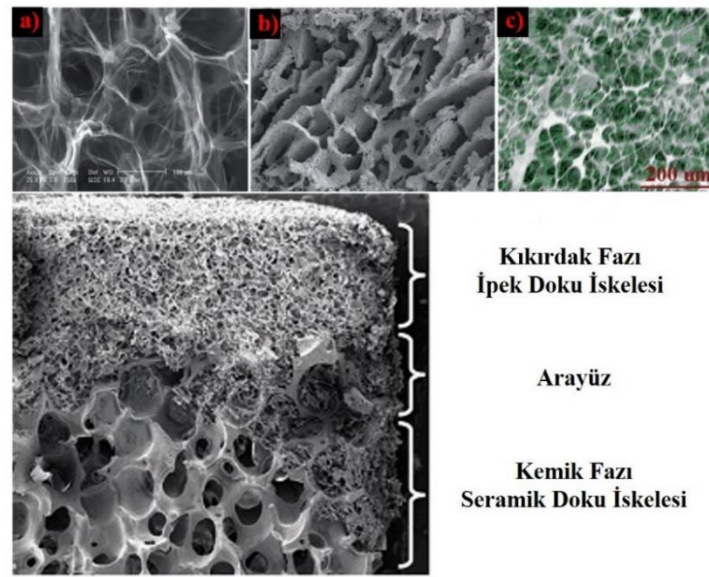
Şekil 2.7. Doku mühendisliğinde kullanılan bazı seramikler, a) Biyo inert seramikler; sırasıyla alüminyum oksit ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ /alümina), zirkonyum oksit ( $\text{ZrO}_2$ /zirkonia) ve titanyum oksit ( $\text{TiO}_2$ ), b) Kalsiyum fosfat, c) Hidroksiapatit.

Biyoseramiklerin büyük kısmı kemik dokusunu taklit yeteneklerinden dolayı genellikle kemik implant malzemesi olarak kullanılmaktadır. Bir implant malzemesinin başarısı doku ile implant malzemesi arayüzeyinde gerçekleşen bağlanmaya bağlıdır. İmplantasyon sonrasında, implant yüzeyi ile hidratlı iyonlar etkileşime girer, ardından yüzeye protein

adsorpsiyonu gerçekleşir ve osteoblastik hücreler bu arayüze tutunur. Yüzey üzerinde çoğalan öncül kemik hücreleri, olgun kemik hücrelerine farklılaşır ve kendi ECM'lerini oluşturularak doku ile bütünleşirler. İmplant başarısını etkileyen birçok faktör vardır. Doku tipi, doku yaşı, doku sağlığı, doku içi kan dolaşımı, arayüzey hareketliliği, arayüzey kan dolaşımı, boyutlar arası uygunluk ve mekanik yükleme gibi faktörler doku yönünden ele alınırken; implant bileşimi, implanttaki faz sayısı, faz sınırları, yüzey morfolojisi, yüzey gözenekliliği ve kimyasal reaksiyon gibi faktörler ise implant yönünden ele alınmaktadır.

### 2.2.3. Kompozit biyomalzemeler

Kompozit biyomalzemeler iki veya daha fazla sayıda farklı malzeme grubunun bir araya getirilmesi ile elde edilmektedir. Geleneksel tek bileşenli polimerik ve seramik biyomalzemeler tam anlamıyla doku iskelesi gerekliliklerini karşılayamamaktadır. Bu nedenle, çok bileşenli polimer ve seramik sistemlerinin tasarımı ve hazırlanması; yenilikçi, çok fonksiyonlu biyomalzemelerin geliştirilmesini sağlayabilmektedir [16]. Her iki malzeme grubunun içerdiği avantajlar birleştirilerek tek başına bulduklarında sahip oldukları dezavantajları ortadan kaldırmak mümkündür. Kompozit biyomalzemeler tasarlanırken, seramiklerin kırılabilirliği polimer bileşenler ile dengelenirken, polimerlerin biyouyumluluk sorunu seramikler ile giderilebilmektedir. Özellikle kemik dokuda, optimal kırılabilirlik ve esneklik gösteren mekanik özelliklere sahip biyobozunur, kemiğin doğal yapısına benzer, osteoindüktif ve osteokondüktif doku iskeleleri üretmek kompozit doku iskeleleri ile mümkün olabilmektedir (Şekil 2.8).

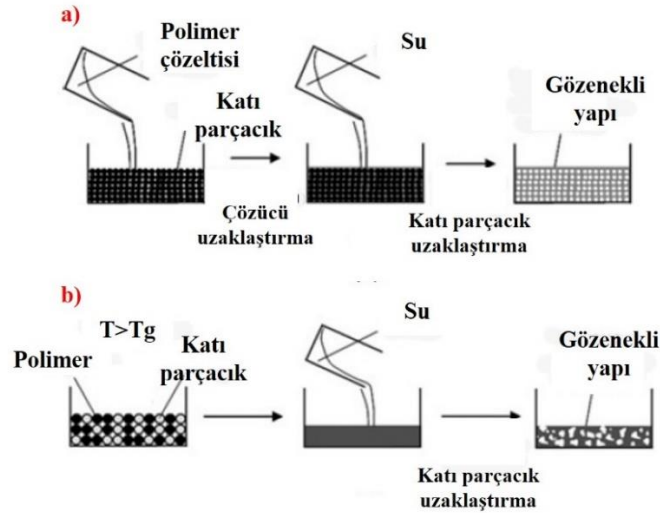


Şekil 2.8. Kompozit doku iskeleleri a) Kollajen-GAG (CG) doku iskelesi, b) Hidroksiapatit (HA) doku iskelesi, c) Kollajen-Hidroksiapatit (CHA) kompozit doku iskelesi, d) İki fazlı kompozit doku iskelesi.

### 2.3. Doku İskelesi Üretim Yöntemleri

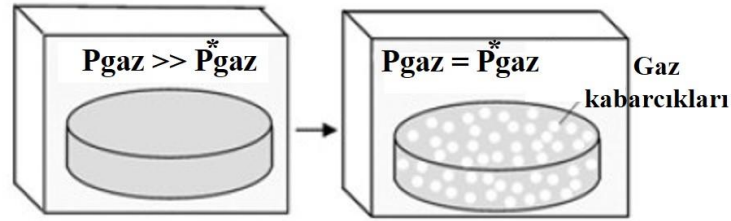
Doku iskeleleri süngerimsi (sponge-like) ve fibröz fabrikler olmak üzere 2 farklı formdadır. Süngerimsi doku iskeleleri, çözücü-döküm/parçacık uzaklaştırma, gaz köpükleştirme, membran laminasyonu ve dondurarak kurutma gibi geleneksel fabrikasyon yöntemleri ya da bilgisayar destekli fabrikasyon yöntemleri kullanılarak üretilebilmektedir. Mikro ve nanofiber fibröz doku iskeleleri ise elektroğirme yöntemi kullanılarak elde edilmektedir.

**Parçacık uzaklaştırma yöntemleri:** Bu yöntemde doku iskelesi malzemesi içerisinde gözenek oluşturması amacıyla katı parçacıklar eklenir. Ardından katı parçacıklar uygun bir çözücü vasıtasıyla yapıdan uzaklaştırılır ve gözenekli doku iskelesi elde edilir. Parçacık uzaklaştırma yöntemleri, uygulama açısından oldukça basittir. İstenilen boyut ve miktarda gözenek, eklenen katı parçacıkların boyutu ve miktarı değiştirilerek elde edilebilmektedir. Gözenek yapıcı ajan olarak suda çözünebilir tuz ve şeker parçacıkları kullanılmaktadır. Yöntem farklı şekillerde modifiye edilebilmektedir. Doku iskelesi malzemesi uygun çözücüde çözülerek (çözücü döküm) veya eritilerek (eriyik kalıplama) doku iskeleleri üretilebilmektedir (Şekil 2.9). Ancak bu yöntem, iskelenin hava ile temas eden üst kısmında film tabakası oluşması, gözenekliliğin homojen olarak sağlanamaması, içsel bağlantılı gözeneklerin elde edilememesi ve katı parçacıkların yapıdan tamamen uzaklaştırılamaması gibi dezavantajları da barındırmaktadır.



Şekil 2.9. Parçacık uzaklaştırma yöntemleri, a) çözücü-döküm/parçacık uzaklaştırma, b) eriyik kalıplama/parçacık uzaklaştırma.

**Gaz köpükleştirme yöntemi:** Bu yöntemde basınçlı karbondioksit ( $\text{CO}_2$ ) gazı ile katı polimer yapısı etkileştirilir. Polimer karbondioksit gazıyla doygun hale geldiğinde gaz hızlıca salınmaya başlar, ardından polimer yapı içerisinde çekirdeklenmeye bağlı olarak gaz kabarcıkları oluşur (Şekil 2.10). Bu gaz kabarcıkları gözenekli yapıyı meydana getirir. Gaz köpükleştirme yöntemi ile %93 oranında mikron boyutlarında gözeneklilik sağlanabilmektedir. Ancak iskele yüzeyinde film oluşumu, gözeneklerin homojen dağılmaması ve içsel bağlantıların yoksunluğu bu yöntemin dezavantajlarını oluşturmaktadır.



Şekil 2.10. Gaz köpükleştirme yönteminde gaz kabarcıklarının oluşumu ( $P_{\text{gaz}}$ : Gaz basıncı,  $P^*_{\text{gaz}}$ : Kısmi basınç).

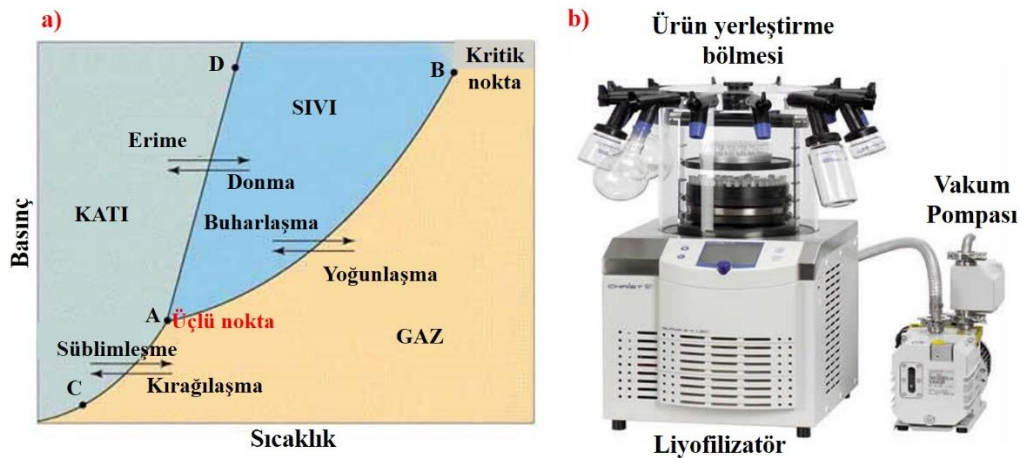
**Membran laminasyonu:** Çözücü-döküm/parçacık uzaklaştırma yöntemi ile elde edilen gözenekli membranların uygun bir çözücü vasıtasıyla birbirine yapıştırılmasına dayanan bir yöntemdir. Yüzeyleri birbirine değecek şekilde üst üste dizilen gözenekli membranlar, membranı oluşturan polimerin çözücüsü eklenerek doyurulur. Böylece yığılan membranların birleşmesi sağlanarak 3 boyutlu, gözenekli iskele yapısı elde edilir.

**Bilgisayar destekli yöntemler:** Otomotiv sanayinde kullanılan “solid freeform” teknikleri ile malzemelerin mikro boyutlarda üretilmesi mümkün hale gelmiştir. Farklı alanlardaki bu gelişmeler özellikle implant malzemelerin şekillendirilmesinde büyük yarar sağlamıştır. Malzemelerin son alacağı şekil bilgisayar yardımıyla tasarlanmaktadır. “Hızlı Prototip Üretim” teknolojisi, malzemeleri tabaka tabaka ekleme esasına dayanır. Bu üretim yöntemi ile malzeme üretimi esnasında hücreler de enkapsüle edilebilmektedir. Bunun yanında kontrol edilebilir gözenek boyutu ve gözenek yapısı ile istenilen yapısal özelliklerde iskeleler elde etmek mümkündür. Bilgisayar destekli üretim yöntemlerine, seçici lazer sinterleme, eriyik depozisyon modelleme, 3 boyutlu baskılama ve stereolitografi yöntemleri örnek olarak verilebilir.

Dondurarak kurutma yöntemi ve elektroçirgeme yöntemi sunulan tez çalışması kapsamında doku iskelesi üretim yöntemi olarak kullanıldığından bu yöntemler sırasıyla Bölüm 2.3.1 ve 2.3.2’de detaylı olarak açıklanmıştır.

### 2.3.1. Dondurarak kurutma yöntemi

Dondurarak kurutma yöntemi süngerimsi yapıda doku iskelesi üretmeye olanak veren bir üretim yöntemidir. Bu süreç dondurma, birincil (süblimasyon) ve ikincil (desorbisyon) kurutma olmak üzere 3 bölümden oluşur. Bir sıvı sistemin sıcaklığı, sıvının donma sıcaklığının altına düştüğünde, sıvı çözülden ayrılır ve buz kristalleri oluşur. Çözünen madde daha fazla yoğunlaşarak, buz kristalleri arasındaki boşluklara yerleşir. Ancak çözünen maddenin büyük bir kısmı buz kristalleri arasına tam olarak yerleşmemektedir. Bu nedenle çözücü ve çözünen maddeler arasında faz ayrımı gerçekleşir. Buz kristallerinin oluşumu ise kristallerin çekirdeklenmesi (oluşumu) ve büyümesi olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Her iki aşamanın hızı oluşacak buz kristallerinin son boyutunu belirler. Yüksek çekirdeklenme oranı daha küçük, çok sayıda ve homojen kristallerin üretimine neden olur. Gözenekli yapı ise, buz kristallerinin birincil kurutma aşamasında süblime edildiği, yani katı fazdan gaz faza geçtiği sırada oluşur. Dolayısıyla gözenek morfolojisi dondurma aşamasında oluşan buz kristallerinin boyutu ve dağılımı ile doğrudan ilişkilidir. Son olarak ikincil kurutma aşamasında, gözenekli malzemenin gözeneklerinden kaynaklanan artık nem içeriği uçurulur [17].



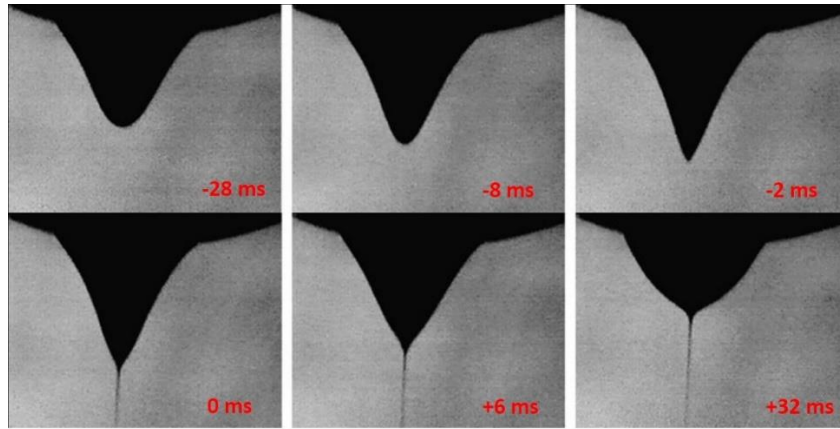
Şekil 2.11. a) Faz diyagramı, b) Dondurarak kurutma sistemi.

Temel olarak dondurarak kurutma sistemi Şekil 2.11.b'de görüldüğü üzere; dondurucu (liyofilizatör), malzemelerin konulacağı ürün bölgesi ve vakum pompasından oluşur. Uygun sıcaklıkta dondurulan polimer çözeltisi, dondurarak kurutma cihazına yerleştirilir. Dondurma aşamasında çözelti içerisinde oluşan buz kristalleri, cihaz içerisinde düşük sıcaklıkta ve vakum koşullarında süblimleşir. Süblimleşmenin arkasında bıraktığı yapı doku iskelesinin gözenekli yapısını oluşturur. Dondurarak kurutma işleminde dikkat edilmesi gereken noktalardan biri malzemenin sıcaklığını, Şekil 2.11.a'da gösterilen, maddenin katı,

sıvı ve gaz halinin birlikte bulunduğu en düşük sıcaklık olan üçlü noktada (triple point) tutmaktır. Bir diğer önemli nokta ise buz kristallerinin tam anlamıyla oluşması için dondurma sıcaklığı ve süresinin uygun değerlerde olmasıdır. Dondurarak kurutma yönteminin en önemli avantajı gözenek boyutlarının kontrol edilebilmesidir. Gözenek boyutları çözelti içerisindeki çözücü veya gözenek yapıcı ajan değiştirilerek ayarlanabilmektedir. İskelenin üst kısmında oluşan film tabakası bu yöntemin dezavantajları arasındadır. Ayrıca yüksek basınçlı vakum ortamı, düşük molekül ağırlıklı ve düşük mekanik dayanıma sahip polimerlerin yapısını bozarak, içsel bağlantılı gözenekliliği etkilemektedir.

### 2.3.2. Elektroğirme yöntemi

Sentetik fiber yapısı oluşturmak için elektrostatik kuvvetlerin kullanılma süreci 100 yılı aşkın süredir bilinmektedir. “Elektroğirme” olarak adlandırılan bu işlemde yüksek gerilim kaynağı kullanılarak polimer çözeltisi, belirli bir polaritedeki yüklerle yüklenerek, zıt polariteye sahip toplayıcıya doğru hızlandırılır. Zıt yüklü polimer çözeltisi ve toplayıcı arasındaki elektrostatik çekim kuvveti ve çözelti içerisindeki benzer yükler arasındaki elektrostatik itme kuvveti arttıkça, çözeltinin uç kısmında Taylor konisi adı verilen yuvarlak bir menisküs oluşur (Şekil 2.12). Elektrostatik kuvvetler, sıvının yüzey gerilimini yendiği anda, Taylor konisinden fiberler püskürtülmeye başlar. Oluşan fiber jeti, hava ile temas ettiğinden çözücü buharlaşır ve bunun sonucunda katı polimer fiberler toplayıcıya çöker [18].

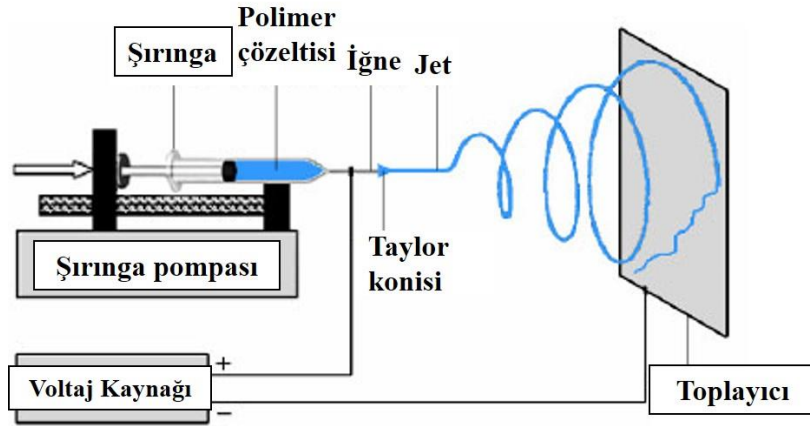


Şekil 2.12. Taylor konisinin zamana bağlı oluşumu ([19]’dan değiştirilerek).

Taylor konisi oluşumundan sonra koni ucundan fıskıran fiberler toplayıcı levhaya ilerlerken farklı yollar izler. Jet belirli bir mesafe içerisinde kararlılığını korur. Sistem parametrelerine ve polimer özelliklerine göre kararsızlık halleri değişkenlik gösterir. Sıklıkla karşılaşılan bir kararsızlık türü olan “Rayleigh kararsızlığı” fiberlerde boncuk oluşumuna neden olurken, “whipping kararsızlığı” ise jet içerisindeki yüklerin birbirini itmesiyle, jet merkezinden dışa



doğru radyal tork oluşmasına neden olur. Whipping sonucunda ana jet dışında birden fazla jet meydana gelir [19].



şekil 2.13. Elektroeğirme dzenegi bileşenleri.

şekil 2.13'te şematize edilen geleneksel bir elektroeğirme sistemi, polimer ozeltisinin bulunduğu şıringa, ozeltinin akmasını sağlayan şıringa pompası, pozitif ve negatif polariteye sahip yukssek gerilim kaynağı ve topraklanmış toplayıcıdan oluşmaktadır. Elektroeğirme işlemi oldukça kolay olmasına rağmen, fiber oluşumunu ve fiber yapısını buyuk olude etkileyen birçok işlem parametresi mevcuttur. Çizelge 2.3'te fiber morfolojisini etkileyen parametreler verilmiştir. Bu parametreler detaylandırılırsa, işlem, ozelti ve çevreye bağlı parametreler olmak uzere 3 grup parametreden söz edilebilir.

Çizelge 2.3. Fiber morfolojisini etkileyen parametreler ([18] 'den değiştirilerek)

Parametre	Fiber morfolojisine etkisi
Voltağ ↑	Başlangıçta fiber çapı ↓, daha sonra ↑
Akış hızı ↑	Fiber apı ↑ (Eğer akış hızı çok artarsa boncuk oluşumu gözlemlenir.)
İğne-toplayıcı uzaklığı ↑	Fiber apı ↓ (Eğer mesafe çok kısalsarsa boncuk oluşumu gözlemlenir.)
Polimer derişimi ↑	Fiber apı ↑ (Optimal aralıkta)
ozelti iletkenliği ↑	Fiber apı ↓ (Geniş bir aralıkta çap dağılımı)
ozuc uçuculuğu ↑	Fiberler mikro dağılım sergiler (Gözenekler artar, yuzey alanı artar.)

**İşlem parametreleri:** İşleme etki eden parametreler temel olarak voltaj, polimer akış hızı ve şırınga toplayıcı mesafesi olarak sıralandırılabilir.

- **Voltaj:** Uygulanan elektrik alan kuvveti, oluşan fiberlerin çap boyutlarını kontrol eder. Ayrıca jet oluşumu için elektrik alan kuvveti belirli bir değerin üzerinde olmalıdır. Buna ek olarak optimum alan şiddeti altında uygulanan güç boncuk oluşumuna neden olur.
- **Çözelti akış hızı:** Polimer akış hızı fiber boyutunu, şeklini ve oluşan yapının gözenekliliğini etkiler. Oluşan fiber jeti ile çözelti sürekli yer değiştirerek elektroğirme işleminin devamlılığı sağlanır. Ancak çözelti hızı optimal bir değerde değilse şırınga ucunda Taylor konisi oluşumu görülmez.
- **Şırınga ucu-toplayıcı mesafesi:** Şırınga ucu ve toplayıcı arasındaki mesafe, fiber boyutunu kademeli olarak etkiler. Ayrıca bu mesafe işlemin elektroğirme ile mi yoksa elektrospreyleme ile mi sonuçlanacağını belirler. Taylor konisinden uzaklaştıkça fiber çapı düşer. Kısacası, fiber çapı Taylor konisinden uzaklığın bir fonksiyonudur [18].

**Çözelti parametreleri:** İşlem parametrelerine ek olarak çözelti parametreleri de fiber oluşumu ve yapısında önemli bir rol oynamaktadır. Bu parametreler, polimer derişimi, çözücü uçuculuğu ve çözücü iletkenliği olarak sıralanabilir.

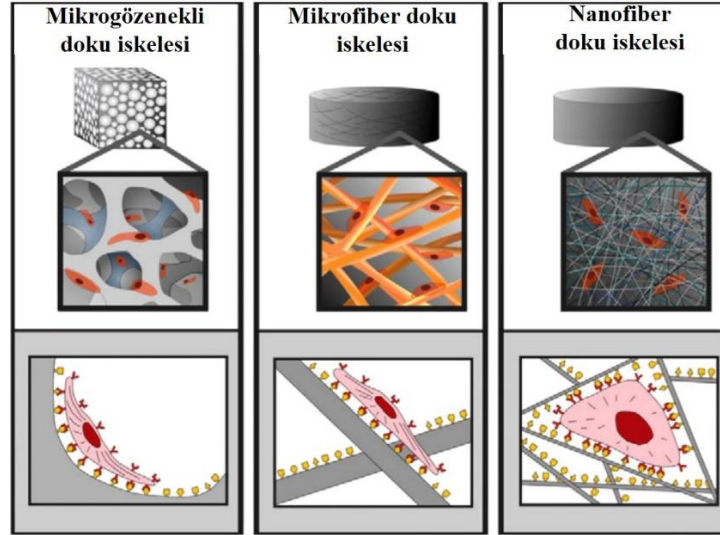
- **Polimer derişimi:** Polimer derişimi doğrudan polimerin molekül ağırlığı ile ilişkilidir. Bu nedenle eğirme işlemi uygulanacak polimerin molekül ağırlığı ve dolayısıyla oluşturduğu çözeltinin viskozitesi çok önemlidir. Polimer derişimi, bir çözeltinin eğilebilirliğini, yani bir fiberin oluşup oluşmayacağını belirler. Polimer çözeltisi zincir dolaşıklıklarına izin verecek kadar yüksek bir polimer derişimine sahip olmalıdır. Bununla birlikte, çözelti hiçbir zaman çok fazla seyreltik veya çok fazla derişik olmamalıdır. Polimer derişimi aynı zamanda polimer çözeltisinin yüzey gerilimini de etkiler. Yüzey gerilimi fazla olan bir polimer çözeltisini elektrostatik kuvvetlerle yenmek zordur. Bu nedenle Taylor konisi oluşumu görülmeyebilir. Çözelti çok seyreltik ise, polimer çözeltisinin yüzey gerilimi düşeceğinden, fiberler toplayıcıya ulaşmadan önce damlacıklara bölünür.
- **Çözücü uçuculuğu:** Çözücü seçimi, oluşan yapının gözenekliliğini etkileyebilme kabiliyeti açısından kritik öneme sahiptir. Şırınga ucu ile toplayıcı arasında çözücünün buharlaşabilmesi için uçucu bir çözücü kullanılmalıdır. Fiber jeti, atmosferden toplayıcıya doğru ilerledikçe, katı polimer fiberler çökmeden önce bir

faz ayrımı meydana gelir. Bu durum çözücünün uçuculuğundan büyük ölçüde etkilenen bir işlemdir.

- **Cözelti iletkenliği:** Elektroğime işlemi elektrostatik kuvvetlerin etkinliğine dayanan bir işlemdir. Polimer çözeltisi yüklenerek bir toplayıcı üzerinde fiber formunda birikir. Polimer çözeltisinin iletkenliği ne kadar fazla ise fiber oluşturma kabiliyeti de o kadar artar. Yüksek iletkenliğe sahip çözeltiler, düşük iletkenliğe sahip çözeltilerden daha fazla yük taşıma kapasitesine sahiptir. Bu nedenle çözücü iletkenliği önemli bir parametredir. İletkenlik aynı zamanda oluşan fiberlerin çaplarını etkileyebilir [18].

**Cevresel parametreler:** Sıcaklık, nem ve atmosfer türü, çözeltinin viskozitesini ve çözücünün buharlaşma hızını etkiler. Yüzey gerilimi değişen polimer çözeltisinden oluşan fiberlerin çapları ve morfolojisi değişebilir. Bu nedenle elektroğirme işlemi kullanılan polimere bağlı olarak optimal sıcaklık, nem ve atmosfer koşullarında yapılmalıdır.

Elektroğirme yöntemi doku mühendisliği açısından önemli avantajlara sahiptir. Bu yöntem ile elde edilen mikro ve nanofiberler, geniş yüzey alanları, yüksek uzunluk/çap oranları, esnek yüzey işlevleri, ayarlanabilir yüzey morfolojileri ve üstün mekanik performans gibi önemli özellikler barındırmaktadır. Hücre dışı matris (ECM) farklı dokuları ayırır, hücreleri destekleyici bir ağ oluşturur. Hücrelerin tutunması, yayılması ve farklılaşmasında hem fiziksel hem mekaniksel hem de biyokimyasal olarak görev alır. ECM karbonhidratlardan, proteinlerden ve glikozaminoglikanlardan (GAG) oluşur. Bu yapıların büyük bir çoğunluğu fibröz yapıdadır. Elektroğirme ile elde edilen doku iskeleleri fibröz yapısıyla ECM'i iyi bir şekilde taklit edebilmektedir. Buna ek olarak iskele mimarisi hücrelerin tutunması açısından büyük önem taşır (Şekil 2.14). Mikro ölçekli mimarilere sahip iskelelere tutunan hücreler, düz yüzeylerde kültüre edilmiş gibi düzleşir ve yayılır. Nano ölçekli mimarilere sahip iskeleler, proteinleri adsorbe eden ve hücre membran reseptörlerine daha fazla bağlanma bölgesi sağlayan daha büyük yüzey alanına sahiptir. Ayrıca, nano yapı içerisinde adsorbe olan proteinlerin konformasyonlarında meydana gelen değişimler ile hücre tutunmasını sağlayan farklı bağlanma bölgelerini de ortaya çıkarabilir [20].



Şekil 2.14. İskele mimarisinin hücre tutunması ve yayılması üzerine etkisi [20].

### 2.3.2.1. Üç boyutlu fibröz doku iskeleleri üretiminde kullanılan elektroğirme yöntemleri

İdeal doku iskeleleri, doğal dokular ve organlarda bulunanlara benzer şekilde hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlamak için ECM'in topografik ve mekanik özelliklerini taklit edebilmelidir. ECM morfolojisi hedef dokuların ve hücre tiplerinin fonksiyonlarına göre değişir. Örneğin, epitel dokunun üst katmanı, 2 boyutlu (2B) ECM membran üzerinde epitel hücrelerinin kompakt olarak paketlenmesiyle oluşur. Fibroblastların ve immün sistem hücrelerinin üç boyutlu uzamsal yayılımı deri dokusunun iç bölümünde gerçekleşir. Göğüs, karaciğer, mesane, akciğer ve diğer birçok organ ve dokuda 3 boyutlu (3B) ve rastgele dağılım gösteren ECM yapısı bulunur. Düz 2B substratlar üzerinde kültürlenmiş hücreler ile 3B ortamda kültürlenmiş hücreler arasında morfoloji ve farklılaşma anlamında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Bu nedenle, orijinal doğal dokuların yapı ve işlevlerine göre belirli morfolojilere ve yapılara sahip iskelelerin üretilmesi gerekir.

Geleneksel elektroğirme ile üretilen yapılar, fiberlerin toplayıcıya paralel olarak hizalandığı 2B iskeleleri oluşturur. Bu nedenle yukarıda da bahsedildiği gibi bu yüzeyler üzerinde kültürlenmiş hücreler sadece 2 boyutlu olarak gelişebilir. Bu durum hücrelerin doğal dokudaki morfolojisini ve işlevlerini kaybetmesine neden olur. Ayrıca geleneksel elektroğirmede 2B fiberlerin birbirlerine yakın konumlanmasından dolayı gözenek boyutları küçülerek hücrelerin iskele içerisine göçü sınırlanmaktadır. Bu nedenle 3B fibröz doku iskelelerinin üretilmesi büyük önem taşımaktadır. Daha büyük gözeneklere ve daha fazla gözenekliliğe sahip, hücrelerin bulunduğu ortamı daha iyi taklit edebilen fibröz doku

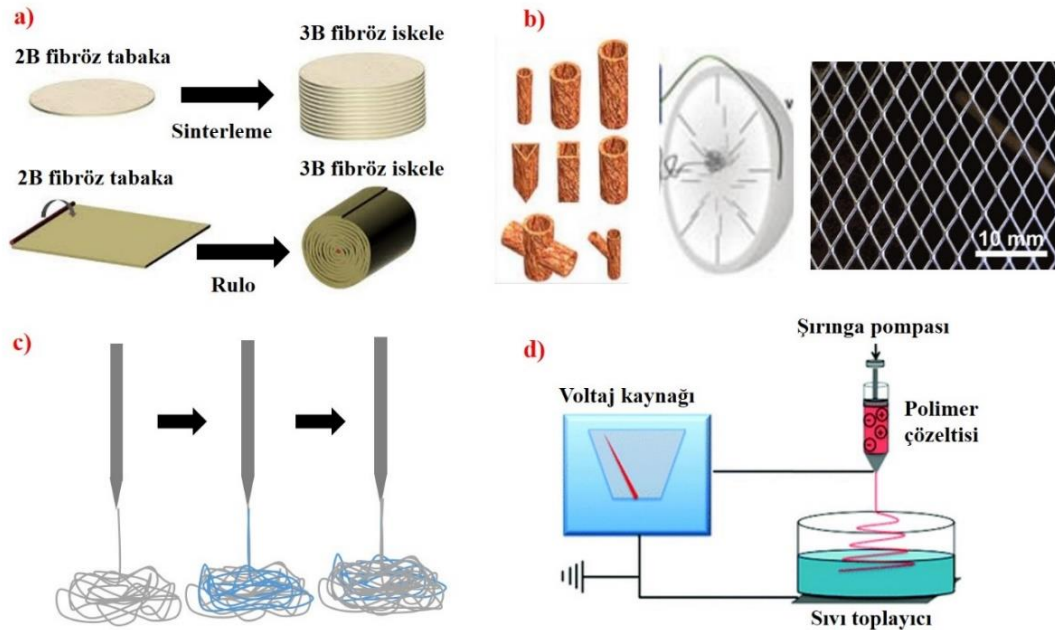
iskelelerin üretimi için birçok 3B elektroğirme tekniği geliştirilmiştir [21]. Bu yöntemlerden bazıları aşağıda özetlenmiştir, (Şekil 2.15).

### **Geleneksel elektroğirme ile üretilmiş fibröz tabakaların bir araya getirilmesi:**

Geleneksel elektroğirme işlemi ile üretilen 2B fibröz tabakalar, üst üste dizilerek ya da rulo şeklinde sarılarak 3B yapılar elde edilebilmektedir. Her ne kadar 3B bir yapı elde edilse de, birleştirilen tabakalar 2B yapının özelliklerini ve dezavantajlarını taşımaktadır.

### **Toplayıcı modifikasyonu:**

Toplayıcı şekli ve yapısı değiştirilerek, geleneksel elektroğirme yöntemi ile 3B yapıda fibröz iskelelerin eldesi mümkündür. Toplayıcı üzerinde elektriksel iletkenlikten etkilenmeyen bölgeler ve boşluklar oluşturularak, küresel ve silindirik iskeleler elde edilebilmektedir. Bu yöntem ile her zaman 3B yapılar elde edilemese de, 2B fibröz iskelelerden farklı olarak büyük gözenekli iskeleler üretilmektedir. Ayrıca bu yaklaşım herhangi bir ajan kullanılmasına gerek olmadığı ya da ilave bir işlem gerektirmediği için de tercih edilmektedir.



Şekil 2.15. Üç boyutlu fibröz doku iskelesi üretim yöntemleri, a) Geleneksel elektroğirme ile üretilmiş fibröz tabakaların bir araya getirilmesi, b) Toplayıcı modifikasyonu, c) İki boyutlu fiberlerin katmanlar halinde toplanması, d) Islak elektroğirme.

### **İki boyutlu fiberlerin katmanlar halinde toplanması:**

Bu yöntemde geleneksel elektroğirme yöntemi ile üretilen fiberlerin üzerinde, başka fibröz matrislerin toplanması ile 3B yapılar elde edilmektedir. Aynı yapı, paralel şıngalardan farklı polimer çözeltilerinin eğrilmesi ile de üretilebilmektedir. Üç boyutlu yapının kalınlığı toplama süresine bağlı olarak değişmektedir.

### **Islak elektroğirme:**

Bu yöntemde geleneksel elektroğirme yönteminde kullanılan toplayıcıdan farklı olarak, sıvı toplayıcı kullanılmaktadır. İki boyutlu eğirmede fiberler elektrostatik kuvvetlerin etkisi ile metal toplayıcıya yapışırken, bu yöntemde toplayıcıya ulaşan fiberler sıvı derinliği boyunca batarlar ve 3B fibröz yapıyı oluştururlar. Sıvı toplayıcı olarak yüzey gerilimi görece düşük, hızlıca buharlaşabilen etanol, bütil alkol ve metanol gibi sıvılar kullanılmaktadır. Sıvı toplayıcı olarak yüzey gerilimi yüksek olan su gibi sıvılar kullanıldığında, fiberlerin batmamasına bağlı olarak yoğun fibröz matrisler elde edilmektedir. Bu nedenle mümkün olduğunda fiber-hava-sıvı arayüz gerilimi düşürülerek, işlemin etkinliği artırılmaktadır.

### **2.4. Poli (3-hidroksibutirat) (P3HB)'nin Yapısı ve Fiziksel Özellikleri**

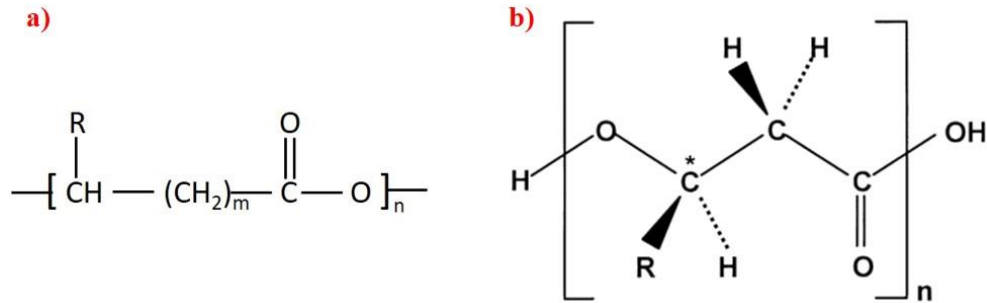
Polihidroksialkanoatlar (PHA), mikroorganizmalar tarafından dengesiz büyüme koşulları altında üretilen biyolojik olarak parçalanabilir, biyoyumlu poliesterlerdir. PHA ailesinin özellikleri, PHA ve kompozitlerini doku mühendisliğinde kullanılan diğer biyomalzemeler kadar cazip kılmaktadır. Yüzden fazla PHA yapısı bu güne kadar rapor edilmiştir. PHA ailesinin bir üyesi olan P3HB (poli-3-hidroksibutirat) ilk kez 1926'da Fransız bilimci Lemoigne tarafından *Bacillus megaterium* bakterilerinde keşfedilmiştir [22].

Ayrıca bu güne kadar P3HB dışında, 3-hidroksibutirat (3HB) ve 3-hidroksivalerat (PHBV), poli 4-hidroksibutirat (P4HB) kopolimerleri, 3-hidroksibutirat ve 3-hidroksiheksanoat kopolimerleri (PHBHHx) ve poli-3-hidroksioktaonat (PHO) polimerleri de tanımlanmış olup, doku mühendisliği uygulamaları ve çeşitli biyolojik uygulamalarda kullanılmaktadırlar [1]. Çizelge 2.4'te PHA'nın bazı tıbbi uygulamaları verilmiştir.

Çizelge 2.4. PHA'ların tıbbi uygulamaları ([22]'den değiştirilerek)

Uygulama Tipi	Ürün
Yara tedavisi	Dikiş iplikleri, deri eşlenikleri, sinir kelepçeleri, cerrahi örtüler, zımbalar, temizleme bezleri
Vasküler sistem	Kalp kapakçıkları, kardiyovasküler örtüler, perikardiyal yamalar, vasküler greftler
Ortopedi	Kıkırdak doku iskeleleri, spinal kafesler, kemik greftleri, menüsküs rejenerasyonu, sabitleme ekipmanları (vidalar vb.)
İlaç taşınımı	Kanser tedavisi için mikro ve nanopartiküller
Üroloji	Ürolojik stentler
Dental	Periodontit rejenerasyonunda yönlendirme için bariyer malzemesi
Bilgisayar destekli tomografi ve ultrason görüntüleme	Kontrast ajanı

Elde edildiği bakteri türü ve büyüme koşullarına bağlı olarak elde edilen PHA'ların kimyasal bileşimi ve molekül ağırlığı değişmektedir. Ancak PHA polimerlerinin molekül ağırlığı genel olarak 200.000 Da ile 3.000.000 Da arasındadır. PHA'lar zincir uzunluklarına göre 3 gruba ayrılmaktadır. İlk grup karbon sayısı 3 ile 5 arasında değişen kısa zincirli (scIPHA) PHA'lardır. İkinci grup karbon sayısı 6 ile 14 arasında değişen orta zincirli (mcIPHA), üçüncü grup ise karbon sayısı 14'ten fazla olan uzun zincirli (lcIPHA) PHA'lardır. P3HB, bu gruplar içerisinde orta zincirli PHA sınıfına girmektedir [22]. Şekil 2.16'da PHA ve P3HB'nin moleküler yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.16. PHA polimerleri, a) PHA polimerlerinin genel kimyasal yapısı, b) P3HB polimerinin kimyasal yapısı.

Şekil 2.16.a’da verilen PHA yapısında m; 1, 2 ve 3 değerlerini alabilirken, n değeri 100 ile birkaç bin arasında değişmektedir. “m” değeri 1 iken R=CH<sub>3</sub> ve monomer yapısı 3-hidroksibutirat ya da R=C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> ve monomer yapısı 3- hidroksiheksanoat’tır. Şekil 2.16.b’de verilen P3HB yapısı ise aynı zamanda orta zincirli (mclPHA) PHA polimerlerinin kimyasal yapısının gösterimidir. Tüm P3HB monomerleri R pozisyonunda kiral merkeze (\*) sahiptir. P3HB’nin erime sıcaklığı 172 ile 179 °C arasında değişmekte olup, molekül ağırlığı yaklaşık olarak 300 kDa’dur. Çizelge 2.5’te PHA polimerlerinin bazı özelliklerinin karşılaştırılması verilmiştir.

Çizelge 2.5. PHA polimerlerinin çeşitli özelliklerinin karşılaştırılması ([23]’ten değiştirilerek)

Polimer	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	Young Modülü (GPa)	Çekme Direnci (GPa)	Kopmadaki Uzama (%)
P(3HB) veya PHB	179	4	3.5	40	5
P(3HB-ko-%3 mol 3HV)	170	-	2.9	38	-
P(3HB-ko-%9 mol 3HV)	162	-	1.9	37	-
P(3HB-ko-%20 mol 3HV)	145	-1	1.2	32	-
P(3HB-ko-%3 mol 4HB)	166	-	-	28	45
P(3HB-ko-%16 mol 4HB)	-	-	-	26	444
P(3HB-ko-%64 mol 4HB)	50	-	30	17	591
P(4HB) veya P4HB	53	-51	149	104	1000
P(3HB-ko-%10 mol 3HHx)	127	0	-	21	400
P(3HB-ko-%17 mol 3HHx)	120	-2	-	20	850
P(3HHx-co-3HO)	61	-	-	10	300
P(3HB-ko-3HV-ko-3HHx)	113	1.3	0.3	5.1	263

P3HB, hücre içi enerji depolama bileşiği olarak bakterilerde bulunmakla beraber özellikle düşük molekül ağırlıklı cPHB (M<sub>w</sub> <14000 Da) maya, yer fıstığı, ıspanak, koyun (bağırsak) ve kedi (kas) gibi ökaryotik canlılarda da bulunmaktadır [22]. Düşük molekül ağırlıklı P3HB (cPHB) hücrelerin içerisinde başka moleküller ile kompleksler oluşturur. Kompleks oluşumu cPHB’nin kimyasal ve fiziksel yapısında değişimler meydana getirir ve bu değişimle birlikte cPHB, hücrenin hem hidrofilik hem de hidrofobik bölgelerinde etkinlik



gösterebilmektedir. Bu nedenle cPHB sitoplazmada, lipoproteinlerde, hücreler arası sıvılarda ve membranlarda bulunabilmektedir. Ayrıca cPHB hücre metabolizmasındaki tuzları çözerek, tuzların hidrofobik bölgelerden geçişini düzenler. Bu bilgiler ışığında P3HB'nin oligomerlerinin ve monomerlerinin de hücrelere toksik olmadığı söylenebilmektedir [1].

P3HB polimeri insan vücudunda 3-hidroksi butirat (3HB) monomerinden oluşmaktadır. İnsan kanında keton formunda 3-10 mg/100 mL oranında bulunan 3HB, genelde dimer ya da trimer olarak var olan bir yapıdır. Beynin glikoz kaynağı sınırlandığında, enerji kaynağı olarak 3HB monomeri kullanılır. 3HB dimer ve trimerlerinin sıçan serumu ile ya da karaciğer homojenatları ile inkübe edildiğinde tamamen monomerlerine ayrıştığı tespit edilmiştir. Kandaki keton seviyesinin çeşitli metabolik hastalıkların kontrolü için belirli bir seviyede tutulması gerekir. Protein katabolizmasının azaltılması, iştah bastırılması, parenteral beslenme, kardiyak etkinlik, diyabetin ve insülin dirençli durumların tedavisinin yanı sıra nörodejeneratif bozukluklar ve epilepsi tedavisi de dahil olmak üzere birçok metabolik hastalığın kontrolü için ağız veya damar yolu ile 3HB verilebilmektedir. Genel olarak polihidroksialkonat ailesinin üyelerinin bozunma ürünleri çözünmez formdadır. Sitotoksik bir etkileri olsa dahi kolaylıkla lipozomlar tarafından enkapsüle edilerek sitozollere dönüştürülürler. Fakat bozunma ürünlerinin kanda 20 mg/L'den fazla olmamasına dikkat edilmesi gerekir. Bu etkinin üstesinden gelebilmek için genellikle polimerin zincir uzunluğu arttırılır. Bunlara ek olarak 3HB monomerinin kalsiyum varlığında hücrenin L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarına etki ederek hücre proliferasyonuna destek sağladığı da kanıtlanmıştır [23].

P3HB yüksek kristaliniteye [2, 3] ve düşük biyobozunma hızına (6-12 ay) sahiptir [4-5]. Erime noktası civarında termal kararsızlıklar gerçekleşir [24, 25]. Bununla beraber oldukça hidrofobik bir yapıdadır [7, 8]. P3HB aynı zamanda piezoelektrik ve piroelektrik özelliklere sahip bir polimerdir [26-28]. Piezoelektrik özellik, malzemenin mekanik etkiye maruz kaldığında elektrik potansiyel üretebilme; piroelektrik özellik ise, malzemenin mekanik etkiye maruz kaldığında voltaj farkı üretebilme yetisidir. Bu bağlamda mekanik etkiye maruz kalan P3HB'nin, elektriksel aktivite göstermesi beklenmektedir. Böylece, dışarıdan verilen mekanik ve elektriksel etkenlerin baskın olduğu dokularda; P3HB'nin osteojenik, kondrojenik, nörojenik ve miyojenik farklılaşmayı destekleyeceği öngörülebilmektedir.

#### 2.4.1. P3HB'nin doku mühendisliğinde kullanımı

P3HB biyobozunur, biyouyumlu ve biyolojik metabolizma tarafından emilebilir olma özelliklerine sahip bir polimerdir. Bu özellikler P3HB'yi potansiyel bir doku iskelesi malzemesi kılar. Literatürde P3HB'nin doku iskelesi olarak kullanımına yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

PHB'nin biyouyumluluğu, osteoblastik ve epitel hücre hatlarında adezyona katılan hücresel moleküllerin yapısal organizasyonu incelenerek tespit edilmiştir [29]. Aynı zamanda, P3HB ve PHBV filmleri üzerinde kültüre edilen fibroblastlar, endotel hücreleri ve izole edilmiş hepatositlerin yüksek düzeyde hücre adezyonu sergilediği gözlemlenmiştir [30]. P3HB ve kopolimerlerinin iskele olarak kullanıldığı bir başka çalışmada, sinir kök hücrelerinin (NSCs) proliferasyonu ve gelişimi hem iki boyutlu hem de üç boyutlu matrislerde incelenmiştir [31]. Ayrıca Masaeli ve arkadaşları elektroçirime ve tuz uzaklaştırma metodu ile ürettikleri P3HB iskeleler ile maymun epitel böbrek hücrelerini (Vero) ve fare mezenkimal kök hücrelerini (mMSCs) kullanarak yaptıkları hücre kültür çalışmalarında iskele üretim yönteminin hücre tutunması ve çoğalmasındaki etkilerini araştırmışlardır [32].

P3HB ve kopolimerlerinin tek başına kullanıldığı çalışmalar P3HB'nin doku mühendisliğinde kullanımını sınırlayan bazı özelliklerinin iyileştirilmesi gerektiğini göstermiştir. P3HB'nin yüksek kristalinitesi ve yüksek hidrofobisitesi bu özellikler arasında sayılabilmektedir. P3HB'nin yüksek kristalleşme derecesi ve hızlı kristalleşme hızı P3HB film yüzeyinde gözenekler ve çıkıntılar üretir, bu koronaloid yüzey memeli hücrelerinin tutunmasını ve çoğalmasını engelleyebilmektedir [1]. Ayrıca her hücre tipine göre farklı olmakla birlikte, malzeme yüzeyine proteinlerin ve hücrelerin tutunmasının gerçekleşebilmesi için malzemenin optimum ıslatılabilirlik değerinde olması gerekir. P3HB bu açıdan yüksek hidrofobisitesi nedeniyle yetersiz kalmaktadır. Bu dezavantajları dolayısıyla P3HB, başka malzemelerle kompozit hale getirilerek, yüzey modifikasyonu yapılarak ya da diğer polimerlerle karıştırılarak kullanılmaktadır. Şekil 2.17'de P3HB, P3HB kopolimerleri ve karışımları ile yapılmış *in vivo* çalışmalardan bazı örnekler verilmiştir.



Şekil 2.17. P3HB kopolimer ve kompozitlerini içeren iskelelerin bazı *in vivo* uygulamaları, a) Desellülarize domuz aort kapağı/PHBHHx hibrit kalp valfi, b) Tavşan abdominal aorta implante edilen PHBHHx/desellularize vasküler hibrit yaması, c) İki aylık postoperatif dönemde 10 cm PHBHHx özofagusta oluşan kalın bir hücre tabakası, d) Sıçanların siyatik sinirinde 10 mm'lik kusurları köprüleyen PHBHHx sinir kabloları, e) TCP, PHBHHx ve P(3HB-4HB-3HHx) iskeleler üzerinde insan MSC'lerin osteojenik farklılaşması, f) Kıkırdak hasarlarını onaran PHBHHx implant ([23]’ten değiştirilerek).

Kemik doku gibi sert dokuların rejenerasyonu için P3HB ve hidroksiapatit (HA) kompozit doku iskeleleri oluşturularak biyoaktif ve biyolojik olarak parçalanabilir yapıların eldesi mümkündür. Bu bağlamda yapılmış bir çalışmada 37°C’de yapay vücut sıvısına (SBF) daldırılan HA/P3HB kompozitinin üzerinde kısa sürede kemik benzeri apatit tabakasının oluştuğu ve kompozitin *in vitro* biyoaktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Oluşturulan kompozitin biyoaktivitesinin ve mekanik özelliklerinin yapıdaki HA oranına göre değiştiği de bulgular arasındadır [33]. Bu bulguyu destekler nitelikteki başka çalışmalarda ise HA/P3HB ve trikalsiyum fosfat (TCP)/P3HB doku iskelelerin kemik doku oluşumunu desteklediği tespit edilmiştir [34,35]. Ayrıca Doyle ve ark.’ları, HA kaplı P3HB doku iskeleleri ile yaptıkları 12 aylık *in vivo* kemik doku çalışmasında, implantasyon sonrasında herhangi bir kronik inflamatuvar yanıtın oluşmadığını ve iskelelerin kemik doku oluşumunu desteklediğini göstermişlerdir [36]. Bir diğer çalışmada ise gözenekli (P3HB)/(nHA) kompozit doku iskeleleri üzerinde kemik tümörjenik MG 63 hücrelerinin çoğalması

incelenmiş ve kompozitin hücre tutunması ve çoğalmasında P3HB'den üstün olduğu sonucuna ulaşılmıştır [37].

P3HB ve kopolimerlerinin biyouyumluluğunun artırılmasında yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntem P3HB'nin yüzeyini çeşitli protein ve ECM bileşenleri ile modifiye etmektir. Bunun yanında iyon implantasyonu ve yüzeyde reaktif grupların oluşturulması yoluyla da yüzey modifikasyonlarına gidilmektedir. Farklı gözenek boyutlarına sahip P3HB iskeleler ile yapılan bir çalışmada iskele yüzeyleri lipaz ile modifiye edilerek, jelatin ve glikozamin gibi fonksiyonel grupların malzeme yüzeyine kimyasal olarak bağlanması sağlamıştır. Fonksiyonellik kazandırılan P3HB iskeleler ile embriyonik insan fibroblast hücrelerinin tutunma ve çoğalma davranışları incelenerek, yüzey modifikasyonlarının olumlu sonuçlar oluşturduğu gösterilmiştir [38]. İnsan mezenkimal kök hücreleri (hMSCs) ekili kolajen I (coll I)- ve kolajen I/kondroitin sülfat (coll I/CS)-kaplı P3HB iskeleler ile fareler üzerinde yapılan bir *in vivo* çalışmada ise iskelelerin osteojenik farklılaşmaya ve damarlanmaya katkısı değerlendirilmiştir [39]. Çalışmada yüzeyi modifiye edilmiş P3HB iskeleler üzerinde hMSCs'ler farklılaştırılmış, ardından bu iskeleler farelere implante edilmiştir. İmplantasyondan bir süre sonra damarlanma bulgularına rastlanmış ve osteojenik aktivite immünohistokimyasal ve histolojik analizlerle tespit edilmiştir. Tesema ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, PHBV filmlerin yüzeylerine kimyasal ve fiziksel olarak kolajen immobilize edilerek, yüzey modifikasyonunun hücre tutunmasına olan katkısı incelenmiştir [40]. Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise P3HB, PHBV ve PHBHHx filmlerin yüzeyleri 40 keV C + iyon implantasyonu ile modifiye edilmiş, fibroblast hücreleri ile yapılan hücre kültürü sonucunda iyon implantasyonu yapılmış filmlerin biyouyumluluğunun yüksek olduğu gösterilmiştir [41]. Jelatin ile kaplanmış P3HB'nin ise adrenokortikal hücreleri için uyumlu bir yüzey olduğu, hücrelerin bu yüzeye rahatlıkla tutunup üredikleri de tespit edilmiştir. Modifiye edilmiş P3HB'nin, adrenokortikal hücrelerin transplantasyonu için iyi bir materyal olduğu sonucuna varılmıştır [42].

P3HB'nin doku mühendisliği alanında sahip olduğu olumsuz özellikleri ortadan kaldırmak ve yeni özellikler katmak için, başka polimerlerle veya plastikleştiricilerle karıştırma [43-57] veya mevcut polimerin kopolimerlerini hazırlama [58-64] en çok üzerinde durulan yöntemlerdir. Daha esnek polimerlerle veya plastikleştiricilerle karıştırarak P3HB'nin mekanik dayanıklılık [43-46] hidrofilitate [2,8] ve biyobozunurluk [65,66] özelliklerinde istenen değişimler sağlanmaktadır.

P3HB'nin polietilenoksit (PEO) [49], ve polivinilalkol (PVA) [57] ile homojen (miscible) karışımlar oluşturduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Ayrıca P3HB'nin karışmayan veya kısmen karışan ikili karışımlar oluşturduğu da bilinmektedir. Örneğin, Kumagai ve Doi [65] P3HB/poli(propiolakton), P3HB/poli(etilen adipat) ve P3HB/poli(3-hidroksi butirik asit - ko-3-hidroksi valerik asit) karışımlarının termal özelliklerini ve enzimatik biyobozunmalarını incelemişlerdir. Bu karışımlarda bileşenlerin her birinin camsı geçiş sıcaklıklarının gözlendiği ve tamamen karışmadıkları tespit edilmiştir. Buna ek olarak karışım sonucunda her bileşenin biyobozunma hızının arttığını gözlemlemişlerdir ve karışımların faz ayrımına sahip yapılarından dolayı bir bozunma hız artışına sahip oldukları sonucuna varmışlardır. Polimer karışımlarının biyobozunma davranışları belirlenirken karışım bileşenlerinin tek tek bozunmaları, karışımın bileşimi, faz yapısı ve materyalin yüzeyindeki karışım bileşimi gibi parametreler göz önüne alınmalıdır. Bu anlamda polimer karışımlarının karışabilirliğinin (uyumluluğu ve homojenitesi) belirlenmesi önemlidir.

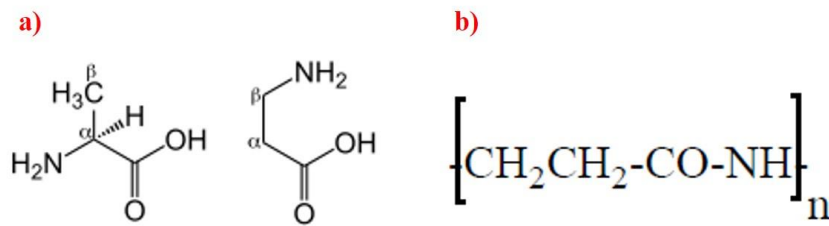
PLLA ve PHBV polimerlerinin farklı oranlarda ikili karışımlarını içeren doku iskeleleri ile yapılan bir çalışmada, Vero hücreleri ile iskeleler etkileştirilmiş, karışım oranına göre hücrelerin tutunma ve çoğalma davranışları incelenmiştir. En iyi tutunma ve proliferasyon davranışı (60/40) ve (50/50) oranında PLLA/PHBV içeren iskelelerde tespit edilmiştir [67]. Cheng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise P3HB ve polietilen glikol (PEG) polimerleri farklı oranlarda karıştırılarak, karışımların kan ile biyouyumluluğu test edilmiştir. Ardından Çin hamster akciğer (CHL) fibroblast hücreleri iskeleler ile etkileştirilmiş ve hücrelerin iskeleler üzerine iyi bir şekilde tutundukları ve yayıldıkları görülmüştür [68]. Shishatskaya ve arkadaşları P3HB, P3HB/PHV, ipek ve katgüt sütürleri deney hayvanlarına intramusküler implantasyon ile yerleştirmişler ve sonuçları karşılaştırmışlardır. İpek ve katgüte benzer olarak P3HB ve P3HB/PHV'nin de 1 yıl sonunda herhangi bir akut ya da kronik inflamasyona yol açmadığı görülürken; nekroz, tümör oluşumu ve fibröz yara dokusu oluşumuna da rastlanmamıştır. PHA polimerlerinden üretilen monofilament sütürlerin, özellikle yüz kasları ile ilgili cerrahi uygulamalarda PHA'ların mekanik özellikler açısından uyumluluğu nedeniyle kullanılması da tavsiye edilmektedir [30].

P3HB fibröz iskeleler, omurilik yaralanmasından sonra nöronal sağkalımı ve rejenerasyonu destekleyen taşıyıcı iskele olarak da kullanılabilir. Örneğin Novikov ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada aljinat hidrojel ve fibronektin ile kaplı P3HB fibröz greftler, yetişkin sıçanlarda servikal omurilik yaralanmasından sonra lezyon boşluğuna implante edilmiştir. Kontrol gruplarında sadece aljinat hidrojel ve fibronektin veya bunların bileşimi

kullanılmıştır. Buna ek olarak, servikal omurilik yaralanmasından sonra nörotropik faktörler olan BDNF veya NT-3 ile intratekal olarak tedavi edilen hayvanlarla karşılaştırmalar yapılmıştır. Rubrospinal sistem nöronları deneysel model olarak alınmıştır. Aljinat hidrojel ve fibronektin kaplı P3HB, fibröz greftlerin implantasyonu sonrasında hasarlı rubrospinal nöronların, P3HB grefti taşımayan hayvanlara göre, %45 oranında azaldığı görülmüştür. Ayrıca BDNF veya NT-3 ile tedavi gören hayvanlara benzer şekilde hücre kaybının %50 oranında azaldığı da tespit edilmiştir. P3HB desteği taşımayan gruplarda hücre sağkalımına rastlanmamıştır. Neonatal Schwann hücrelerinin P3HB greftine eklenmesinden sonra, yenilenen aksonların grefti her iki ucundan sardığı ve tüm uzunluğu boyunca uzattığı görülmüştür [69]. Bu uygulamaların yanı sıra; PHA'ların, P3HB'nin ve modifiye edilmiş P3HB'nin kalp kapakçığı, damar, kemik, kıkırdak, sinir sistemi ve özofagus doku mühendisliği alanında birçok uygulaması bulunmaktadır.

## 2.5. Poli-β-alanin (PBA) ve Türevleri'nin Yapısı ve Fiziksel Özellikleri

Poli-β-alanin (PBA veya nylon-3) yüksek amit grubu içeriği nedeniyle kristal derecesi yüksek, alifatik naylonlar içerisinde termal ve mekanik direnci en yüksek (hatta ipek ile yarışabilen) poliamittir. PBA zincirleri yapısındaki amit grubu (CONH) nedeniyle protein moleküllerine benzemektedir. Sentez türüne ve koşullarına göre molekül ağırlığı değişmekle birlikte molekül ağırlığı yaklaşık 40 kDa'dur. Erime sıcaklığı yaklaşık 300°C'dir. PBA aynı zamanda antibakteriyal [70] antifungal [71] ve protein adsorblayıcı [72] özelliklere de sahiptir. Şekil 2.18.b'de PBA'nın moleküler yapısı verilmiştir.

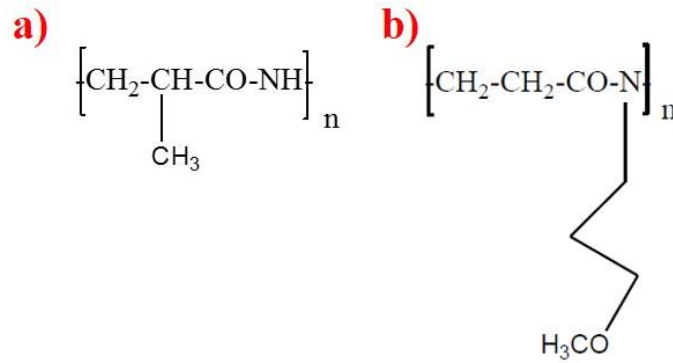


Şekil 2.18. a) α-alanin (sol) ve β-alanin (sağ) yapıları, b) Poli-β-alanin'in moleküler yapısı.

Beta-alanin monomeri amino grubunun karboksilat grubuna β-konumunda bağlı olduğu doğal olarak oluşan bir beta amino asittir. Alfa-alanin'den farklı olarak, β-alanin'in herhangi bir üç boyutlu merkezi yoktur (Şekil 2.18.a). Alfa-alanin, herhangi bir büyük protein veya enzimin biyosentezinde kullanılmaz. *In vivo* koşullarda dihidrourasil ve karnozinin bozunmasıyla oluşur. Doğal olarak oluşan peptidlerin bir parçası olan karnozin, anserin ve ayrıca koenzim A'nın bir bileşenini oluşturan pantotenik asitin (vitamin B5) yapısında

bulunur. Normal koşullar altında,  $\beta$ -alanin asetik aside metabolize olur. Beta-alanin, karnozinin hız sınırlayıcı öncüsüdür. Karnozin seviyeleri histidine değil, mevcut  $\beta$ -alaninin miktarına bağlıdır. Beta-alanin desteğinin, kaslardaki yorgunluğu azalttığı, karnozin derişimini ve toplam kas işini arttırdığı gösterilmiştir [73,74].

Şekil 2.19’da, poli( $\beta$ -alanin-ko-etilenoksit) (PMBA) ve poli(N-(3-metoksipropil)- $\beta$ -alanin)) (PNMPBA)'nın molekül yapıları verilmiştir. Poli( $\beta$ -alanin-ko-etilenoksit) (PMBA) ve poli(N-(3-metoksipropil)- $\beta$ -alanin)) (PNMPBA)'nın tekrarlanan birimlerine bakıldığında sırasıyla PBA kopolimeri ve PBA türevi olarak düşünülebilmektedir.



Şekil 2.19. PBA kopolimeri ve PBA türevi, a) Poli( $\beta$ -alanin-ko-etilenoksit) (PMBA), b) poli(N-(3-metoksipropil)- $\beta$ -alanin)) (PNMPBA).

Poli( $\beta$ -alanin-ko-etilenoksit)'in,  $\beta$ -alanin yapısına ek olarak yumuşak segment olan etilenoksiti ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ) içermesi bu polimerin PBA'ya oranla daha esnek olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde poli(N-(3-metoksipropil)- $\beta$ -alanin)'in, azota bağlı asılı grubu (3-metoksipropil) sayesinde PBA'ya oranla daha esnek zincirli ve PBA'ya kıyasla karışım oluşturma eğiliminin daha yüksek olduğu söylenebilmektedir.

### 2.5.1. PBA ve türevlerinin doku mühendisliğinde kullanımı

PBA, sanayide poliasetalleri kararlı kılıcı olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında toprak şartlandırma, katkı maddesi, formaldehit süpürücü, kaplama materyali olarak kullanılması önerilmektedir [75]. Aynı zamanda bir poliaminoasit (poli- $\beta$ -alanin) olmasına rağmen literatürde tek başına biyopolimer olarak hiçbir çalışmada adı geçmemektedir. Fakat yakın zamanda, nylon-3 kopolimerleri ile yapılan bir çalışmada nylon-3 kopolimerlerinin bazılarının hücre yapışmasını desteklediği, polistiren ve kollajen kaplı cam gibi pozitif doku kültürü substratlarına göre benzer hatta bazen daha üstün morfolojiler sergilediklerini gösterilmiştir [76]. Başka bir çalışmada nylon-3 kopolimerlerin “host-defense” peptitlerinin favori özelliklerini taklit ettikleri ve bu kopolimerlerdeki yapı-aktivite ilişkisinin bulunduğu

belirlenmiştir [70]. Benzer bir başka çalışmada nylon-3 kopolimerlerinin akciğer yüzey aktif proteinlerini taklit ettiği ve bu amaçla kullanılan spesifik oligomerlere göre daha avantajlı olabileceği tartışılmıştır [77].

Zhang ve arkadaşlarının yeni nylon-3 kopolimerlerinin sentezi ve biyolojik özellikleri üzerine çalışmaları bulunmaktadır [78,79]. Nylon-3 polimerlerinin spesifik kimyasal özelliklerinin protein adsorpsiyon derecesi ile ilişkili olduğunu, bunun da serum içeren bir ortamda hücre yapışmasıyla orantılı olduğunu ortaya koymuşlardır [79]. Liu ve arkadaşları daha uzun zincirli nylon-3'lerin daha iyi fibroblast tutunması sağladığını, optimal zincir uzunluğunda daha az hidrofobik nylon-3 alt birimlerin en üstün sonuç verdiğini ve yine bazı nylon-3 kopolimerlerinin *Candida albicans* mantarı için etkili antifungal aktiviteye sahip olduğunu bazılarının ise antibakteriyal özellik sergilediğini göstermişlerdir. Bu davranışları nylon-3 alt birimlerinin yapısıyla ilişkilendirmişlerdir [71,80-81].

Her ne kadar poliamitlerin enzimatik bozunmaya dirençli oldukları bilinse de sıkça kullanılan bazı poliamitlerin (nylon4 [82], nylon-6 [83,84], nylon-66 [84,85]) biyobozunurluğu ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur. Ancak PBA ve tez kapsamında kullanılan PBA türevlerinin biyobozunurluğu ve sitotoksitesi ile ilgili bilinen çalışma bulunmamaktadır. Poliamitlerin biyobozunmasının amit grubu üzerinden olacağı öngörülerek amit grubu yoğunluğunun çok daha fazla olduğu PBA ve türevlerinin nylon-66 ve nylon-6'dan daha kolay ve hızlı biyobozunma sergileyeceği beklenmektedir. Ayrıca, karışabilir (miscible) poliamit karışımlarında poliamit zincirlerinin istiflenerek kristallenmesi engelleneceği için biyobozunma hızında kristalinite azalmasından kaynaklı artış da beklenmektedir.



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez çalışması kapsamında kullanılan malzemelere, farklı doku iskelesi üretim tekniklerine ve bu teknikler için kullanılan deneysel yöntemlere yer verilmiştir. İlk aşamada, poli-3hidroksibutirat (P3HB) polimeri poli- $\beta$ -alanin (PBA), poli( $\alpha$ -metil- $\beta$ -alanin) (PMBA) ve poli[N-(3-metoksipropil- $\beta$ -alanin) (PNMBA) polimerleri ile belirli oranlarda karıştırılarak dondurarak kurutma yöntemiyle 3 boyutlu süngerimsi (sponge-like) doku iskeleleri elde edilmiştir. Karakterizasyon çalışmalarından sonra bu yöntem ile üretilen doku iskelelerinin morfolojik ve mekanik özelliklerinin doku mühendisliğine uygun olmadığı görülmüştür. Bu nedenle ikinci aşamada elektroğirme yöntemi ile doku iskeleleri üretilmiştir. Çalışmada geleneksel ve ıslak olmak üzere 2 farklı elektroğirme tekniği kullanılmış; geleneksel elektroğirmede 2 boyutlu fibröz, ıslak elektroğirmede 3 boyutlu fibröz doku iskeleleri elde edilmiştir. Son aşamada ise, 3 boyutlu fibröz doku iskeleleri ile MC3T3-E1 pre-osteoblast hücre hattı kullanılarak 21 günlük hücre kültürü çalışması yapılmıştır. Dondurarak kurutma ve elektroğirme yöntemleri ile üretilen doku iskelelerinin kimyasal, fiziksel ve mekanik özellikleri; hücre kültürü çalışması boyunca malzeme yüzeyindeki hücrelerin morfolojisi, tutunma ve çoğalma davranışları aşağıdaki başlıklarda detayları verilen analizlerle incelenmiştir.

#### 3.1. Kullanılan Malzemeler

Tez çalışması kapsamında kullanılan poli[(R)-3-hidroksi bütirik asit] Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan iskeleler için kullanılan çözücü kloroform ve gözenek yapıcı ajan asetik asit olup, sırasıyla Merck (Almanya) ve RDH Chemicals (Almanya) firmalarından satın alınmıştır. İskele yapımında kullanılan güçlendirici ajanlar; poli- $\beta$ -alanin (PBA) ya da Nylon3, poli( $\alpha$ -metil- $\beta$ -alanin) (PMBA) ve poli[N-(3-metoksipropil- $\beta$ -alanin) (PNMPBA) sırasıyla akrilamit (Sigma), metakrilamit (Aldrich) ve N-metoksipropil akrilamit'in (Aldrich) hidrojen transfer polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Hidrolitik bozunma çalışmalarında kullanılan fosfat tampon çözelti (PBS, pH: 7.4) tabletleri ile enzimatik bozunma çalışmalarında kullanılan lipaz enzimi (30-90 unit/mg) ve sodyum azid Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Elektroğirme yöntemi için kullanılan çözücüler ise formik asit ve 1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol (HFIP) olup Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Yıkama ve 3 boyutlu elektroğirme işlemlerinde kullanılan etanol (%96, v/v) Colony Sugar Mills (Pakistan) firmasından temin edilmiştir.

Sitotoksosite testlerinde kullanılan L929 fare fibroblastik hücre hattı ile hücre kültürü çalışmalarında kullanılan MC3T3-E1 fare preosteoblast hücre hattı sırasıyla HÜKÜK (Hücre Kültürü Koleksiyonu) (Türkiye) ve Riken Hücre Bankası'ndan (Japonya) satın alınmıştır. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ile Minimum Essential Medium-Alfa Modifikasyonu ( $\alpha$ -MEM) kültür ortamları Biochrom (Almanya) ve hücrelerin yüzeyden kaldırılmasında kullanılan Tripsin-EDTA çözeltisi Sigma (Almanya) firmalarından, kültür ortamına eklenen L-glutamin, penisilin-streptomisin çözeltileri, fotal sığır serumu (FBS) ile Dulbecco'nun fosfat tampon çözeltisi (D-PBS) Biowest (Fransa) firmasından temin edilmiştir. Hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür (MTT) ve izopropanol Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından tedarik edilmiştir. Hücrelerin fiksasyonunda kullanılan glutaraldehit (GA) ve heksametildisilazan (HMDS) Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

### **3.2. P3HB ve PBA/türevleri ile Katkılanmış Doku İskelelerinin Üretimi**

P3HB ve PBA/türevleri ile katkılanan P3HB doku iskelelerinin üretimi için dondurarak kurutma ve elektroğirme yöntemleri uygulanmıştır. Çizelge 3.1'de doku iskelesi üretimi için uygulanan yöntemler, yöntemlerde kullanılan polimerler ve katkılama oranları özet halinde verilmiştir. Dondurarak kurutma ve elektroğirme yöntemleri ile iskelelerin üretim aşamaları aşağıda detaylandırılmıştır.

Çizelge 3.1. Dondurarak kurutma ve elektroğirme yöntemlerinde kullanılan polimerler ve katkılama oranları

Üretim Yöntemi	Polimerler			
	$\left[ \text{CH} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \end{array} \text{CH}_2 \text{-CO-O} \right]_n$ P3HB (w/v)* (%)	$\left[ \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{-CO-NH} \right]_n$ PBA(w/w) (%)	$\left[ \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{-C} \begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{N} \end{array} \right]_n$ $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{H}_2\text{C} \\   \\ \text{OCH}_3 \end{array}$ PNMPBA (w/w) (%)	$\left[ \text{CH}_2 \text{-CH} \begin{array}{c} \text{CO-NH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_n$ PMBA (w/w) (%)
Dondurarak Kurutma (3B)	5	2 5 10	2 5 10	2 5 10
Geleneksel Elektroğirme (2B)	5	10	-	-
Islak Elektroğirme (3B)	10	10	-	-

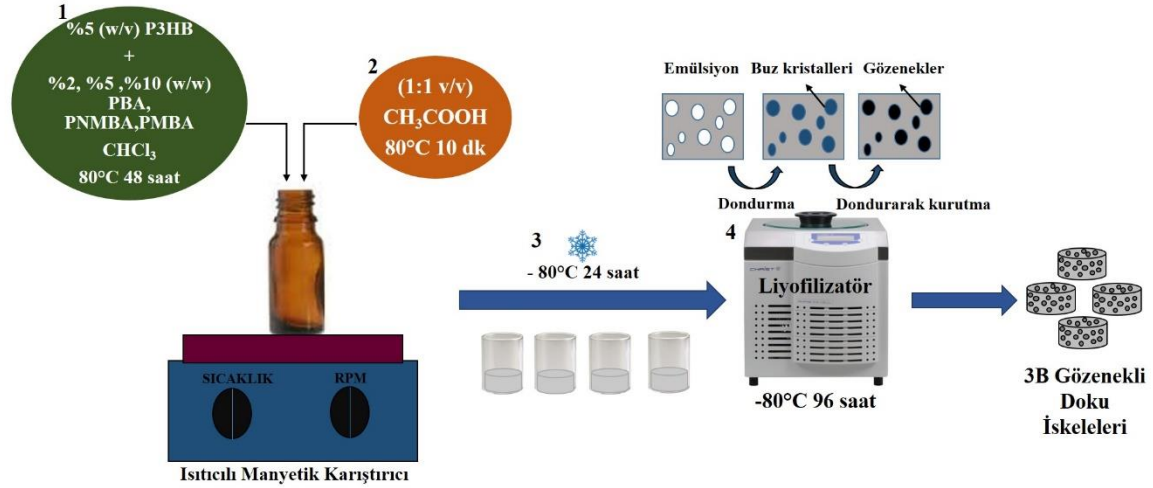
\*P3HB 100 birim kabul edilerek katkılama polimerleri P3HB'nin kütlece %2, %5 ve %10'u kadar katkılanmıştır.

### 3.2.1. Dondurarak kurutma yöntemi

Bu yöntemde kullanılacak polimer çözeltisinin hazırlanması aşamasında %5 P3HB (w/v) polimer çözeltisi, 0.25 g P3HB'nin 5 mL kloroform içerisinde, 80°C'de 48 saat boyunca ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözündürülmesiyle hazırlanmıştır. Homojen bir çözelti elde edildikten sonra yapıya gözenek yapıcı ajan olarak polimer çözeltisiyle hacimce aynı oranda (1:1) asetik asit eklenerek aynı sıcaklıkta 10 dk daha karıştırma işlemine devam edilmiş ve emülsiyon oluşturulmuştur. Üç buçuk mL hacimli 2 cm<sup>2</sup> taban alanına sahip cam kaplara dökülen emülsiyon, literatürdeki yöntemlere uygun şekilde -80°C'de 24 saat bekletilerek liyofilizatöre alınmış ve -80°C'de 96 saat boyunca dondurarak kurutulmuştur [86-88]. Elde edilen iskelelerin sulu ortamdaki kararlılığının incelenmesi amacıyla iskeleler PBS içeren distile su içerisinde 7 gün boyunca 37°C'de bekletilmiştir.

P3HB'nin çözme koşullarının optimizasyonundan sonra güçlendirici ajanların katkılanması basamağına geçilmiştir. Bu basamakta polimer çözeltisi, emülsiyon oluşturma aşamasına kadar aynı işlem basamakları izlenerek hazırlanmış ve polimer çözeltisindeki P3HB miktarı 100 birim kabul edilerek kütlece %2, %5 ve %10'u kadar PBA, PNMPBA ve PMBA katkılaması gerçekleştirilmiştir. Emülsiyon oluşturmada önce güçlendirici ajanlar polimer

çözeltilisine ilave edilmiş ve 80°C sıcaklıktaki ısıtıcı karıştırıcı yardımıyla 48 saat boyunca karıştırılarak homojen bir çözelti elde edilmesi sağlanmıştır. Eş hacimde asetik asit eklenerek emülsiyon oluşumu sonrasındaki işlemler tekrarlanmış ve polimer karışımlarından oluşan doku iskeleleri elde edilmiştir. Şekil 3.1’de dondurarak kurutma yöntemiyle 3B gözenekli doku iskelelerinin üretim aşamaları şematize edilmiştir.



Şekil 3.1. Dondurarak kurutma yöntemiyle doku iskelesi eldesi aşamaları. 1) P3HB polimerine %2, %5 ve %10 (w/v) oranlarında sırasıyla PBA, PNMPBA ve PMBA katkılmasının yapılması. 2) Polimer çözeltilisine eklenen gözenek yapıcı ajan ile emülsiyon oluşturulması. 3) Ön dondurma aşaması. 4) Dondurarak kurutma ile 3B gözenekli doku iskelesi eldesi.

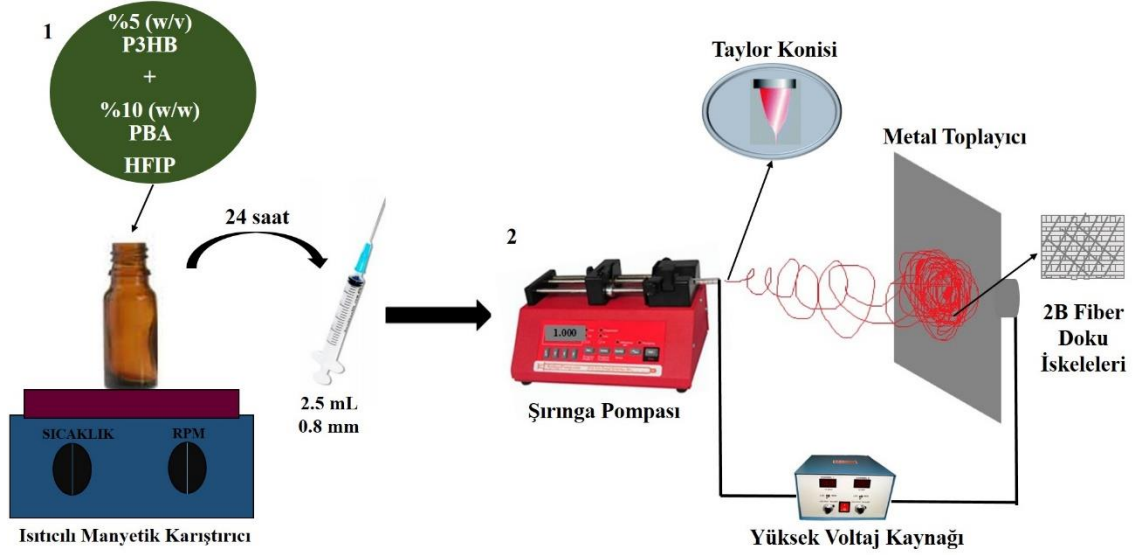
### 3.2.2. Elektroeğirme yöntemi

Dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen iskelelerin karakterizasyonu sonrasında bu yöntem ile elde edilen iskelelerin doku mühendisliğinde hedeflenen kullanıma uygun olmadığı görülmüş ve elektroeğirme yöntemine geçilmiştir. P3HB ve PBA katkılı P3HB fibröz doku iskeleleri, 2 boyutlu (2B) formda, geleneksel elektroeğirme ile ve 3 boyutlu (3B) formda, ıslak elektroeğirme yöntemleri ile elde edilmiştir.

#### 3.2.2.1. Geleneksel elektroeğirme

Kullanılan malzemelerin daha önceki çalışmalarda, tez kapsamında kullanılan çözücülerde ve tez kapsamında belirlenen oranlarda çözülerek elektroeğirme yöntemi ile üretilmemiş olması göz önünde bulundurularak 2 boyutlu geleneksel yöntem ile eğirme için gerekli olan optimum viskozite ayarlanmaya çalışılmıştır. P3HB (%10 w/v) ve PBA, PNMPBA, PMBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%10 w/v), P3HB (%5 w/v) ve PBA, PNMPBA, PMBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%5 w/v) karışımları formik asit içerisinde karıştırılarak 1 gece boyunca çözülmüştür. Ardından 0.8 mm iğne çapına sahip 2.5 mL'lik şırıngalara aktarılmıştır ve eğirme işlemi denenmiştir. Çözücünden kaynaklanan viskozite problemleri nedeniyle

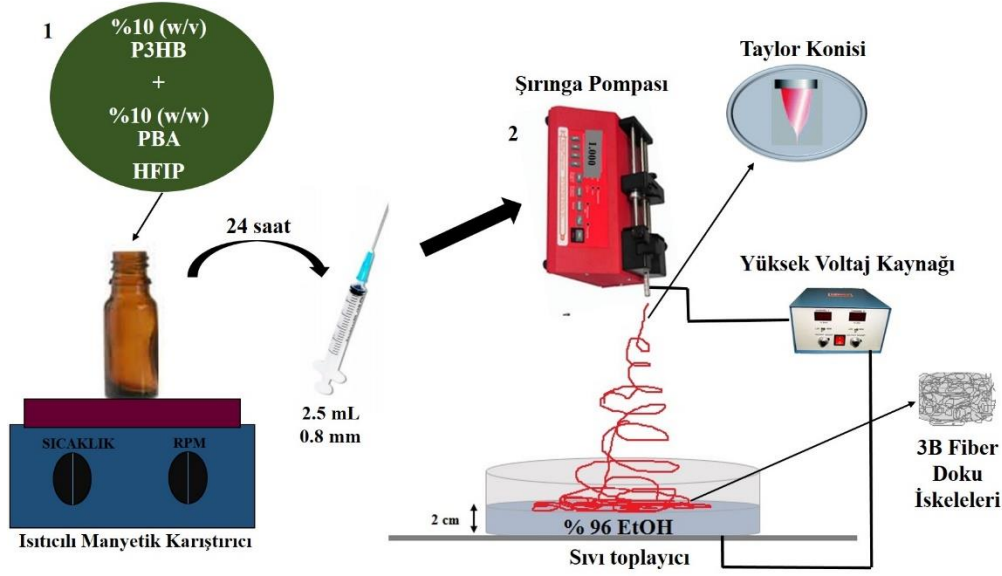
elektroegirme islemi basarisizliga ugramis ve cozucu olarak HFIP kullanilmasina karar verilmistir. Ayrica PNMPBA ve PMBA polimerlerinin dusuk molekul aghirliklari nedeniyle elektroegirme yontemine uygun olmadigi da tespit edilerek, uc boyutlu egirme islemlerine sadece P3HB cozeltisi ve PBA katkili P3HB cozeltisi ile devam edilmesine karar verilmiştir. Şekil 3.2’de geleneksel elektroegirme yontemiyle 2B fibröz doku iskelelerinin üretim aşamaları şematize edilmiştir.



Şekil 3.2. Geleneksel elektroegirme yontemiyle 2B fibröz doku iskelesi eldesi aşamaları.

### 3.2.2.2. Üç boyutlu elektroegirme

P3HB (%5 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%5 w/v), P3HB (%10 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%10 w/v) karışımları HFIP’de çözülerek, ıslak egirme aşamasına geçilmiştir. Üç boyutlu elektroegirmede geleneksel 2 boyutlu elektroegirmeden farklı olarak, fiberler sıvı banyosunda toplanmıştır. Üretim koşullarının optimizasyonu için 15, 20, 25 kV voltaj değerleri, 0.5, 1.0 ve 1.5 mL/saat akış hızı değerleri, 16.5 ve 22.5 cm şırınga-toplayıcı arasındaki uzaklık değerleri denenmiştir. Sıvı toplayıcı olarak %96’lık etanol kullanılmıştır. Etanol içerisinde toplanan fibröz doku iskeleleri etanol içerisinden uzaklaştırılarak distile su ile yıkanmış ve 2 gün kurutma etüvünde bekletilerek kuruması sağlanmıştır. Karakterizasyon ve hücre kültür çalışmalarında kullanılacak örneklerin üretimi için, fiberler sıvı toplayıcı içerisinde 25 dk süreyle toplanmıştır. Şekil 3.3’te ıslak elektroegirme yontemiyle 3B fibröz doku iskelelerinin üretim aşamaları şematize edilmiştir.



Şekil 3.3. Islak elektroğirme yöntemiyle 3B fibröz doku iskelesi eldesi aşamaları.

### 3.3. Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Dondurarak kurutma ve elektroğirme yöntemleri ile elde edilen doku iskelelerinin doku mühendisliğinde kullanıma uygunluğunun incelenmesi amacıyla çeşitli karakterizasyon işlemleri uygulanmıştır.

#### 3.3.1. Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin karakterizasyonu

Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin morfolojik özellikleri, mekanik dayanımları, bozunma davranışları, kristal yapıları ve sitotoksik etkileri belirlenmiştir.

##### 3.3.1.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Dondurarak kurutma yöntemiyle elde edilmiş doku iskelelerinin morfolojileri, SEM (Zeiss Evo 50, Almanya) analizi ile incelenmiştir. Bu amaçla, analiz öncesi örnekler, altın-paladyum karışımı ile kaplanmıştır.

##### 3.3.1.2. Mekanik dayanım testleri

Dondurarak kurutma yöntemi ile üretilen doku iskelelerinin mekanik dayanımları, Universal Testing Machine (Zwick Roell/Z250) ile ölçülmüştür. Örnekler, ölçüm öncesinde 1 saat boyunca PBS (pH:7.4, 37°C) içerisinde bekletilmiştir. Çapı 10 mm, yüksekliği 8 mm olmak üzere silindirik şekilde kesilen üç boyutlu örneklere sıkıştırma testi uygulanmıştır. Sıkıştırma testi 5 mN'luk yük ve 2 mm/dk sabit piston başlığı hızı ile gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçümler her örnek grubu için 3 kez tekrar edilmiştir.

### 3.3.1.3. Enzimatik ve hidrolitik bozunma testleri

Enzimatik bozunma testleri, P3HB (%5 w/v) doku iskeleleri ile %2 ve %10 (w/w) oranlarında PBA ile katkılanmış P3HB (%5 w/v) doku iskelelerine, %10 (w/w) oranında PNMPBA ile katkılanmış P3HB (%5 w/v) doku iskelelerine ve %10 (w/w) oranlarında PMBA ile katkılanmış P3HB (%5 w/v) doku iskelelerine uygulanmıştır. Enzim olarak lipaz kullanılmıştır. Elli mg lipaz enzimi, 100 mL PBS içerisinde çözdürülmüş ve çözeltiye mikroorganizma oluşumunu engellemek amacı ile % 0.1 (w/v) oranında sodyum azid eklenmiştir [89]. Ayrıca, doku iskeleleri enzim içermeyen PBS ortamında bekletilerek hidrolitik bozunma davranışları da incelenmiştir. Doku iskelelerinin üzerindeki bozunma ortamları haftada bir yenilenmiştir. İskelelerin kuru ağırlıkları inkübasyonun 1., 3. ve 5. haftalarında ölçülmüş ve gravimetrik olarak kütle kaybı belirlenmeye çalışılmıştır. Ancak, anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Bu nedenle bozunurluğun belirlenmesi için, test süresince malzemelerin morfolojilerindeki değişimler SEM görüntüleri ile incelenmiştir.

### 3.3.1.4. X ışını kırınımı (XRD) analizi

P3HB (%5 w/v) ve PBA/türevleri karışımlarından dondurarak kurutma yöntemi ile üretilmiş doku iskelelerinin XRD analizi, Rigaku MultiFlex 2kW X-Işını Difraktometresi ile  $\text{CuK}\alpha$  radyasyon kaynağı kullanılarak,  $6^\circ$ - $50^\circ$  tarama aralığı ( $2\theta$ ),  $3^\circ/\text{dk}$  tarama hızı koşullarında yapılmıştır. İskelelerin yüzde kristaliniteleri, OriginPro 8 SR0 yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Her XRD spektrumundaki toplam pik alanı, XRD eğrisinin integrasyonu ile hesaplanmıştır. Spektrumdaki amorf bölgeler referans hat fonksiyonları kullanılarak mutlak integrasyon sonucunda tespit edilmiştir. Kristalin alanların tespiti için, her bir spektrumdaki amorf bölgenin alanı ve toplam alan arasındaki fark alınmıştır. İskelelerin yüzde kristaliniteleri;

$$X (\%) = [(\text{kristalin piklerin alanı}) / (\text{XRD eğrisinin toplam alanı})] \times 100 \quad (3.1)$$

eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.3.1.5. Sitotoksitesite testleri

P3HB (%5 w/v) doku iskelelerinin ve % 10 (w/w) oranlarında PBA, PNMPBA ve PMBA ile katkılanmış P3HB (%5 w/v) doku iskelelerinin hücreler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla 24 saatlik sitotoksitesite testi (MEM-ekstrakt testi, MTT test sistemi) ISO 10993/EN 30993 standartlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri %70 etanol içerisinde vakum etüvünde birkaç defa çöktürülerek 1 saat boyunca bekletilmiş, etanolün yapıdan uzaklaşması için steril D-PBS ile 3 kere yıkanmış ve her iki yüzeyi de 30 dk ultraviyole (UV) ışığa tabi tutularak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon

sonrasında sitotoksosite testi L929 fare fibroblast hücrelerinin canlılığının takibi ile gerçekleştirilmiştir. Yöntem çerçevesinde, 150 g ağırlığındaki kuru iskeleler 30 mL besi ortamı içerisinde 37°C’de 24 saat boyunca ekstrakte edilmiştir [90]. Besi ortamı olarak, hacimce %10 fötal sığır serumu (FBS) içeren Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) kullanılmıştır. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonunda, ekstrakt ortamı 0.22 µm’lik filtreden geçirilerek iskele döküntüleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Eş zamanlı olarak 24 gözlü polistiren hücre kültür kaplarına hücre yoğunluğu  $6 \times 10^4$  hücre/mL olacak şekilde L929 hücreleri ekilmiştir. Malzemenin hücreler üzerindeki sitotoksitesini belirleyebilmek için, 24 saat inkübasyonun ardından kültür ortamı çeşitli dilüsyonlardaki (%25, %50, %100) ekstrakt ortamları ile değiştirilmiştir. Hücre canlılığı MTT analizi ile, hücrelerin morfolojik değişimleri ise mikroskop görüntüleri ile takip edilmiştir.

### **3.3.2. Elektroğirme yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin karakterizasyonu**

Üç boyutlu elektroğirme yöntemi ile elde edilen doku iskelelerinin morfolojik incelemesi için SEM analizi yapılmış, ayrıca su alım kapasiteleri incelenmiştir. Mekanik testler geleneksel eğirme ile elde edilmiş 2B iskeleler üzerinde yapılmış, su temas açısı analizi ise aynı polimerlerden elde edilen filmlere uygulanmıştır.

#### **3.3.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi**

Geleneksel elektroğirme ve ıslak elektroğirme yöntemiyle elde edilmiş doku iskelelerinin morfolojileri, SEM (Zeiss Evo 50, Almanya) analizi ile incelenmiştir. Bu amaçla, analiz öncesi örnekler, altın-paladyum karışımı ile kaplanmıştır. Her iki elektroğirme işlemi sonucu elde edilen iskelelerin fiber çapları ise SEM analizinden elde edilen fotoğraflar üzerinde ImageJ programı (NIH, Bethesda, MD) kullanılarak hesaplanmıştır.

#### **3.3.2.2. Mekanik dayanım testleri**

Geleneksel elektroğirme yöntemiyle üretilen %10 (w/w) PBA ile katkılanmış %10 (w/v) P3HB ve %10 (w/v) P3HB 2B fibröz doku iskeleleri üzerinde çekme testi uygulanmıştır. Eğirme parametreleri olarak 15 kV voltaj, 22.5 cm şırınga-toplayıcı uzaklığı ve 1 mL/saat akış hızı seçilmiştir. Eğirme işlemine 1.5 saat devam edilmiştir. Elektroğirme yöntemi ile üretilen 2B doku iskelelerinin mekanik dayanımları, Universal Testing Machine (Zwick Roell/Z250) ile ölçülmüştür. Ölçüm öncesinde 1 saat boyunca PBS (pH:7.4, 37°C) içerisinde bekletilen örnekler, 7 mm genişlik ve 40 mm uzunluk olacak şekilde dikdörtgen parçalara kesilmiş ve çekme testleri uygulanmıştır. Çekme analizi 0.02 N’luk yük ve 10 mm/dk sabit piston başlığı hızı ile gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçümler her örnek grubu için 3 kez tekrarlanmıştır.



### 3.3.2.3. Su alım kapasitesi ölçümü

Doku iskelelerinin su alım kapasitesi ölçümü, PBS (pH:7.4, 37°C) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri, PBS içerisine daldırılarak belirli zaman aralıklarında çıkarılmış ve ağırlıkları ölçülmüştür. Ağırlık ölçümü yapılmadan önce, iskelelerin yüzeyindeki fazla su kağıda emdirilerek uzaklaştırılmıştır. İskelelerin belirlenen zaman aralıklarındaki su alım kapasiteleri (WC), aşağıdaki eşitlikte gösterildiği şekilde hesaplanmıştır.

$$WC (\%) = [(W_t - W_i) / W_i] \times 100 \quad (3.2)$$

Eşitlikte,  $W_t$ , doku iskelesinin su içeren ağırlığını,  $W_i$  ise ilk (kuru) ağırlığını göstermektedir [91].

### 3.3.2.4. Su temas açısı (WCA) ölçümü

Katkılamanın P3HB'nin hidrofobisitesi üzerindeki etkisinin gözlenmesi, su temas açısı ölçümü ile değerlendirilmiştir. Saf P3HB ve % 10 (w/w) PBA katkılanan P3HB filmlerin su temas açısı (Kruss DSA 100, Almanya), durgun damla (sessile drop) yöntemi ile oda koşullarında ölçülmüştür.

## 3.4. Hücre Kültür Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmaları sonrasında ıslak elektroegirme yöntemiyle elde edilen 3 boyutlu fibröz doku iskelelerinin hücresel uyumluluğunun incelenmesi amacıyla MC3T3-E1 hattı ile 21 günlük hücre kültürü çalışması gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin malzeme yüzeyindeki tutunma ve yayılma davranışları SEM analizi ile morfolojik olarak incelenirken, MTT analizi ile canlılığın kantitatif incelemesi yapılmıştır.

### 3.4.1. MC3T3-E1 hücre hattı ile yapılan hücre kültür çalışmaları

MC3T3-E1 hücre hattı ile hücre kültür çalışmaları, ıslak eğirme yöntemiyle elde edilen P3HB (%10 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%10 w/v) doku iskeleleri ile yapılmıştır. Bu doku iskeleleri ile yürütülen hücre kültür çalışmalarında, hücrelerin yüzey üzerine tutunmaları ve çoğalması incelenmiştir. Flasklarda çoğaltılan hücreler için büyüme ortamı olarak %10 FBS (v/v), %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren  $\alpha$ -MEM besi ortamı kullanılmıştır. Öncelikle 24-gözlü polistiren hücre kültür kaplarının yüzeyi agaroz ile kaplanmış ve böylece TCPS yüzeyler hidrofobik hale getirilerek, hücrelerin doku iskelesinden kültür kabının yüzeyine göç etmeleri engellenmiştir. Daha sonra doku iskeleleri %70'lik etanol içerisinde vakum etüvünde çöktürülerek 1 saat boyunca bekletilmiş ve etanolü uzaklaştırmak amacıyla D-PBS çözeltisi ile 3 kere yıkanmıştır. Yıkama sonrası her

iki yüzeyi de 30 dk boyunca UV sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Doku iskeleleri, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren  $\alpha$ -MEM ortamı içerisine alınarak, serum proteinleri ile etkileşmeleri için 3 saat beklenmiş, ardından hücre ekimine geçilmiştir. Hücreler,  $2.5 \times 10^5$  hücre/mL yoğunluğunda doku iskelelerine ekilmiştir. Hücre ekimi yapıldıktan 1 saat sonra örnekler üzerine 1 mL hücre büyüme ortamı eklenmiştir. Örnekler, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 3 günde bir ortamları tazelenerek 21 gün boyunca kültüre edilmişlerdir.

#### **3.4.1.1. SEM analizi**

Hücrelerin doku iskelelerinin yüzeyine tutunmaları, yayılmaları ve çoğalmaları, SEM analizi ile morfolojik olarak incelenmiştir. SEM analizi için, örneklerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılıp 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra fiksasyon işlemi için 30 dk boyunca %2.5 (v/v) glutaraldehit çözeltisi içerisinde bekletilmiş ve analize kadar 1'er mL PBS içerisinde 4°C'de saklanmıştır. Analiz öncesi, örnekler %30, %50, %70, %90 ve %100'lük etanol serisi içerisinde 1'er dk bekletilerek susuzlaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Susuzlaştırma işleminin ardından örnekler hekzametildisilazan (HMDS) içerisinde 5 dk bekletilmiş ve bir gece boyunca çeker ocakta kurutulmuştur. İskeleler SEM analizi öncesinde altın-paladyum karışımı ile kaplanmıştır. SEM analizi, hücre kültür çalışmasının 1, 7, 14 ve 21. gününde yapılmıştır [92].

#### **3.4.1.2. MTT analizi**

Doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri ve canlılığı MTT analizi ile belirlenmiştir. Analizde MTT tuzunu içeren sarı renkli MTT çözeltisi, hücre mitokondrisinde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri tarafından mor renkli formazan kristallerine indirgenmektedir. İndirgenen formazan kristallerinin yoğunluğu, kültür ortamında bulunan hücrelerin mitokondriyal aktivitesi hakkında, yani buna bağlı olarak hücre canlılığı hakkında bilgi vermektedir. Bu bağlamda doku iskeleleri üzerindeki besi ortamı kültürün 1., 4., 7., 14. ve 21. günlerinde uzaklaştırılmış ve her bir göze 600  $\mu$ L serumsuz besi ortamı ve 60  $\mu$ L MTT çözeltisi (2.5 mg/mL PBS) eklenmiştir. Ardından 3 saat boyunca 37°C CO<sub>2</sub> etüvünde inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda doku iskeleleri üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve her bir göze 400  $\mu$ L 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözülden 200  $\mu$ L alınarak 96-gözlü kültür kaplarına aktarılmıştır. Ölçümler, 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de spektrofotometrik (Asys UVM 340, Avusturya) olarak yapılmış ve çözümlerin optik yoğunlukları belirlenmiştir [93].

### **3.4.1.3. İstatistiksel analiz**

GraphPad InStat yazılımı kullanılarak istatistiksel analizler yapılmıştır. Tüm analiz verileri üç defa tekrar edilen deneyin ortalama  $\pm$  standart sapması ile birlikte verilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlı farkları değerlendirmek için tek yönlü Anova testi ve Student's t-test kullanılmış, p değerlerinin 0.05'ten küçük olduğu durumlar anlamlı olarak alınmıştır.

## 4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında yapılan deneyler, analizler ve sonuçları bu bölümde verilmiş ve tartışılmıştır. İlk olarak poli- $\beta$ -alanin (PBA) polimerinin sentez ve karakterizasyonuna yer verilmiş, ardından P3HB ve katkı polimerlerini içeren dondurarak kurutma yöntemi ve elektroğirme yöntemiyle üretilen doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmalarının sonuçları değerlendirilmiştir. Son olarak, ıslak elektroğirme yöntemiyle elde edilen 3 boyutlu fibröz doku iskeleleri ile MC3T3-E1 pre-osteoblast hücre hattıyla gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarının sonuçları tartışılmış ve tüm sonuçlar literatür ile karşılaştırmalı olarak yorumlanmıştır.

### 4.1. P3HB ve PBA Polimerleri

Tez kapsamında yapılan çalışmaların amacı P3HB'nin biyomalzeme olarak kullanımını sınırlayan özelliklerini azaltmak ve P3HB'ye yeni olumlu özellikler kazandırmaktır. P3HB'nin tek başına kullanıldığında doku mühendisliğine uygun olmayan özellikleri, P3HB'ye çeşitli polimerler katılarak iyileştirilebilmektedir. Bu bağlamda P3HB ile polimer karışımları hazırlamak için PBA ve bazı türevleri kullanılmıştır.

P3HB; optikçe aktif, biyoyumlu ve biyobozunur bir polimerdir. Ayrıca P3HB'nin piezoelektrik ve piroelektrik özelliklerinin araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur. Tüm bu özellikleri nedeniyle biyomalzeme olarak kullanımına yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. P3HB bu çalışmaların birçoğunda ya kimyasal yollarla modifiye edilmiş ya da kopolimerleri hazırlanarak hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Bunun başlıca nedenleri arasında; yüksek kristalinite kaynaklı kırılma, polilaktitlere göre düşük biyobozunma hızı, erime noktası civarında termal kararsızlıktan kaynaklı işlenebilirlik zorluğu ve yüksek hidrofobisite gibi doku mühendisliği açısından olumsuzluklar oluşturan özellikler sayılabilmektedir.

Termal ve mekanik direnci oldukça yüksek olan ve yapısındaki amit grubu (CONH) nedeniyle protein moleküllerine benzeyen PBA, tek başına hiçbir doku mühendisliği çalışmasında kullanılmamıştır. Bu özellikleriyle PBA'nın oldukça kullanışlı bir katkı malzemesi olabileceği varsayılabilir. Yukarıda belirtilen P3HB'ye ait olumsuzlukları ortadan kaldırmak ve yeni özellikler katmak için Doç. Dr. Efkân Çatıker'in yürütücülüğünü ve Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'nun danışmanlığını yaptığı "Poli(3-hidroksibutirat)/Poli- $\beta$ -alanin ve Türevlerinin İkili Karışımları: Yeni Doku İskelesi Malzemeleri" başlıklı 114Z039 no'lu TÜBİTAK tarafından desteklenen proje kapsamında

PBA ve türevleri sentezlenerek karakterizasyonu yapılmış ve P3HB ile karışımları hazırlanmıştır [94].

#### 4.1.1. Polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu

Tez kapsamında kullanılan katkı polimerleri; poli-β-alanin (PBA), poli(N-3-metoksipropil-β-alanin) (PNMPBA) ve poli(α-metil-β-alanin) (PMBA), Doç. Dr. Efkan Çatiker tarafından, hidrojen transfer polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Sentezlenen polimerlerin yapısal karakterizasyonu FTIR ve <sup>1</sup>H-NMR analizleri ile yapılmıştır. Çizelge 4.1’de, katkı polimerleri olan PBA, PNMPBA ve PMBA’nın sentez koşulları ve çeşitli özellikleri verilmiştir.

Çizelge 4.1. PBA, PNMPBA ve PMBA’nın sentez koşulları ve özellikleri [94]

Polimer	T (°C)	Çözücü	Zaman (saat)	Başlatıcı	Verim (%)	DP
PBA	100	DMSO*	24	t-NaOBu**	85	430
PNMPBA	90	Bulk	96	t-NaOBu**	65	20
PMBA	100	DMSO*	24	t-NaOBu**	43	100

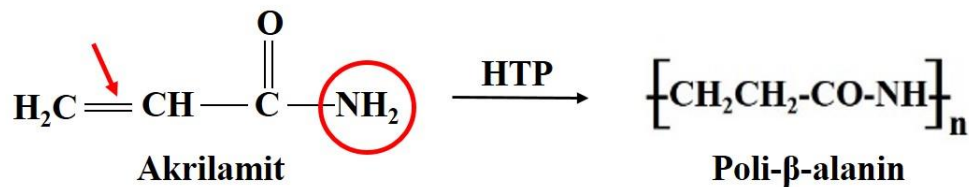
\*Dimetil sülfoksit

\*\*t-NaOBu: Sodyum t-butoksit

<sup>1</sup>H-NMR spektrumlarında uç grup analizi yapılarak polimerlerin ortalama mol kütleleri belirlenmiştir. Termal davranışları ise DSC-TG analizi ile tespit edilmiştir [94]. Aşağıda tez çalışmasında temel katkı polimeri olarak kullanılan PBA polimerinin sentez ve karakterizasyonuna ait özet bilgi sunulmuştur.

##### 4.1.1.1. Poli-β-alanin (PBA) sentezi ve karakterizasyonu

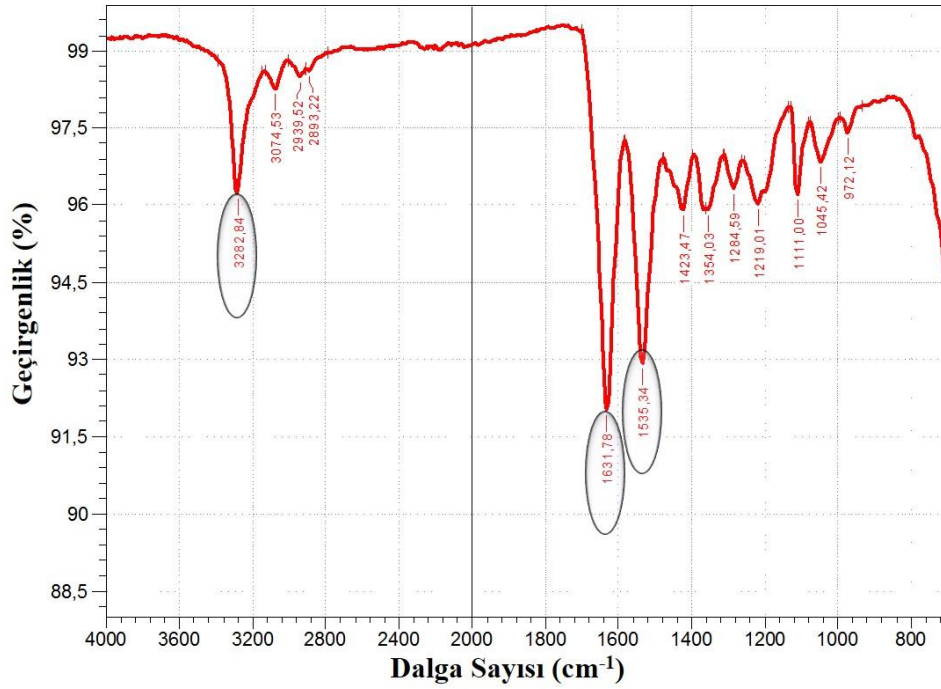
PBA sentezinde monomer olarak akrilamid kullanılmıştır. Baz katalizli hidrojen transfer polimerizasyonu ile sentezlenen PBA, %85 polimerizasyon verimiyle elde edilmiştir.



Şekil 4.1. PBA polimerinin akrilamidin hidrojen transfer polimerizasyonu ile sentezi.

### FTIR Spektroskopisi

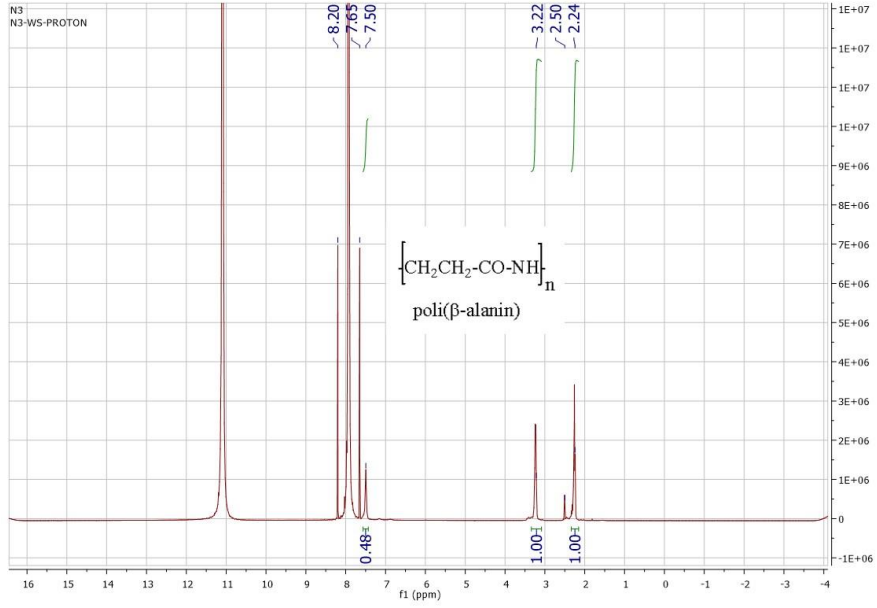
Polimerizasyondan sonra izole edilip kurutulmuş PBA polimer örneğinin FTIR analizi, ATR tekniği ile 700-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında yapılmıştır. Şekil 4.2’de verilen spektrum incelendiğinde NH gerilme bandı ( $3283 \text{ cm}^{-1}$ ), ikincil amit karbonil asimetrik gerilme bandı ( $1632 \text{ cm}^{-1}$ ) ve NH eğilme bandı ( $1535 \text{ cm}^{-1}$ ), yapının PBA’ya ait olduğunu desteklemektedir [94].



Şekil 4.2. Poli- $\beta$ -alaninin (PBA) FTIR spektrumu.

### $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopisi

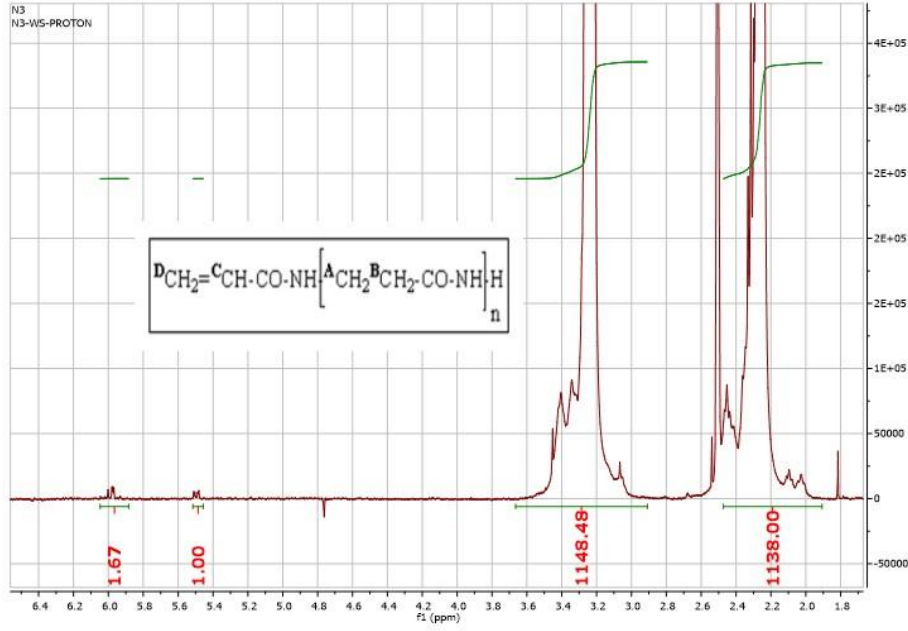
PBA polimerinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu, 10 mg PBA içeren 0.2 mL formik asit çözeltisi içerisine bir damla DMSO- $d_6$  damlatılarak Bruker AVANCE III 400 MHz NMR Spektrometresi ile elde edilmiştir. Şekil 4.3’te verilen spektrum incelendiğinde 7.65, 7.90, 8.20 ve 11.1 ppm de gözlenen formik asit pikleri ve 2.50 ppm de gözlenen DMSO piki dikkat çekmektedir. Polimere ait 2.24, 3.22 ve 7.50 ppm de 2:2:1 şiddetindeki pikler sırasıyla karbonil grubuna komşu metilen ( $\text{CO-CH}_2$ ) ve amit grubuna komşu metilen ( $\text{NH-CH}_2$ ) ve NH protonlarıdır [94].



Şekil 4.3. Poli- $\beta$ -alaninin (PBA)  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu.

#### ***Ortalama Mol Kütlesinin Belirlenmesi***

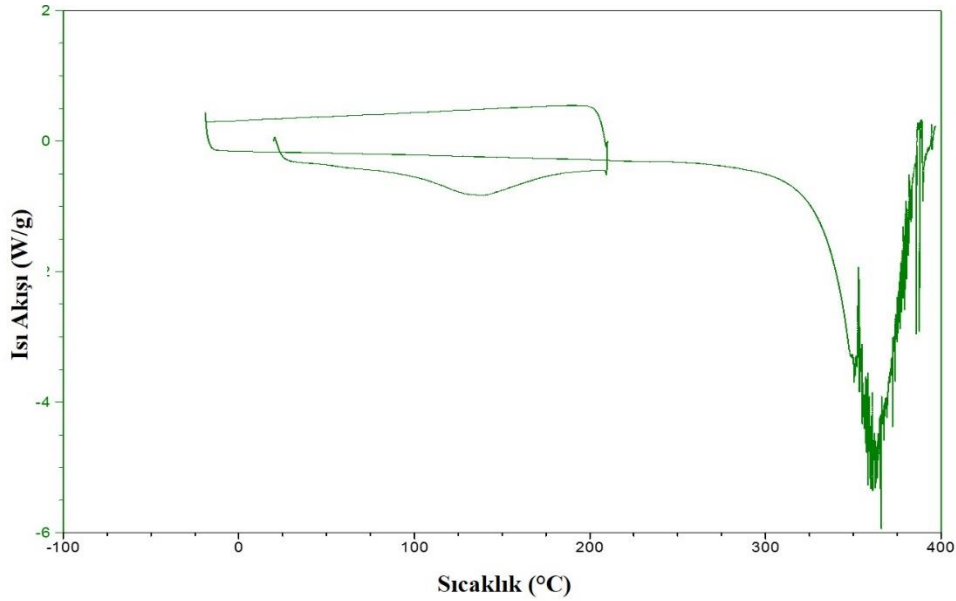
Sınırlı sayıda çözücüde (formik asit, trifloroetanol, hekzafloroizopropanol vb.) çözünen poliamit ailesine ait polimerlerin mol kütlesini belirlemek oldukça zordur. Belirtilen çözücülerin hareketli faz olarak kullanıldığı GPC sistemleri ülkemizde mevcut değildir. Bu nedenle, genişletilmiş  $^1\text{H}$ -NMR spektrumundaki uç grupta bulunan akrilamit birimine ait olefinik protonlarının (5.5 ve 6.0 ppm civarında) pik şiddetleri ile tekrarlayan birimlerde bulunan metilen protonlarının pik şiddetlerinin oranları kullanılarak mol kütlesi belirlenmiştir (Şekil 4.4). Uç grup analizi ile polimerizasyon derecesi (DP)  $\approx 1140/2 = 570$  olarak hesaplanmıştır. Akrilamitin başlangıç mol kütlesi  $M_0 = 71 \text{ gmol}^{-1}$  olmak üzere, PBA'nın sayıca ortalama mol kütlesi yaklaşık  $M_n = M_0 \times \text{DP} = 71 \times 570 = 40470 \text{ gmol}^{-1}$  olarak bulunmuştur [94].



Şekil 4.4. Poli-β-alaninin genişletilmiş <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.

#### DSC Analizi

DSC analizi için ilk tarama; azot akışı varlığında, 10°C/dk ısıtma hızı ile ve oda sıcaklığından başlayarak 200°C'a kadar olan sıcaklık arasında yapılmıştır. Yapıdaki kristal suyu uzaklaşınca (75-175°C aralığında) hızla soğutma işlemi uygulanarak ikinci tarama yapılmıştır. Erime tamamlanmadan bozunmaya başlayan polimer yaklaşık 300°C civarında erimeye başlamıştır. Bu ısıl davranış literatürdeki bilgilere uygun olarak gerçekleşmiştir [94].



Şekil 4.5. Poli-β-alaninin (PBA) DSC termogramı.



## 4.2. P3HB ve PBA/Türevleri ile Katkılanmış Doku İskelelerinin Üretimi

Bu bölümde, kemik doku mühendisliğinde kullanılabilecek yeni bir doku iskelesi eldesi için üretilen P3HB ve güçlendirici ajan katkılı P3HB doku iskelelerinin üretim koşullarının optimizasyonu, yapıların karakterizasyonu ve iskelelerle gerçekleştirilen *in vitro* hücre kültür çalışmalarının sonuçları karşılaştırmalı olarak tartışılmıştır. İlk olarak, P3HB ve güçlendirici ajan katkılı P3HB doku iskelelerinin dondurarak kurutma yöntemi ile üretimi ve üretilen doku iskelelerinin karakterizasyon sonuçları verilmiştir. Ardından elektroğirme yöntemi ile 2B ve 3B iskelelerin üretimi ve üretilen doku iskelelerinin karakterizasyon sonuçları verilmiş, 3B elektroğirme yöntemi kullanılarak elde edilen fibröz doku iskelelerinin MC3T3-E1 hücre hattı ile yapılan *in vitro* hücre kültürü çalışmalarının sonuçları incelenmiştir.

### 4.2.1. Dondurarak kurutma yöntemi

Doğal polimer içeriğine sahip doku iskelelerinde, üretim yöntemi olarak dondurarak kurutma yöntemi kullanılabilmektedir. Yöntem temel olarak polimer çözeltisinin uygun sıcaklıkta dondurulması ve ardından çözeltinin liyofilizatöre alınmasıyla, çözelti içerisinde oluşan buz kristallerinin, cihaz içerisinde düşük sıcaklıkta ve vakum altında süblimleşerek mikro gözeneklerin oluşmasına dayanmaktadır. Polimer çözeltisinin derişimi ve dondurma sıcaklığı doğrudan gözenekliliği ve gözenek boyutunun dağılımını etkilemektedir. Dondurarak kurutma yönteminde gözenekliliğin gözenek yapıcı ajan ve diğer parametrelerle kontrol edilebilmesi, doku iskelelerinin istenilen mekanik özelliklere, yüzey topografisine ve kararlılığa getirilebilmesine olanak sağlamaktadır.

Bu yöntemde kullanılacak polimer çözeltisinin hazırlanması aşamasında öncelikle; kütlece %5, %7.5 ve %10 P3HB içeren polimer çözeltileri 65°C sıcaklıkta ısıtıcı manyetik karıştırıcı kullanılarak hazırlanmıştır. Polimer çözeltisi 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Homojen bir çözelti elde edildikten sonra yapıya gözenek yapıcı ajan olarak polimer çözeltisiyle aynı oranda asetik asit eklenerek emülsiyon oluşturulmuştur. Emülsiyon cam kültür kaplarına dökülerek kademeli olarak önce 12 saat -20°C'de ve ardından 24 saat boyunca -80°C'de dondurulmuştur. İskeleler liyofilizatöre koyularak 96 saat boyunca kurutulmuş ve kurutma işleminden sonra analizlerin yapılacağı tarihe kadar desikatörde saklanmıştır. Bu denemenin sonucunda liyofilizatörden alınan örneklerin iskele yapısına benzer morfoloji göstermediği saptanmış ve polimer çözeltisinin karıştırma süresi ve sıcaklığı gibi parametreler değiştirilerek deneyler tekrarlanmıştır.

Kullanılan polimerin yüksek molekül ağırlığı ( $\approx 300$  kDa) göz önünde bulundurularak kloroform içerisindeki çözünürlüğünün daha uzun sürede gerçekleşeceği öngörülmüştür. Ayrıca üretici firmadan alınan bilgiler ışığında %10 P3HB içeren polimer çözeltisinin jelleşme eğilimi gösterdiği ve doku iskelesi yapımına uygun olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle, kütlece %5 ve %7.5 P3HB içeren polimer çözeltileri ilk denemeden farklı olarak  $80^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat boyunca ısıtıcılı manyetik karıştırıcı yardımıyla hazırlanmıştır. Polimer çözeltisi homojen hale geldiğinde hacimce aynı oranda asetik asit eklenmiş ve aynı sıcaklıkta manyetik karıştırıcı ile 10 dk karıştırma işlemi sonucunda emülsiyon elde edilmiştir. Cam kültür kaplarına konulan emülsiyon  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletilerek liyofilizatöre alınmış ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de 96 saat boyunca kurutma yöntemi tekrarlanmıştır. Sonuç olarak 3 boyutlu, gözenekli saf P3HB ve katkılama polimerleri içeren P3HB doku iskeleleri elde edilmiştir.

#### **4.2.2. Elektroegirme yöntemi**

Elektroegirme yöntemi, hücre dışı matriste bulunan fibrillerin taklidi için oldukça kullanışlı bir doku iskelesi üretim tekniğidir. Buna ek olarak P3HB'nin fiziksel ve kimyasal yapısına daha uygun bir üretim tekniği olacağı düşünüldüğünden ikinci üretim yöntemi olarak elektroegirme seçilmiştir. Dondurarak kurutma yöntemindeki başarısızlıklarla elektroegirme yönteminde karşılaşılmanın aksine üretim yönteminin malzemenin manipüle edilebilirliğini arttırdığı gözlemlenmiştir. Geleneksel elektroegirme ve ıslak elektroegirme yöntemleri ile doku iskeleleri üretilerek karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

##### **4.2.2.1. Geleneksel elektroegirme**

Elektroegirme yöntemi ile fibröz matrislerin elde edilmesinde en önemli nokta çözeltinin viskozitesinin egirme işlemine uygun olmasıdır. Düşük viskozite boncuk oluşumuna, kesikli fiber elde edilmesine ve heterojen morfolojiye sahip fiberlere neden olmaktadır [95]. Katkı ajanı olarak kullanılan PNMPBA ve PMBA'nın molekül ağırlıkları, P3HB ve PBA'ya göre daha düşüktür. Bu katkı ajanları ile hazırlanan çözeltilerin viskozitesi yetersiz olduğundan şırıngadan akış hızı ayarlanamamış ve kaliteli fiberler elde edilememiştir. Ayrıca çözücüsü formik asit olan çözeltilerin viskozitesi yeterli olmadığından, çözücü olarak HFIP kullanılmasına karar verilmiştir. HFIP kullanılarak elde edilen doku iskeleleri için, 15 kV voltaj, 22.5 cm şırınga-toplayıcı uzaklığı ve 1.0 mL/sa akış hızı koşulları optimum koşullar olarak belirlenmiştir.

##### **4.2.2.2. Üç boyutlu elektroegirme**

Üç boyutlu egirme için çözücü olarak HFIP kullanılmış ve fiber eldesi için gerekli viskozite ayarlanmaya çalışılmıştır. P3HB (%5 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%5 w/v)

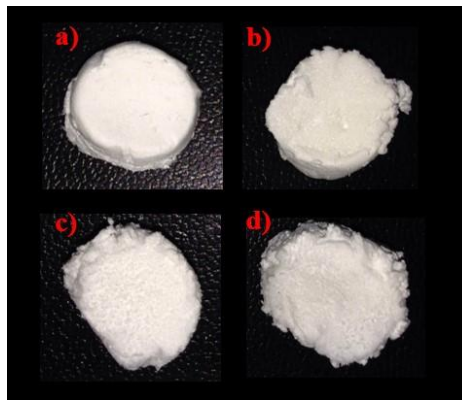
karışımlarının 3 boyutlu eğirme için viskozitesinin yeterli olmadığı görülmüş, bu nedenle üretimde yalnızca P3HB (%10 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%10 w/v) karışımlarının kullanılmasına karar verilmiştir. Üretim koşullarının optimizasyonu için denenen değerler arasından 15 kV voltaj, 1 mL/sa akış hızı ve 16.5 cm şırınga-toplayıcı uzaklığı koşullarının seçilmesine karar verilmiştir.

### 4.3. Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Dondurarak kurutma ve elektroğirme yöntemleri ile elde edilen doku iskelelerinin doku mühendisliğine uygunluğunun incelenmesi amacıyla çeşitli karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

#### 4.3.1. Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin karakterizasyonu

Dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanmış doku iskelelerinin karakterizasyonu aşamasında, morfolojinin belirlenmesi amacıyla SEM analizi, mekanik özelliklerin tespiti için basma mekanik testi, *in vitro* koşullarda bozunma davranışlarının incelenmesi amacıyla enzimatik ve hidrolitik bozunma testleri, yapılan katkılama ların P3HB'nin kristalinitesi üzerine etkilerinin araştırılması için XRD analizi ve son olarak daha önce hiçbir doku mühendisliği çalışmasında P3HB ile birlikte kullanılmamış olan katkılama grubu polimerlerinin sitotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla indirekt sitotoksisite testi uygulanmıştır. Şekil 4.6'da dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanmış en yüksek oranda katkı polimeri içeren (%10 w/w) doku iskelelerinin analizler öncesindeki fotoğrafları verilmiştir.

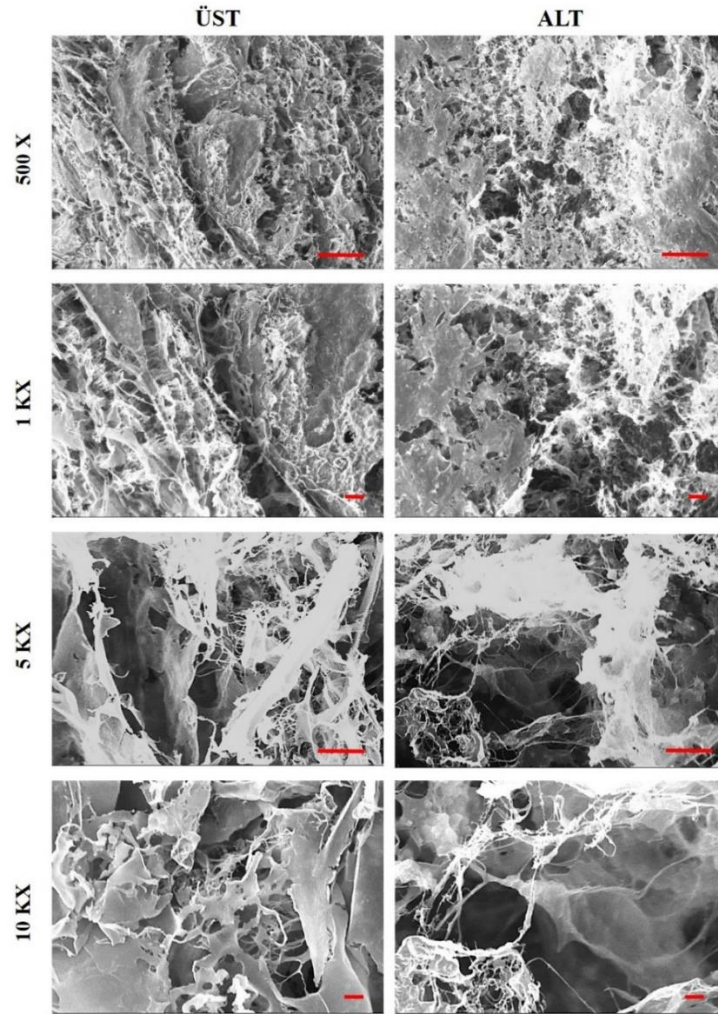


Şekil 4.6. Dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanmış doku iskeleleri a) %5 (w/v) P3HB, b) %5 (w/v) P3HB-% 10 (w/w) PBA, c) %5 (w/v) P3HB-% 10 (w/w) PNMPBA, d) %5 (w/v) P3HB-% 10 (w/w) PMBA.

Liyofilizatör içerisindeki yüksek vakum ortamı, iskelelerin parçalanmasına ve dağılmasına neden olmuştur. Şekil 4.6’da fotoğrafları verilen iskelelerden P3HB ve PBA katkılı P3HB içeren iskeleler haricindeki düşük molekül ağırlığına sahip polimerlerle katkılama yapılmış P3HB gruplarının yapısal olarak bütünlük sağlayamadığı, belirli şekle sokulamadığı görülmektedir.

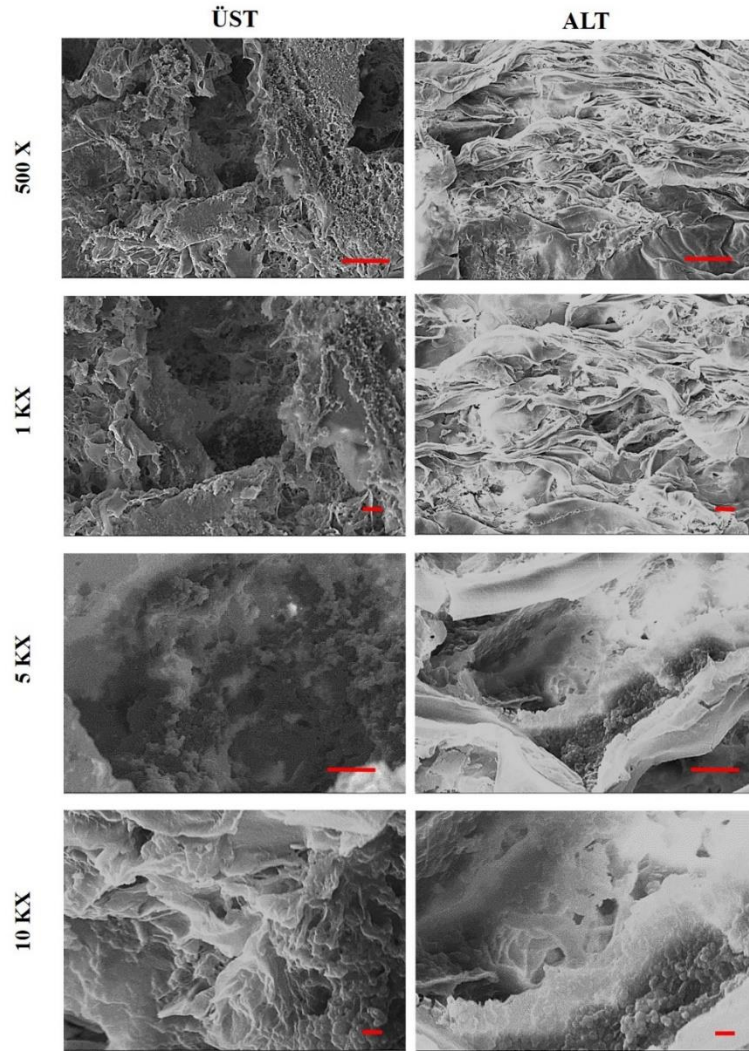
#### 4.3.1.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Dondurarak kurutma yöntemiyle üretilmiş iskelelerin PBS ve distile su içerisindeki hidrolitik bozunma davranışları 7 gün boyunca 37°C’de bekletilerek gözlemlenmiştir. Bu süreçte iskelelerin bozunmadığı saptanmış ve hücre kültüründe doku iskelesi olarak kullanıma olanak sağladığı belirlenmiştir. Bu denemenin sonucunda liyofilizatörden alınan örneklerin gözenekliliğinin ve gözenek morfolojisinin belirlenmesi için SEM analizi yapılmıştır.



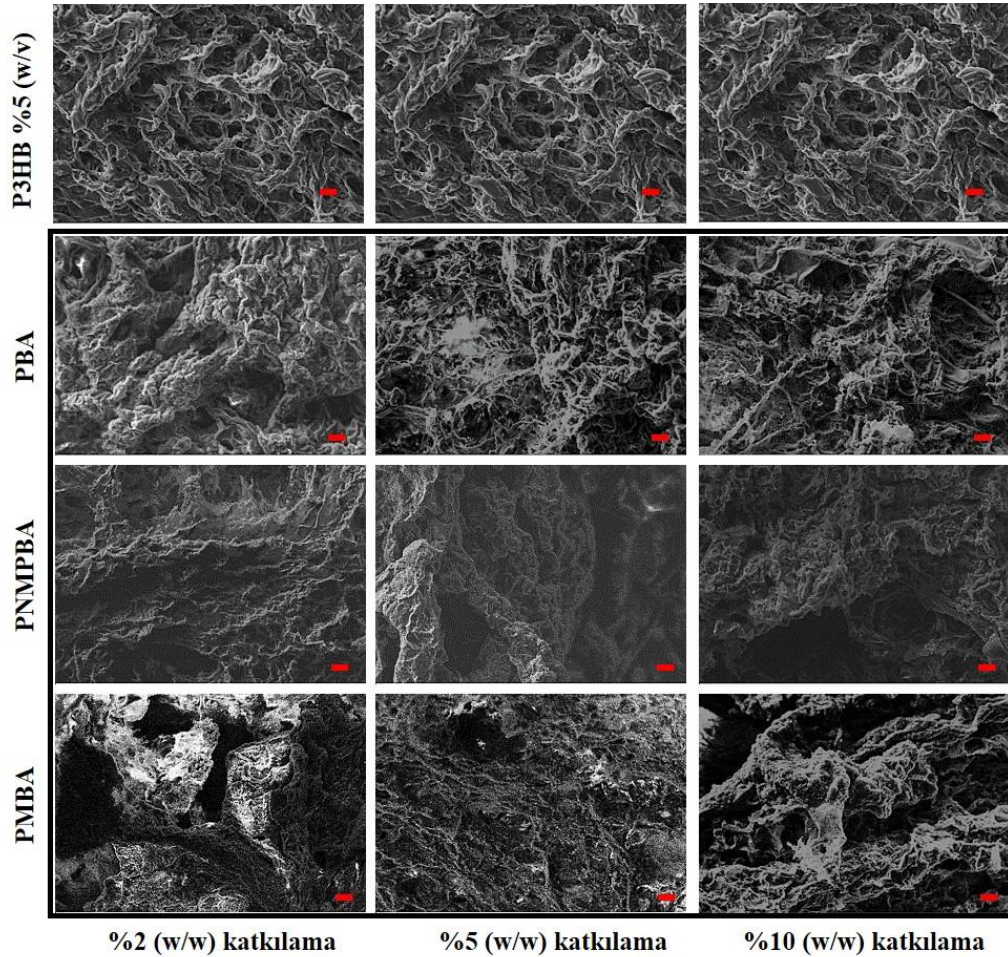
Şekil 4.7. P3HB'nin %5'lik çözeltisiyle hazırlanan doku iskelelerinin üst ve alt yüzleri (farklı büyütme için kırmızı ölçek çubukları sırasıyla 100 µm, 20 µm, 10 µm ve 2 µm'yi temsil etmektedir).

Şekil 4.7’de verilen SEM görüntüleri %5 P3HB içeren polimer çözeltisiyle hazırlanmış doku iskelelerine ait olup, sol tarafta yer alan fotoğraflar kurutma işlemi sırasında iskelenin hava ile temas eden üst yüzeyine; sağ tarafta yer alan fotoğraflar kurutma işlemi sırasında iskelenin cam kültür kabı ile temas eden alt yüzeyine aittir. Gözenek yapıcı ajanın süblimleşmesi sonrası arkasında bıraktığı gözeneklerin birbirleri ile bağlantılı ve büyüklük açısından homojen olması beklenmektedir. Üst yüzeyden alınan görüntülerden anlaşılacağı üzere %5 (w/v) P3HB içeren çözelti ile hazırlanan doku iskelelerinde içsel bağlantılı gözenekler mevcuttur. İçsel bağlantı ve gözeneklilik açısından üst yüzey ve alt yüzey görüntüleri arasında belirgin bir fark görülmemekle birlikte, alt yüzey görüntüleri de içsel bağlantılı gözeneklerin varlığını desteklemektedir. Fakat gözenek boyutu açısından homojen bir dağılım sağlanamadığı açıktır.



Şekil 4.8. P3HB'nin %7.5'lük çözeltisiyle hazırlanan doku iskelelerinin üst ve alt yüzleri (farklı büyütme için kırmızı ölçek çubukları sırasıyla 100 µm, 20 µm, 10 µm ve 2 µm'yi temsil etmektedir).

Şekil 4.8’de verilen SEM görüntüleri %7.5 P3HB içeren polimer çözeltisiyle hazırlanmış doku iskelelerine ait olup, sol tarafta yer alan fotoğraflar kurutma işlemi sırasında iskelenin hava ile temas eden üst yüzeyine; sağ tarafta yer alan fotoğraflar kurutma işlemi sırasında iskelenin cam kültür kabı ile temas eden alt yüzeyine aittir. P3HB’nin %5’lik çözeltisi kullanılarak hazırlanan iskelelere ait SEM görüntüleri ile karşılaştırıldığında %7.5 P3HB içeren iskeleler her ne kadar oldukça pürüzlü bir yüzey yapısına sahip olsa da, katkılama oranının artışıyla beraber daha sıkı ve yoğun bir yapıya sahip olduğu, gözeneklerin bu yapısal değişim nedeniyle sayıca daha az ve kapalı olduğu gözlemlenmiştir. SEM görüntülerinden elde edilen sonuçlar ve üretici firma ile yapılan görüşmeler sonucu kütlece %5 polimer içeren P3HB çözeltisinin doku iskelesi yapımında kullanılmasına karar verilmiş ve önceki yöntemden farklı olarak homojen sıcaklık değişimi elde edilebilmesi için örnekler karıştırıcıya su banyosu içerisinde konulmuştur.



Şekil 4.9. Kütlece %2, %5 ve %10 PBA ve türevlerini içeren P3HB (%5 w/v) iskelelerin, %5 P3HB (w/v) içeren iskeleler ile karşılaştırıldığı SEM fotoğrafları (Kırmızı ölçek çubuğu 20 µm’yi temsil etmektedir).

Saf P3HB içeren doku iskelesi üretim koşullarının optimizasyonu sağlandıktan sonra, güçlendirici ajanlarla katkılama basamağına geçilmiştir. Şekil 4.9’da farklı oranlarda PBA ve türevleri ile katkılanarak elde edilen %5 P3HB iskelelerin, sadece %5 P3HB (w/v) (Şekil 4.9 üst sıra) içeren iskeleler ile karşılaştırmalı olarak verilen SEM fotoğrafları yer almaktadır.

Şekil 4.9 incelendiğinde PBA ve türevleriyle katkılanmış iskelelerde katkılama oranı arttıkça gözenekliliğin azaldığı görülmektedir. Ancak tüm katkılama grupları, %5 (w/v) P3HB içeren iskelelere göre daha pürüzlüdür. Fakat belirgin gözeneklilik artışı sadece PBA ile katkılanmış gruplarda görülmektedir. Katkılama grupları içerisinde %2 PBA içeren iskelelerin morfolojik olarak doku mühendisliğinde kullanımı açısından daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

#### **4.3.1.2. Mekanik dayanım testleri**

Doku iskeleleri, *in vivo* ya da klinik çalışmalarda implantasyon sonrası çeşitli kuvvetlere maruz kalırlar. Bu nedenle mekanik açıdan maruz kaldıkları kuvvetlere karşı dayanıklı olmaları gerekmektedir. Aynı zamanda manipülasyonun kolaylaştırılması için optimum dayanım değerlerinin de belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle doku iskelesi üretimi sırasında malzemelerin mekanik özelliklerinin incelenmesi oldukça önemlidir [96]. Dondurarak kurutma yöntemiyle elde edilen doku iskeleleri sünger benzeri yapılar olduğundan bu iskelelere sıkıştırma testi uygulanmıştır. Sıkıştırma dirençleri ile modül değerleri, test sonucu elde edilen gerilim-gerinim (stress-strain) eğrisinden hesaplanmış ve Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelgede görüldüğü gibi, 2 grup (P3HB ve %2 PBA katkılı P3HB) doku iskelesi dışındaki grupların mekanik test sonucunda sıkıştırma direnci ve elastik modülü değerleri elde edilememiştir. Bunun en önemli nedeni olarak dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen iskelelerin morfolojik olarak standarda uygun şekle getirilemeyişi gösterilebilir. Dondurarak kurutma işlemi boyunca cihaz tarafından uygulanan vakum da göz önünde bulundurulduğunda, piezoelektrik özellikler baskın hale gelmiş ve iskelelerin manipülasyonu neredeyse imkansızlaşmıştır. Şekil bütünlüğünü koruyamayan iskelelerin sıkıştırma testi yapılamamış ve olumlu sonuç alınamamıştır. Fakat ölçüm alınabilen örnek grupları arasında %2 PBA katkılı P3HB’nin sıkıştırma direncinin ( $5.66 \pm 1.04$  kPa) ve elastik modülünün ( $12.06 \pm 3.20$  kPa) P3HB’nin sıkıştırma direncine ( $14 \pm 0.00$  kPa) ve elastik modülüne ( $27.4 \pm 0.00$  kPa) oranla düşük olduğu görülmektedir. Yüzde 2 PBA katkılı P3HB doku iskeleleri, P3HB doku iskelelerinden daha fazla gözeneğe sahiptir. Bir doku iskelesinin

gözenekliliği arttıkça, mekanik dayanımı azalmaktadır. Buna ek olarak katkılama malzemesi PBA'nın molekül ağırlığı (40 kDa) P3HB'nin molekül ağırlığından (300 kDa) daha düşüktür. Bu nedenle bu tip bir katkılamanın mekanik direnci düşürmesi beklenen bir durumdur. Ayrıca çoğu polimerik malzemede olduğu gibi çalışmada üretilen polimerik doku iskeleleri de baskı altında ince bir disk haline gelmesine rağmen, şekilsel olarak tam anlamıyla bozulmamıştır. Bu nedenle basma testi çıktılarının birbirleriyle karşılaştırılması her zaman doğru sonuç vermeyebilir. Özellikle boşluk kesri çok fazla olan gözenekli doku iskeleleri gibi örneklerde bu durumla sıkça karşılaşmaktadır [97].

Çizelge 4.2. Dondurarak kurutma yöntemi ile üretilen doku iskelelerinin mekanik test sonuçları

Doku İskelesi	Sıkıştırma Direnci (kPa)	Elastik Modülü (kPa)
P3HB*	14.00±0.00	27.40±0.00
P3HB - %2 PBA	5.66±1.04	12.06±3.20
P3HB - %5 PBA	ÖA**	ÖA
P3HB - %10 PBA	ÖA	ÖA
P3HB - %2 PNMPBA	ÖA	ÖA
P3HB - %5 PNMPBA	ÖA	ÖA
P3HB - %10 PNMPBA	ÖA	ÖA
P3HB - %2 PMBA	ÖA	ÖA
P3HB - %5 PMBA	ÖA	ÖA
P3HB - %10 PMBA	ÖA	ÖA

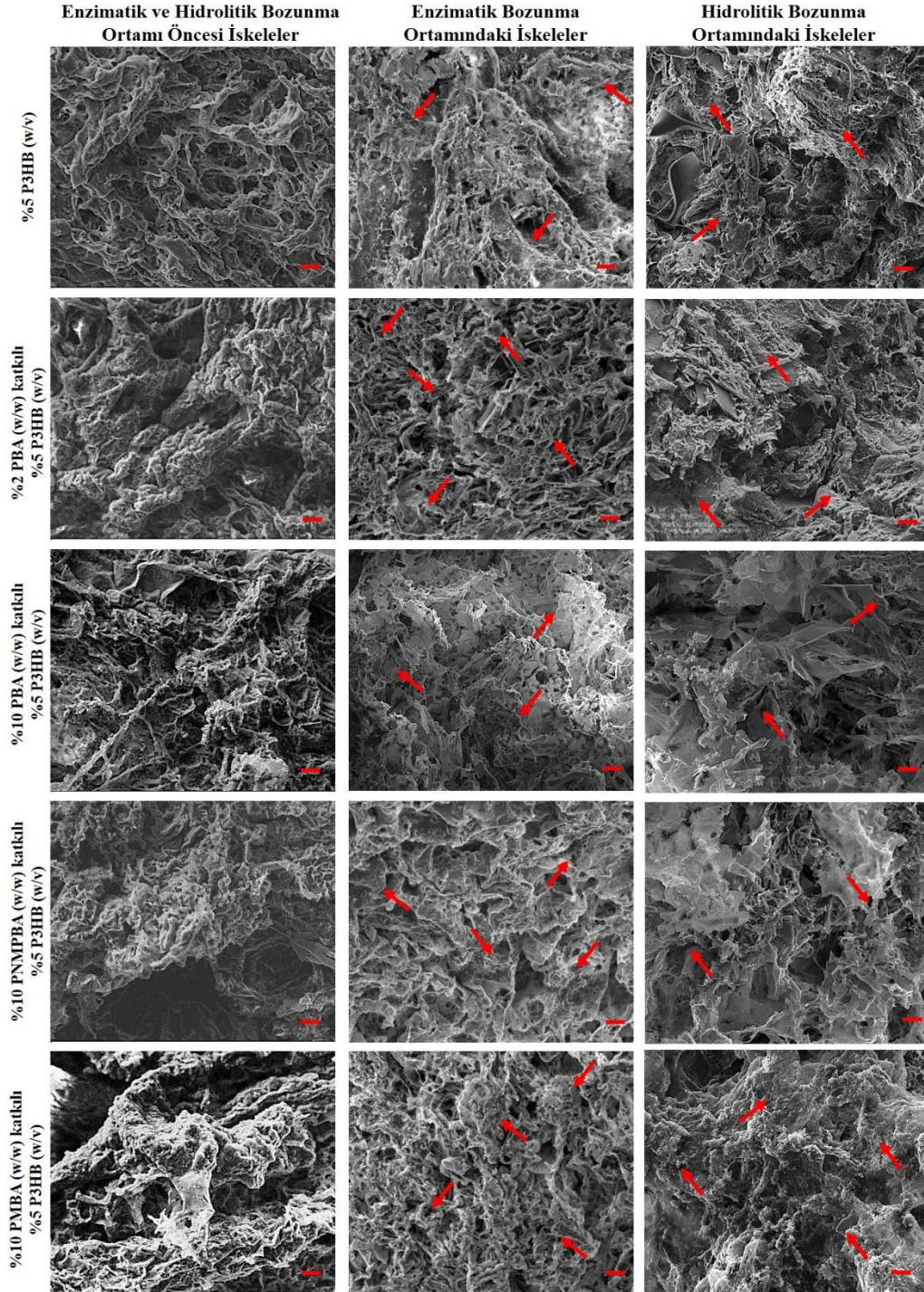
\*: Tüm P3HB'ler çözelti içerisinde kütlece %5 (w/v) oranında olup, katkı polimerleri P3HB çözelti içerisinde 100 birim kabul edilerek P3HB'ye oranla kütlece (w/w) katılanmıştır.

\*\*ÖA: Ölçüm alınmadı.



#### 4.3.1.3. Enzimatik ve hidrolitik bozunma testleri

Ölçümler ve analizler bozunma testlerinin 1., 3. ve 5. haftasında gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.10'da bozunurluğunun 5. haftasındaki doku iskelelerinin SEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.10. Kütlece %2 PBA ve %10 PBA türevleri ile katkılanmış P3HB (%5 w/v) doku iskelelerinin 5 haftalık hidrolitik ve enzimatik bozunma analizi sonundaki SEM fotoğrafları (Kırmızı ölçek çubuğu 20  $\mu\text{m}$ 'yi temsil etmektedir).

P3HB ve türevleri poliester ailesine dahil olup, yüzey erozyonu ile bozunmaktadırlar. Bu tip polimerlerde enzimler polimer matrisine difüze olamadığından, bozunma ancak yüzeyde gerçekleşebilmektedir [14]. SEM fotoğrafları incelendiğinde bozunmanın yüzeyde gerçekleştiği görülmektedir. Bunun yanında P3HB oldukça kristalin bir yapıdadır ve molekül ağırlığı yüksektir. Chen ve ark.'nın 2013 yılında yaptığı çalışmada, P3HB'nin 6 aylık implantasyon sonucunda içerdiği katkılama oranlarına göre (hidroksivalerat, HV ve hidroksiheksanoat, HHx katkılamaları) %15 ile % 43 oranında bozunduğu rapor edilmiştir [23]. Bu nedenle yapılan *in vitro* bozunma çalışmalarında kantitatif sonuçlar elde edilememiş, bozunma görsel olarak incelenmiştir. PBA ve türevleri ile katkılanan P3HB'nin kristalinitesindeki azalmaya bağlı olarak bozunma hızının artacağı teorik olarak söylenebilmektedir.

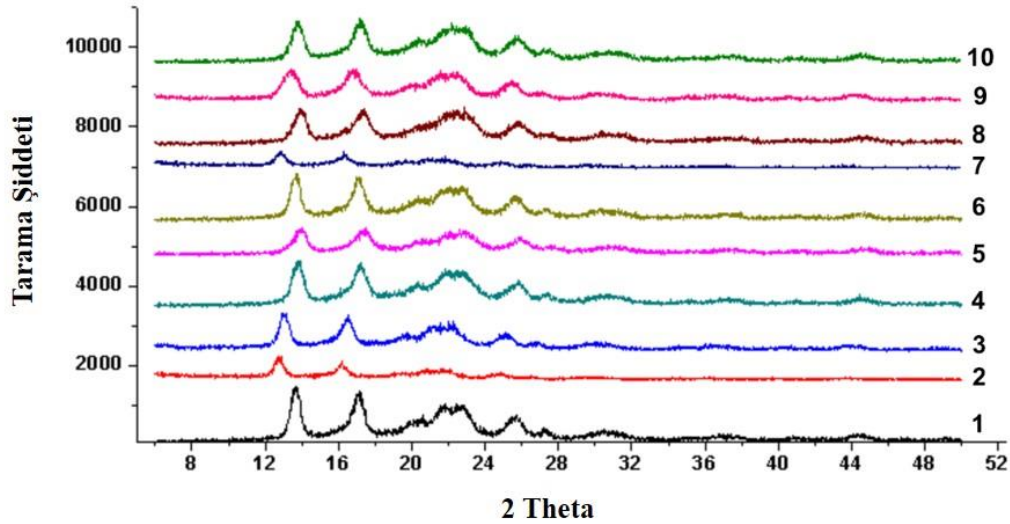
Ancak fotoğraflarda görüldüğü gibi, yüksek katkılama oranına sahip iskelelerde gözenek boyutu görece daha küçük ve gözeneklilik daha azdır. Özellikle %10 PNMPBA (w/w) katkılı %5 P3HB (w/v) ve %10 PMBA (w/w) katkılı %5 P3HB (w/v) iskelelerde bozunmaya bağlı sınırlı bir deformasyonun olduğu görülmektedir. Bunun yanında, 5. hafta sonunda %2 PBA (w/w) katkılı %5 P3HB (w/v) ve %10 PBA (w/w) katkılı %5 P3HB (w/v) iskelelerin daha fazla bozunmaya uğradığı açıkça gözlenebilmektedir. Bunun en önemli nedeni olarak PBA'nın protein absorplayıcı özellikleri gösterilebilir [72]. Lipaz enzimini absorplayan PBA, bozunma miktarını ve hızını arttırmış olabilir. Ayrıca, gözenekliliğin yoğun olduğu iskelelerin yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip olması daha hızlı bozunmasını sağlamıştır.

Doku iskeleleri, enzimatik bozunmanın yanı sıra, enzim içermeyen PBS ortamında da bekletilerek hidrolitik bozunmaları incelenmiştir. Üretilen doku iskelelerinin yüzeyinin, lipaz içermeyen PBS ortamında da yüzey erozyonuna uğraması, hidrolitik bozunmaya uğradığını göstermektedir (Şekil 4.10). Ancak bozunma ortamında, bozunmayı katalizleyen herhangi bir enzimin bulunmaması, bozunma hızını düşürmüş ve görsel olarak belirginliğini azaltmıştır.

Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmış ve belirli oranlarda PBA ve türevleri ile katkılanmış P3HB'nin *in vitro* testlerinin verdiği sonuçlardan yola çıkılarak, bu malzemelerin *in vivo* ortamda da bozunmaya uğrayacağı öngörülebilmektedir.

#### 4.3.1.4. X ışını kırınımı (XRD) analizi

Dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen saf P3HB ve katkılama yapılmış P3HB iskelelerinin XRD spektrumları karşılaştırma amaçlı olarak kaydedilerek katkı ajanlarının P3HB kristal örgüsüne etkisi incelenmiştir. Şekil 4.11’de P3HB ve PBA/türevleriyle farklı oranlarda katkılanmış doku iskelelerinin XRD spektrumu verilmiştir. P3HB kristallenme eğilimi çok yüksek bir termoplastik olduğundan düşük orandaki katkılama ajanlarının kristal yapıyı bir miktar bozduğu görülse de spektrumda hala kristalin yapıyı gösteren pikler gözlenmektedir. Ancak her üç katkı ajanının P3HB kristal örgüsüne girerek kristallenme eğilimini azalttığı pik şiddetlerindeki azalmadan açıkça görülmektedir.



Şekil 4.11. Dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen saf P3HB ve katkılama yapılmış P3HB iskelelerin XRD Spektrumları, 1) %5 (w/v) P3HB, 2) %5 (w/v) P3HB-%2 (w/w) PBA, 3) %5 (w/v) P3HB-%5 (w/w) PBA, 4) %5 (w/v) P3HB-%10 (w/w) PBA, 5) %5 (w/v) P3HB-%2 (w/v) PMBA, 6) %5 (w/v) P3HB-%5 (w/v) PMBA, 7) %5 (w/v) P3HB-%10 (w/v) PMBA, 8) %5 (w/v) P3HB-%2 (w/v) PNMPBA, 9) %5 (w/v) P3HB-%5 (w/v) PNMPBA 10) %5 (w/v) P3HB-%10 (w/v) PNMPBA.

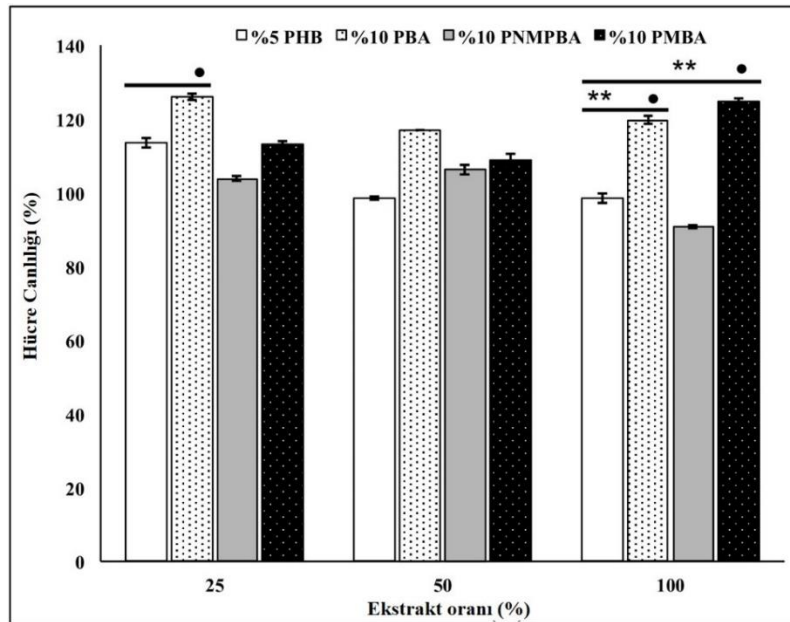
Ayrıca pik alanlarından yapılan hesaplamalarla amorf ve kristalin bölgelerin oranı da tespit edilmiştir. Çizelge 4.3’te katkılamaya bağlı olarak değişen yüzde kristalinite oranları verilmiştir. Her üç grupta da saf P3HB’ye oranla kristalinite de belirgin bir düşüş görülmektedir. Bu davranış P3HB zincirleri arasına katkı maddesinin girmesi sonucu, kristalinitenin azalması olarak yorumlanabilir.

Çizelge 4.3. P3HB ve PBA/türevleri ile katkılanmış P3HB doku iskelelerinin katkılamaya bağlı olarak değişen kristalinitesi (%)

Doku İskeleleri	P3HB	PBA	PNMPBA	PMBA	Katkılama Oranı (%)
		48.84	42.50	46.84	2
Kristalinite (%)	52.70	46.46	46.01	46.61	5
		36.91	41.21	46.27	10

#### 4.3.1.5. Sitotoksosite testleri

Çeşitli dilüsyonlardaki ekstraktlarla (%25, %50, %100) etkileştirilen L929 hücrelerinin çoğalması MTT testi aracılığıyla 1 gün boyunca belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak üzerine ekstrakt eklenmemiş hücre grubu seçilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri, hücre çoğalmasının ve canlılığının bir ölçüsüdür. Üzerine farklı dilüsyonlarda ekstrakt eklenen hücre grupları, üzerine ekstrakt eklenmemiş hücre grubunun %100 canlılık gösterdiği kabul edilerek absorbans değerleri üzerinden oranlanmış ve Şekil 4.12’de yüzde canlılık olarak verilmiştir.



Şekil 4.12. L929 hücrelerinin indirekt sitotoksosite testi sonucundaki canlılıkları. (İstatistiksel anlamlı farklılıklar • $p < 0.05$  aynı ekstrakt dilüsyonları için P3HB’nin kontrol grubu olduğu durum ve \*\* $p < 0.01$  %100 ekstrakt dilüsyonundaki P3HB kontrol grubu olduğu durum).

ISO 10993-5/ EN 30993 standardına göre indirekt testlerde bir malzemenin sitotoksik etkisinin olduğunun göstergesi %70'in altındaki canlılık olarak belirtilmiştir. Ayrıca ekstraksiyon dilüsyonları azaldıkça, hücre sel canlılık da azalıyor sa, bu durum materyalin hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterir. MTT analizinin sonuçları, saf P3HB ve PBA/türevleri ile katkılanmış P3HB'nin, katkılama oranı %10'a çıkarıldığında bile hücreler için sitotoksik etki yaratmadığını göstermektedir. PBA ve türevleri protein benzeri yapılar olduğu için proliferasyonun uyarılması beklenen bir sonuçtur. Buna bağlı olarak, hemen hemen tüm dilüsyonlar ve gruplarda, ekstraksiyon ortamının bulunmadığı ortama kıyasla % 100'den fazla canlılık gözlenmiştir.

Sitotoksisite testinden elde edilen sonuçlarda istatistiksel farklılıkların belirlenmesi amacıyla t-testi uygulanmıştır. Test sonucunda %25 PBA, %100 PBA ve %100 PMBA ekstraktlarını içeren kültür ortamındaki canlılığın ( $p < 0.05$ ), aynı dilüsyonlardaki P3HB ile karşılaştırdığında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu görülmüştür. PBA ve PMBA grupları için kontrol grubu %100 P3HB ekstrakt ortamı olduğunda istatistiksel olarak ( $p < 0.01$ ) anlamlı farklar elde edilmiştir.

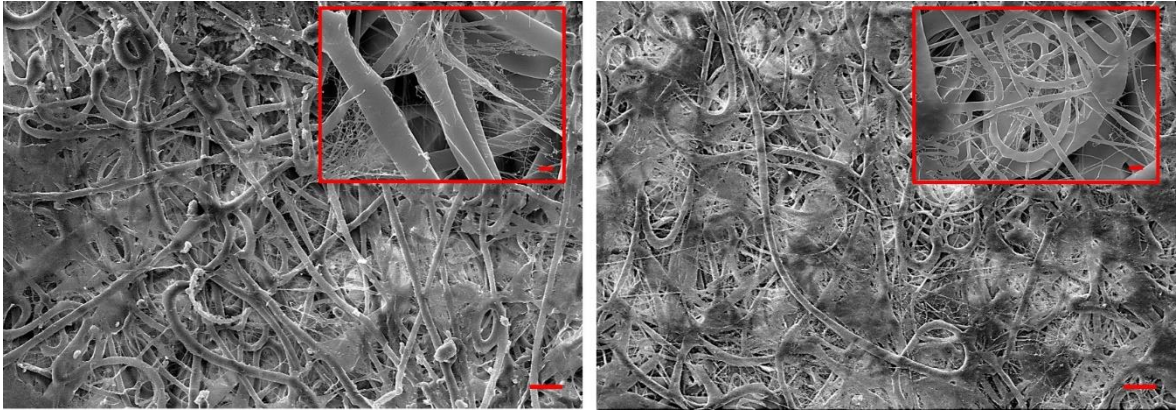
#### **4.3.2. Elektroğirme yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin karakterizasyonu**

Geleneksel elektroğirme (2B) ve ıslak elektroğirme (3B) yöntemiyle elde edilen doku iskeleleri, karakterizasyon türü ve standardına bağlı olarak karakterizasyonun farklı aşamalarında kullanılmıştır. Bu bağlamda, mekanik testler 2 boyutlu iskeleler üzerinde yapılırken; su alım kapasitesi ölçümü 3 boyutlu iskeleler üzerinde yapılmıştır. İki ve 3 boyutlu doku iskelelerinin morfolojisinin incelenmesi amacıyla SEM analizi yapılmış, fiber çapları İmageJ programı ile belirlenmiştir. Su temas açısı analizleri ise fiber üretimindeki katkılama oranıyla aynı olacak şekilde üretilen filmlerde gerçekleştirilmiştir. Tüm karakterizasyon aşamaları tamamlandıktan sonra 3 boyutlu fibröz doku iskeleleri ile 21 günlük hücre kültürü çalışmaları yürütülmüş, hücre canlılığı ve morfolojisinin takibi için sırasıyla MTT analizi ve SEM analizi yapılmıştır.

##### **4.3.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi**

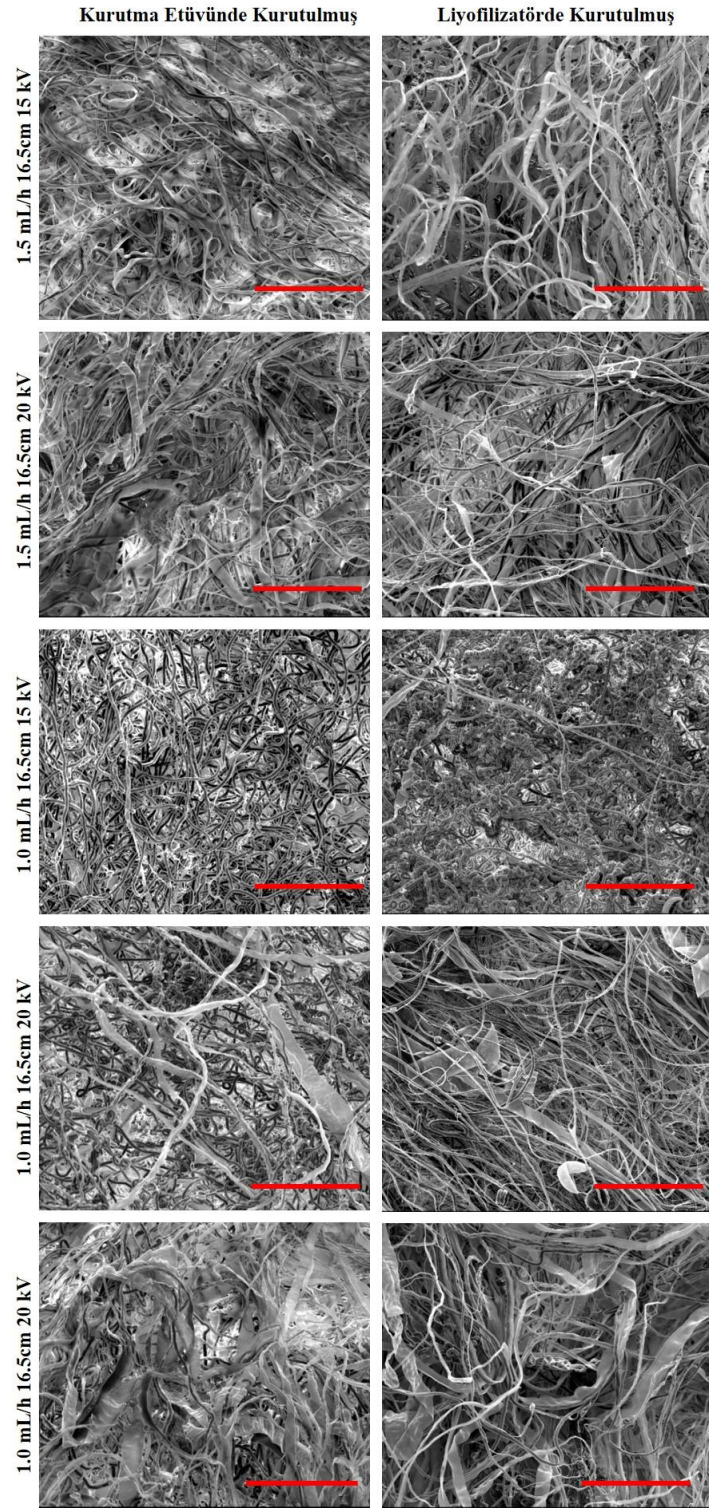
Daha önce ıslak eğirme yöntemi ile P3HB ve PBA katkılı P3HB doku iskeleleri üretilmemiş olduğundan çok aşamalı optimizasyon süreçleri uygulanmıştır. İlk aşamada hangi çözücünün kullanılacağına karar verilmiştir. Bu aşamada geleneksel 2B elektroğirme yöntemi kullanılmıştır. P3HB (%10 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%10 w/v), P3HB (%5 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%5 w/v) karışımları formik asit ve HFIP içerisinde çözülerek şırıngaya aktarılmıştır. Ardından çözücüsü formik asit olan çözeltilerin

viskozitesi yetersiz olduğundan, çözücü olarak HFIP kullanılmasına karar verilmiştir. Çözücü değişikliğinin asıl nedeni çözelti viskozitesinin fiber morfolojisini etkileyen en önemli faktörlerden biri oluşudur. Viskozite arttığında, polimer molekül zincirlerinin dolaşıklığının artmasına bağlı olarak düzgün morfolojiye sahip, boncuksuz ve kesintisiz fiberler elde edilir. Viskozitenin artışının fiber çapını da artırması ve jet çıkışını zorlaştırarak fiber oluşumuna engel olabileme ihtimali göz önünde bulundurularak optimal viskozite aralığı bulunmalıdır [10]. HFIP çözeltisi kullanılarak üretilen P3HB ve PBA katkılı P3HB 2 boyutlu fiberlerinin eğirme koşulları oluşan jetin kararlılığına bağlı olarak, 15 kV voltaj, 22.5 cm şırınga-toplayıcı uzaklığı ve 1.0 mL/sa akış hızı şeklinde seçilmiştir. Üretilen 2 boyutlu iskelelerin SEM görüntüsü Şekil 4.13’de verilmektedir.



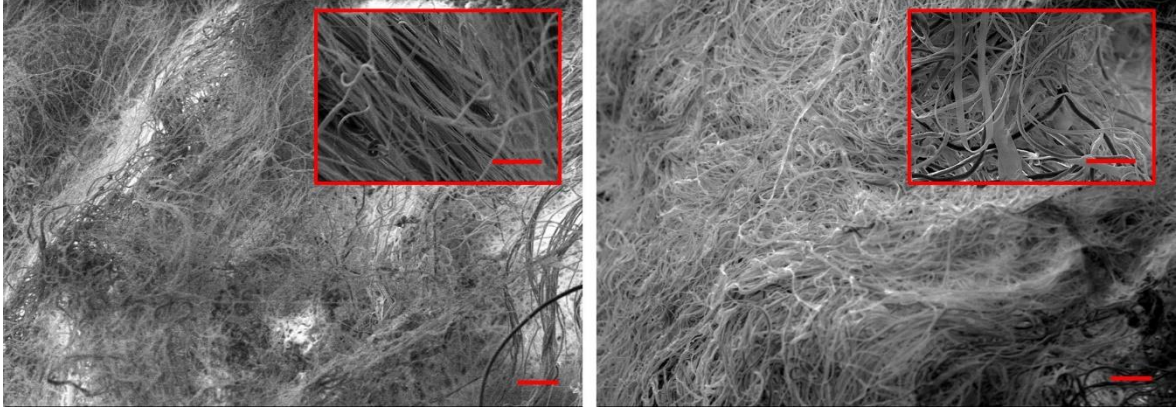
Şekil 4.13. Geleneksel elektroegirme yöntemi ile 15 kV voltaj, 22.5 cm şırınga-toplayıcı uzaklığı ve 1.0 mL/sa akış hızı parametrelerinde üretilmiş 2 boyutlu fiberlerin SEM fotoğrafları (sol-%10 w/v P3HB, sağ-%10 w/w PBA katkılanmış %10 w/v P3HB) (Kırmızı ölçek çubuğu sırasıyla 20  $\mu\text{m}$  ve 2  $\mu\text{m}$ 'yi temsil etmektedir).

Çözücü seçimi yapıldıktan sonra ikinci aşamaya geçilmiş, P3HB (%5 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%5 w/v), P3HB (%10 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%10 w/v) karışımları HFIP’de çözülerek, ıslak eğirme için gerekli olan viskozite ayarlanmaya çalışılmıştır. P3HB (%5 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%5 w/v) karışımlarının 3 boyutlu eğirme için viskozitesinin yeterli olmadığı görülmüş, P3HB (%10 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%10 w/v) karışımlarının kullanılmasına karar verilmiştir. Son aşamada ise çözücüsüne ve viskozitesine karar verilen karışımların eğirme parametrelerinin optimizasyonu yapılmıştır. P3HB’nin piezoelektrik özelliklerinin kurutma aşamasında da etkili olduğu görülmüş, dondurarak kurutma yöntemindeki vakum ortamının fiberleri morfolojik olarak değiştirdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle kurutma için etüv ortamı seçilmiştir. Şekil 4.14’de birden fazla voltaj, akış hızı ve uzaklıkta eğirilen fiberlerin farklı kurutma işlemlerine tabi tutulduktan sonraki SEM görüntüleri verilmektedir.



Şekil 4.14. Farklı parametrelerde ıslak elektroçirme işlemi ve farklı kurutma işlemi uygulanmış %10 (w/v) PBA katkılı %10 (w/v) P3HB fibröz doku iskelelerinin SEM fotoğrafları (Kırmızı ölçek çubuğu 100 µm'yi temsil etmektedir).

Sonuç olarak 15 kV voltaj, 16.5 cm şırınga-toplayıcı uzaklığı ve 1 mL/sa akış hızının optimal eğirme parametreleri olduğuna karar verilmiştir. Şekil 4.15’de belirtilen parametrelerde üretilmiş P3HB (%10 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkı P3HB (%10 w/v) fiber doku iskelelerinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.15. Islak elektroegirme yöntemi ile 15 kV voltaj, 16.5 cm şırınga-toplayıcı uzaklığı ve 1.0 mL/sa akış hızı parametrelerinde üretilmiş 2 boyutlu fiberlerin SEM fotoğrafları (sol-%10 (w/v) P3HB, sağ-%10 (w/w) PBA katkılanmış %10 (w/v) P3HB) (Kırmızı ölçek çubuğu sırasıyla 100  $\mu$ m ve 20  $\mu$ m’yi temsil etmektedir).

İki boyutlu geleneksel elektroegirmede elektrik alan varlığında iğne ucu ile toplayıcı arasındaki yük geçişi sonucu oluşan fiberler metal toplayıcıya yapışarak üst üste yoğun bir şekilde birikir. Üç boyutlu ıslak egirmede ise sıvı toplayıcıda toplanan fiberler, derinlik boyunca batarak daha az yoğunlukta birikir. Sıvı toplayıcı olarak kullanılan etanol, yüzey gerilimini düşürerek fiberlerin sıvı içerisinde daha rahat hareket etmesini sağlar. Çözücü olarak kullanılan HFIP ise EtOH içerisine difüze olarak fiberlerin birbirine yapışmasını engellemektedir [98]. Bu nedenle 2B doku iskeleleri oldukça sıkı bir yapıya sahipken, 3B doku iskeleleri pamuksu bir yapıdadır (Şekil 4.17).



Şekil 4.16. Islak elektroegirme yöntemiyle hazırlanmış doku iskeleleri a) %10 (w/v) P3HB, b) %10 (w/v) P3HB-%10 (w/w) PBA.



Buna ek olarak 2B geleneksel elektroğirmeye oluşan fiberler düz ve katı bir yüzeyde toplandığından, fiberler sadece yatay düzlemde hizalanmaktadır. Üç boyutlu ıslak elektroğirmeye ise EtOH toplayıcıda biriken fiberler, yalnızca yatay düzlemde değil derinlik boyunca da hizalanarak daha dolaşık ve kıvrımlı bir morfolojiye sahip olmaktadır.

Çizelge 4.4. Geleneksel elektroğirme yöntemi ile üretilen 2B ve ıslak elektroğirme yöntemi ile üretilen 3B doku iskelelerinin fiber çapları

Doku İskelesi	Boyut	Çap (µm)
%5 (w/v) P3HB	2B	4.44 ± 1.81
%10 (w/v) P3HB	3B	5.08 ± 1.57
%5 (w/v) P3HB - %10 (w/w) PBA	2B	3.21 ± 1.82
%10 (w/v) P3HB - %10 (w/w) PBA	3B	5.12 ± 1.63

Çizelge 4.4'te görüldüğü üzere üç boyutlu ıslak elektroğirme ile üretilen fiberlerin ortalama çapı, 2B geleneksel elektroğirme ile üretilen fiberlere kıyasla daha yüksektir. Bunun ilk nedeni, 3B elektroğirmeye kullanılan P3HB çözeltisinin derişiminin (%10), 2B elektroğirmeye kullanılan P3HB çözeltisinin derişimine (%5) göre daha yüksek olmasıdır. İkinci nedeni olarak ise geleneksel elektroğirme yönteminde viskoz kuvvetler ve elektriksel alan kuvvetleri baskınken; ıslak elektroğirmeye bu kuvvetlere ek olarak yer çekimi kuvvetinin de etkin olması gösterilebilir. Yer çekimi kuvveti elektroğirmeye kararsızlık hali olarak adlandırılan “whipping” durumuna neden olabilmektedir. Whipping, jet yüzeyindeki yüklerin karşılıklı olarak birbirlerini itmesiyle yüklerin bir arada bulunamamalarından dolayı jette merkezden dış kısımlara doğru radyal tork oluşmasıdır. Bu esnada molekül zincirleri üst üste binerek çapın artmasına neden olabilmektedir [19]. Fakat bu durum 3B ıslak elektroğirme ile üretilmiş PBA ile katkılanmış P3HB fiberler ile katkısız P3HB fiberlerin çap değerleri için geçerli değildir. Bu iki grubun çap değerleri birbirine oldukça yakındır. PBA, P3HB'ye göre çok daha küçük zincirlerdir. Bu nedenle eğirme sırasında çapa etki edecek kadar molekülün üst üste yığılması söz konusu değildir.

#### 4.3.2.2. Mekanik dayanım testleri

Doku iskeleleri, *in vivo* ya da klinik çalışmalarda implantasyon sonrası çeşitli kuvvetlere maruz kalacağı için dayanıklı olmaları ve aynı zamanda iskelelerin manipülasyonun kolaylaştırılması için de optimum dayanım değerlerinin belirlenmesi gerekir. Bunun yanında implante edilecek dokunun mekanik özelliklerine yakın davranışlar sergilemeleri beklenmektedir. Bu nedenle doku iskelesi üretimi sırasında malzemelerin mekanik

özelliklerinin incelenmesi oldukça önemlidir. Çekme testlerinde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir. Çekme dirençleri ve modül değerleri, test sonucu elde edilen gerilim-gerinim (stress-strain) eğrisinden hesaplanmıştır.

Çizelge 4.5. Elektroğirme yöntemi ile üretilen doku iskelelerinin mekanik test sonuçları

Doku İskelesi	Çekme Direnci (MPa)	Elastik Modülü (MPa)
%10 (w/v) P3HB	4.0±0.0	152.0±0.0
%10 (w/v) P3HB - %10 (w/w) PBA	8.2±0.0	290±0.0

Çekme testleri, %10 (w/w) PBA ile katkılanmış %10 (w/v) P3HB ve %10 (w/v) P3HB'nin geleneksel elektroğirme ile üretilmiş 2B iskelelerine uygulanmıştır. Her ne kadar ıslak elektroğirme yöntemiyle 3B doku iskeleleri elde edilmiş ve hücre kültürü çalışmaları bu iskeleler üzerinde yapılmışsa da, 3B iskeleler pamuksu yapıda olduklarından ASTM D695 standardına getirilememektedir. Ayrıca yapısında bulunan fiberler için en doğru mekanik ölçüm, çekme testi sonucunda elde edilmektedir. Bu nedenle 3B ıslak elektroğirmede kullanılan polimer çözeltileriyle aynı oranda polimer derişimi kullanılarak hazırlanan 2B doku iskeleleri üzerinde mekanik analizler yapılmıştır.

Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi, PBA katkılanması P3HB'nin çekme direncini ve elastik modülünü belirgin şekilde arttırmıştır. P3HB iki boyutlu filmlerin çekme direnci 4 MPa iken PBA katkılanması ile 8.23 MPa değerine, elastik modülü 152 MPa iken 290 MPa değerine yükselmiştir. PBA, P3HB'ye oranla daha esnek zincirlere sahiptir. Bu nedenle elektroğirme davranışı açısından oluşan fiberlerin daha esnek ve çekme direncinin daha yüksek olması beklenebilir. Bunun yanında aminoasit türevi olan PBA, elektrik alan içerisinde dipol rotasyonları göstererek elektriksel polarizasyonlar üretebilir. Bu nedenle oryante kristal ve oryante olmamış kristal fazlar oluşabilir [28]. Bu mekanizma elektroğirme sırasında polimer zincirlerinin daha kolay hareket etmesini ve PBA zincirlerinin hidrofobik-hidrofilik etkileşimler ile oluşan P3HB fiberlerin etrafında dizilerek daha elastik olmasını sağlamış olabilir. Sert dokuların rejenerasyonu için kullanılan doku iskelesinin mekanik direnci 10 ile 1500 MPa arasında olmalıdır [99]. Üretilen 2B iskelelerin mekanik dirençleri de bu aralıkta olduğundan, sert doku uygulamalarında bu malzemenin kullanılması uygundur.

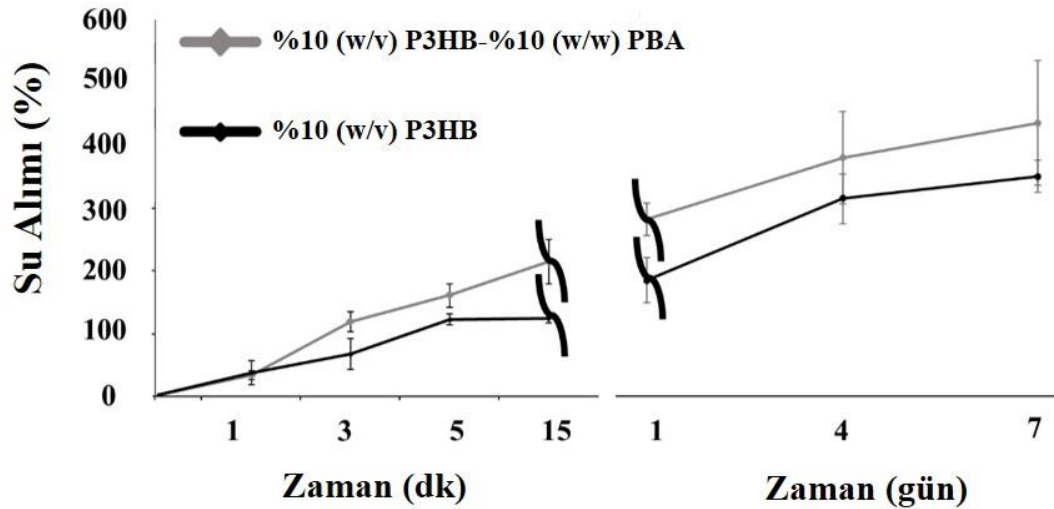
#### 4.3.2.3. Su alım kapasitesi ölçümü

Üç boyutlu doku iskelelerinin denge durumundaki su alım kapasiteleri, Çizelge 4.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. Islak elektroğirme yöntemi ile üretilmiş 3B fibröz doku iskelelerinin denge durumundaki su alım kapasiteleri

Doku İskelesi	Denge durumundaki su miktarı (%)
%10 (w/v) P3HB	356.7±25.0
%10 (w/v) P3HB - %10 (w/w) PBA	443.6±101.0

Üç boyutlu fibröz doku iskelelerinin su alım kapasitelerinin yüksek oranlarda olduğu görülmektedir. Fibröz matrislerin yüksek gözenekliliği ve esnekliği, yapılarına kısa sürede fazla miktarda su alabilmelerini sağlamıştır. Şekil 4.17'de, doku iskelelerinin su alım kapasitelerinin zamana göre değişim grafiği verilmiştir.



Şekil 4.17. Islak elektroğirme yöntemiyle elde edilen %10 (w/v) P3HB ve %10 (w/w) PBA katkılı %10 (w/v) P3HB fibröz doku iskelelerinin su alım kapasitesinin zamanla değişimi.

Şekil 4.17'de de görüldüğü gibi PBA katkılı P3HB 3B fibröz doku iskelelerinin su alım kapasitesi sürekli artış göstermiş ancak P3HB 3B fibröz doku iskelelerinin su alım hızında 1. günden itibaren azalma görülmüştür. Islak elektroğirme ile üretilen 3B fibröz doku iskelelerinin, yüksek gözenekliliği, esnekliği ve hidrofobisitesi nedeniyle dengeye ulaşması 7. günün sonunda bile tamamen gözlemlenememiştir. PBA katkılı P3HB 3B fibröz doku iskelelerinin yapılarına P3HB 3B fibröz doku iskelelerinden daha fazla su aldığı tespit

edilmiştir. Bunun nedeni PBA'nın P3HB'nin hidrofobik özelliklerini iyileştirmesi ve daha önce XRD sonuçlarında tartışılan P3HB'nin kristalin yapısında deformasyona yol açması olarak gösterilebilir. Fakat 4. günden itibaren her iki grupta da su alım hızında azalma olduğu açıktır.

#### 4.3.2.4. Su temas açısı (WCA) ölçümü

P3HB yüksek kristalin yapısı ve hidrofobisitesi dolayısıyla ıslatılabilirliği oldukça düşük bir polimerdir. Hücrelerin bir yüzeye tutunmaları için o yüzeyin optimum değerinde ıslatılabilir olması gerekmektedir. Bu nedenle PBA katkılanmış yapılmış P3HB'nin ıslatılabilirlik özelliklerindeki değişim durgun damla metodu ile oda sıcaklığında incelenmiştir.

Üretilen 2B ve 3B fiber doku iskeleleri gözenekli yapıdadır. Bu nedenle bu yöntem ile yapılan ölçümler gözenekli yüzey üzerinde doğru sonuçlar vermeyebilir. Ayrıca burada araştırılmak istenen nokta P3HB polimerinin ıslatılabilirliğindeki değişimdir. Bu nedenle 3B ıslak elektroegirmede kullanılan polimer çözeltileriyle aynı oranda polimer derişimi kullanılarak çözücü buharlaştırma tekniğiyle hazırlanan filmler üzerinde su temas açısı ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Çözücü buharlaştırma tekniği için %10 (w/w) PBA ile katkılanmış %10 (w/v) P3HB ve %10 (w/v) P3HB polimer çözeltileri cam kültür kaplara dökülmüş ve çözücünün çeker ocak içerisinde 3 günde buharlaşması sağlanmıştır. Su temas açısı ölçümleri her bir örnek için 3 kez tekrar edilmiş ve ölçüm sonuçları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. P3HB ve PBA katkılı P3HB filmlerin su temas açısı değerleri

Doku İskelesi	Su Temas Açısı (°)
% 10 (w/v) P3HB	88.3±19.9
% 10 (w/v) P3HB - % 10 (w/w) PBA	48.9±9.0

Bir yüzeyin hidrofobik ve hidrofilik özellikleri genellikle su temas açısı ölçümleri ile belirlenmektedir. Su temas açısı ölçümlerinde su damlası yüzeyde yayılma eğilimi gösteriyorsa bu yüzeylere hidrofilik yüzey adı verilmektedir. Fakat su damlası yayılmak yerine küresel bir şekilde durma eğilimi gösteriyorsa bu yüzeylere hidrofobik yüzey adı verilmektedir. Bu durumda su damlasının yüzey ile yaptığı açı küçükse bu hidrofilik bir bu açı büyük ise hidrofobik bir yüzeyle çalışılmaktadır. Temas açısını etkileyen en önemli parametre yüzeyin enerjisi ve pürüzlülüğüdür. Malzemelerin kristal örgüsünün içerisindeki her bir atomun tüm yönlerden çekme kuvvetine maruz kalması o malzemeyi kararlı hale

getirir ancak malzeme yüzeyindeki atomlar için bu geçerli değildir. Yüzey atomlarına, kristal örgüsünün içinde bulunan bir atoma uygulanan çekme kuvvetinden daha az çekme kuvveti uygulanır. Bu nedenle yüzey atomları yüzeyden kopma eğilimi gösterirler. Kopma eğilimi gösteren atomlar yüzeyde gerilim oluştururlar. Bu gerilimden ise yüzey enerjisi doğar. Bir malzemenin yüzey gerilimi ne kadar fazlaysa yüzey enerjisi de o kadar fazladır. Yüzey gerilimi düştükçe, su damlacığı yüzeyde daha rahat hareket edeceğinden temas açısı da düşer [100]. Bir yüzeye hücrelerin rahatlıkla tutunması ve yayılması için o yüzeyin optimal bir ıslatılabilirlik değerine sahip olması gerekir. Bu nedenden dolayı iskelesi olarak üretilen malzemelerin su temas açısı ölçümleri yapılmaktadır.

Yüksek yüzey enerjisi ve gerilimine sahip P3HB, bu özelliklerinden dolayı oldukça hidrofobik bir polimerdir. P3HB'nin elde edildiği bakteri türüne ve ekstraksiyon metoduna göre molekül ağırlığı ve buna bağlı olarak fiziksel, kimyasal ve mekanik özellikleri değişmektedir. Ayrıca doku iskelesi üretim yöntemleri de P3HB'nin ıslatılabilirlik özelliklerini değiştirmektedir. Bu nedenle literatürde optimal bir hidrofobisite belirlenememiştir. Örneğin Masaeli ve ark.'larının yaptığı çalışmada P3HB nanofibröz doku iskelelerinin hidrofobisitesi dinamik temas açısı metoduyla ölçülmüş ve  $109.17 \pm 3.21^\circ$  olarak bulunmuştur [32]. Gene Masaeli ve ark.'larının yaptığı bir başka çalışmada PHB/PHBV iskelelerde goniometre ile yaptıkları ölçümlerde temas açısı  $107.4 \pm 5.0^\circ$  olarak tespit edilmiştir [101]. Buradan da görüldüğü üzere P3HB'ye göre daha esnek zincirli ve daha amorf yapılarla yapılan katkılmalarda temas açısının düştüğü görülmektedir. Tez çalışmasında da P3HB'ye göre daha düşük molekül ağırlığına ve kristaliniteye sahip olan PBA, P3HB'nin hidrofobisitesinde düşüş yaratmıştır. Burada XRD sonuçlarıyla kristalinite düşüşü ve hidrofobite düşüşü açısından paralellik bulunmaktadır. P3HB ve PBA'nın benzer moleküler konformasyonları sayesinde daha kısa zincirli PBA daha uzun zincirli P3HB molekülünün arasına girerek, hidrofobisitede düşüş sağlamış olabilir. Proteinler elektrik alan içerisinde elektriksel polarizasyonlar üretir, yönelimli ve yönelimli olmayan kristal fazlar oluşturarak dipol rotasyonlara girebilirler [28]. PBA da protein benzeri yapısından dolayı aynı davranışı sergilemiş olabilir. Bu davranış sonucunda PBA ve P3HB molekülleri arasında elektrik alan etkisiyle hidrofilik-hidrofobik etkileşimler oluşması ve buna bağlı olarak P3HB'nin hidrofobisitesinde düşüş görülmüş olması muhtemeldir. Çizelge 4.8'de tez çalışmasında kullanılan üretim yöntemleri ile elde edilmiş doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmalarının sonuçları özet halinde verilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı üretim teknikleri ile üretilmiş doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları özeti

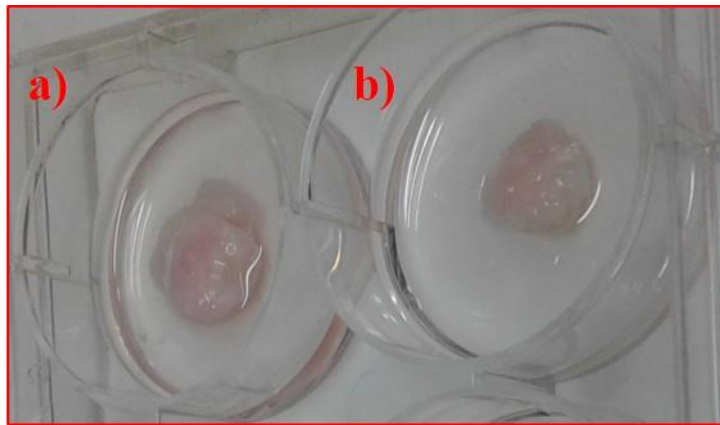
Doku İskelesi Üretim Yöntemi	Doku İskelesi Özellikleri	İskeleler						
		P3HB	%2 (w/w) PBA	%2 (w/w) PNMPBA	%2 (w/w) PMBA	% 10 (w/w) PBA	%10 (w/w) PNMPBA	%10 (w/w) PMBA
<b>Dondurarak Kurutma (3B)</b> (%5 w/v P3HB)	Sıkıştırma Direnci (kPa)	14.00±0.00	5.66±1.04	ÖA*	ÖA	ÖA	ÖA	ÖA
	Elastik Modülü (kPa)	27.40±0.00	12.06±3.20	ÖA	ÖA	ÖA	ÖA	ÖA
	Kristalinite (%)	52.70±0.00	48.84±0.00	42.50±0.00	46.84±0.00	36.91±0.00	41.21±0.00	46.27±0.00
<b>Geleneksel Elektroğirme (2B)</b> (%5 w/v P3HB)	Çekme Direnci (kPa)	4×10 <sup>3</sup> ±0.00	#*	#	#	8.20×10 <sup>3</sup> ±0.00	#	#
	Elastik Modülü (kPa)	152×10 <sup>3</sup> ±0.00	#	#	#	290.00×10 <sup>3</sup> ±0.00	#	#
	Su Temas Açısı (°)	88.30±19.90	#	#	#	48.90±9.00	#	#
	Fiber Çapı (µm)	4.44±1.81	#	#	#	3.21±1.82	#	#
<b>Islak Elektroğirme (3B)</b> (%10 w/v P3HB)	Su Alım Kapasitesi (%)	356.70±25.00	#	#	#	443.60±101.10	#	#
	Fiber Çapı (µm)	5.08±1.57	#	#	#	5.12±1.63	#	#

\*ÖA: Ölçüm alınmadı.

\*\*#: İskeleler üretilmedi.

#### 4.4. Hücre Kültürü Sonuçları

Nanofiber doku iskeleleri, ECM'in ve ECM yapısında bulunan fibrillerin taklidi açısından hücrel organizasyon, sağ-kalım ve fonksiyonlar için son derece uygun bir morfolojiye sahiptir. Ayrıca nanofiber yapısı yüksek gözeneklilik ve yüzey alanı/hacim oranından dolayı hücrelerin tutunmasını desteklerken, iskelenin iç kısımlarına doğru filtrasyona izin verdiği için hücrelerin migrasyonunu da destekler. Son yıllarda doku mühendisliğinde hücrel fonksiyonların kontrol edilebilmesi amacıyla 3B yapıların üretimi ve bu yapıların manipülasyonu popüler bir araştırma konusudur. Çünkü 3B yapı hücrelerin doğal ortamındaki sinyalizasyonun taklidi açısından önem taşır. İki boyutlu kültürdeki hücreler, *in vivo* koşullardaki hücre morfolojisinden anlamlı derecede farklıyken; 3B kültürdeki hücrelerin morfolojisi *in vivo* koşullardaki morfolojiye oldukça yakındır. Üç boyutlu yapı uzaydaki yerleşiminden dolayı mekanik sinyaller ile hücrel ligasyona ve hücreler arası sinyalizasyona yardımcı olur. Bununla beraber, besin maddelerinin, büyüme faktörlerinin ve enzimlerin difüzyonunu; proteinlerin yüzeye yüksek miktarlarda yapışmasına olanak sağlayan yapısıyla da hücre canlılığını destekler [102]. Bu nedenle *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında *in vivo* koşulların taklidi için 3B yapıların üretilmesi büyük önem taşımaktadır. Tez çalışmasında 2B ve 3B fibröz doku iskeleleri üretilmiş, ancak yukarıdaki bilgiler ışığında hem hücrenin mikro-çevresinin taklidi hem de malzemenin hücrel uyumluluğunun araştırılması amacıyla ıslak eğirme yöntemiyle elde edilmiş 3B doku iskeleleri ile hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Şekil 4.18'de hücre kültür çalışmasının 21. günündeki iskelelerin fotoğrafları verilmiştir.

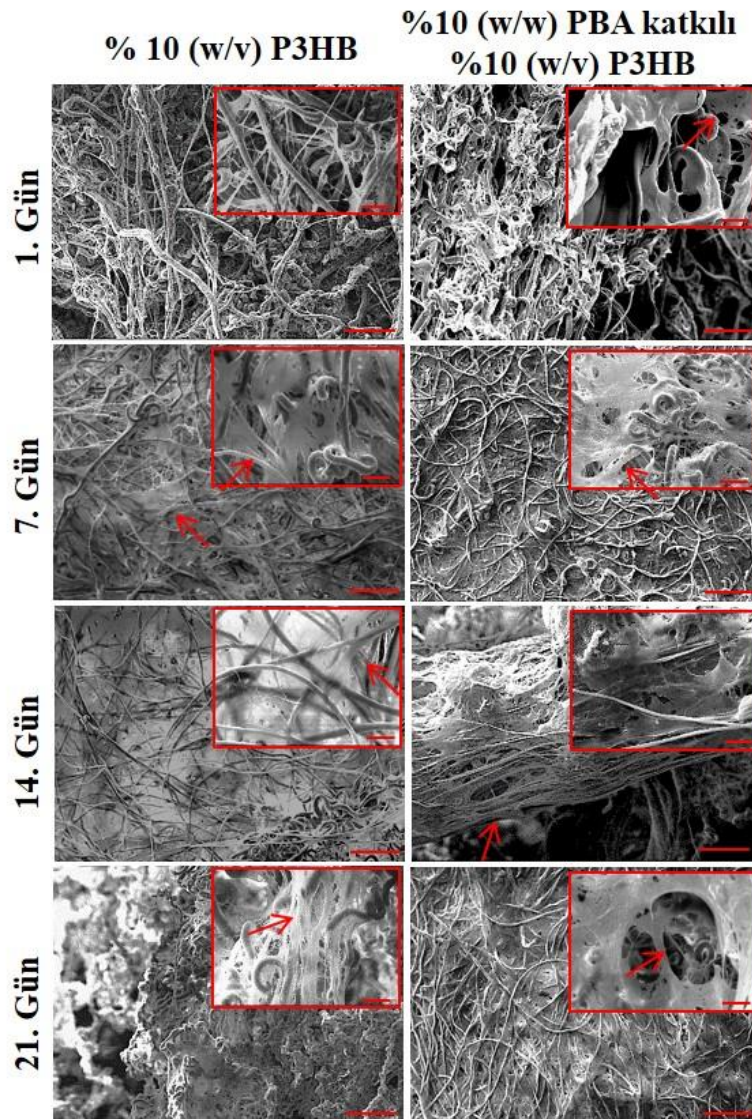


Şekil 4.18. Hücre kültür çalışmasının 21. günündeki a) %10 (w/v) P3HB, b) %10 (w/w) PBA katkılı %10 (w/v) P3HB fibröz doku iskelelerinin fotoğrafları.

MC3T3-E1 hücre hattıyla yapılan 21 günlük kültür çalışmasında hücre tutunması, yayılımı ve morfolojisi SEM analizi ile takip edilirken; hücre canlılığının takibi MTT analizi ile yapılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanmıştır. Aşağıda SEM ve MTT analiz sonuçları verilmiştir.

#### 4.4.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

SEM analizi; hücre yapışmasını, çoğalmasını, canlılığını ve morfolojisini belirlemek üzere hücre kültür çalışmasının 1, 7, 14 ve 21. günlerinde gerçekleştirilmiştir. P3HB (%10 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%10 w/v) 3B fibröz doku iskelelerinin yüzeyindeki hücrelerin morfolojileri Şekil 4.19’da görülmektedir.



Şekil 4.19. Hücre kültür çalışmasının 1, 7, 14 ve 21. günlerinde P3HB (%10 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%10 w/v) 3B fibröz doku iskelelerinin yüzeyindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM fotoğrafları (Kırmızı ölçek çubuğu sırasıyla 100 µm ve 20 µm’yi temsil etmektedir).



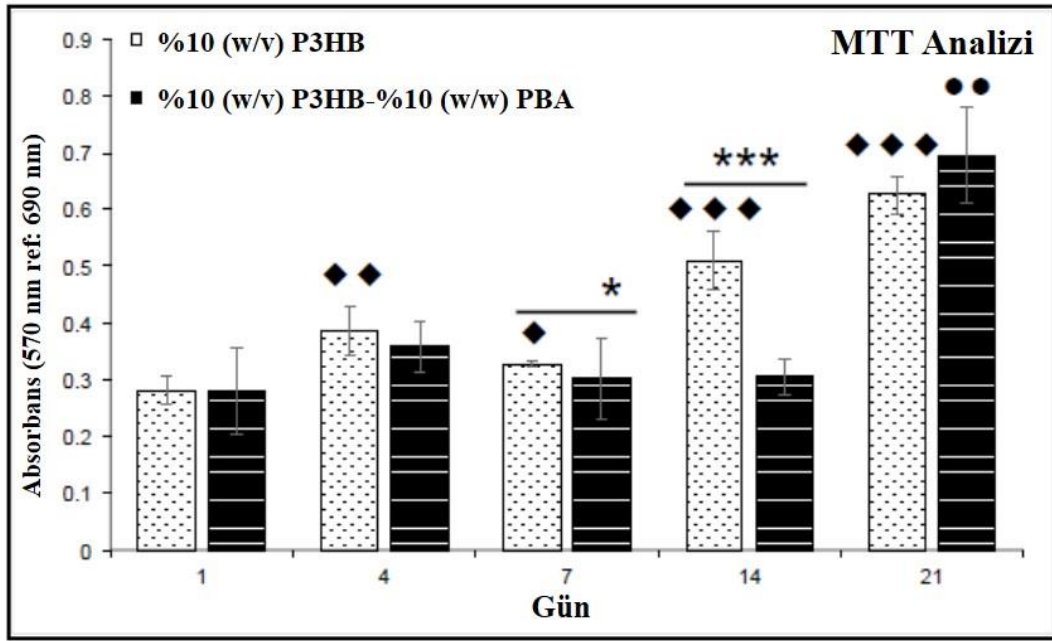
Hücre kültürünün 1. gününde, tüm doku iskelelerinin yüzeyinde hücre tutunmasının gerçekleştiği gözlenmektedir. Dördüncü günden 7. güne kadar hücrelerin çoğalmasının ve yayılmasının her iki grubun yüzeyinde de başarıyla gerçekleştiği ve hücrelerin oluşturdukları uzantılarla hücre-hücre iletişiminin sağlandığı görülmektedir. On dördüncü günde P3HB fibröz doku iskelelerinde hücre canlılığı yüksek olmakla birlikte, % 10 PBA katkılı P3HB fibröz doku iskeleleri ile karşılaştırıldığında hücre yayılımlarının görece gelişigüzel olduğu ve kimi bölgelerde yayılımın daha az olduğu görülmektedir. Yüzey kimyası, malzeme morfolojisi ve mekanik özellikleri, hücre tutunmasını ve yayılımını doğrudan veya dolaylı olarak etkilemektedir. Kültür sırasında ilk meydana gelen olay, serum proteinlerinin yüzeye yapışmasıdır. Hücrelerin yüzeye tutunması ise yüzeye tutunmuş proteinler ile sağlanır. Yüzde 10 PBA katkılı P3HB doku iskelelerinde hücre yayılımlarının daha düzenli olması, PBA'nın protein benzeri oluşunun da katkısıyla, yüzey yapısı ile açıklanabilir. Buna ek olarak fibröz doku iskeleleri, diğer doku iskeleleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek yüzey alanına sahiptir ve bu nedenle daha çok miktarda serum proteininin adsorpsiyonunu sağlar [102].

ECM'de bulunan 1.5 nm çapında 300 nm uzunluğundaki kollajen molekülleri bir araya gelerek çapı 10 ile 300 nm arasında değişen kollajen fibrilleri oluştururlar [103]. Tez kapsamında üretilen fiberlerin çapı bu değere oldukça yakındır. Bu nedenle kollajen fibrillere morfolojik olarak benzeyen fiberler hücrenin doğal çevresinde bulunan ortamı taklit edebilmiş, hücrelerin çoğalması ve yayılması için uygun ortamı yaratabilmişlerdir. Kültürün 21. günündeki SEM görüntülerine bakıldığında %10 PBA katkılı P3HB fibröz doku iskeleleri üzerindeki hücre yoğunluğu P3HB doku iskelelerine oranla daha fazladır. PBA'nın aminoasit benzeri bozunma ürünleri hücrelerin daha fazla ECM salgılamasına katkıda bulunarak yoğunluğu artırmış ve yapısında bulunan protein absorplayıcı grupların varlığı nedeniyle hücrelerin daha düzenli yayılmasını sağlamış olabilir. Tüm bunlara ek olarak, PBA'nın varlığı P3HB'nin kristal yapısını bozarak kırılgenliğini azaltmış ve elastikiyet kazandırmıştır. MC3T3-E1 hücreleri öncül kemik hücreleri olduğundan mekanik dayanımı görece daha yüksek olan yüzeylere tutunabilmekte ve yayılabilmektedirler. Bu teoriyi destekleyecek şekilde özellikle 14. günden sonra hücrelerin yayılımı, %10 PBA katkılı P3HB fibröz doku iskelelerinde, malzeme yüzeyini saran, fiberlerle birlikte oryantasyona giden bir görünüm çizmiştir.

Kemik hücrelerinin gelişiminde piezoelektrik özelliklerin etkisinin olduğu bilinmektedir [26]. P3HB ve türevlerinin piezoelektrik özellikleri göz önüne alındığında hücrelerin %10 PBA katkılı P3HB fibröz doku iskelelerinde daha etkin tutunma ve yayılım göstermesi olağandır. MC3T3-E1 preosteoblast hücreleriyle yapılan hücre kültür çalışması sonucunda, tüm doku iskelelerinin herhangi bir biyoaktif ajanla modifiye edilmediğinde dahi hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasını desteklediği gözlenmiştir. PBA katkılanması yapılan grupta hücrelerin daha düzenli olduğu ve daha yoğun ECM salgıladığı, SEM görüntülerinden yola çıkılarak söylenebilir.

#### 4.4.2. MTT analizi

P3HB ve PBA katkılı P3HB iskelelerdeki hücre üremesi, 21 günlük inkübasyon periyodunda Bölüm 3.4.1.3'te açıklanan mitokondriyal aktivite tayin testi (MTT testi) kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar optik yoğunluk değeri olarak Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4.20. Hücre kültür çalışmasının 1, 7, 14 ve 21. günlerinde P3HB (%10 w/v) ve PBA (%10 w/w) katkılı P3HB (%10 w/v) 3B fibröz doku iskelelerinin yüzeyindeki MC3T3-E1 hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar  $n = 4$ , ♦ $p < 0.05$ , ♦♦ $p < 0.01$ , ♦♦♦ $p < 0.001$  P3HB'nin üzerindeki hücrelerin ilk gün canlılık değerinin kontrol grubu olduğu durum, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  aynı günde farklı grupların karşılaştırıldığı durum ve •• $p < 0.01$  %10 PBA içeren iskelelerin üzerindeki hücrelerin ilk gün canlılık değerinin kontrol grubu olduğu durum).

Doku iskeleleri ile yürütülen çalışmalarda hücre canlılığının belirlenmesi amacı ile yapılan MTT testi incelendiğinde her iki iskele grubunun da hücrelerin tutunup çoğalmasına uygun olduğu görülmektedir. Hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri her iki grupta da ilk 7 günde neredeyse sabittir ve grupların birbirleri arasında, hücre canlılığı açısından, 7. güne kadar

anlamli bir fark gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ). Kültürün 14. gününde P3HB grubunda %10 PBA katkıli gruba göre belirgin bir biçimde hücre canlılığı açısından üstünlük vardır ( $p<0.001$ ). P3HB grubundaki hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri 4. günden itibaren 21. güne kadar (sırasıyla,  $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ,  $p<0.001$  ve  $p<0.001$ ) ilk günkü mitokondriyal aktiviteleriyle karşılaştırıldığında anlamlı derecede artmıştır. PBA katkılanmış P3HB grubundaki hücrelerin ise ilk günkü mitokondriyal aktiviteleri ile 21. gün mitokondriyal aktiviteleri arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p<0.01$ ). MTT sonuçları ile SEM görüntüleri arasında paralellik bulunmaktadır. Kültürün 21. günündeki PBA ile katkılanmış P3HB doku iskelelerindeki canlılık ve SEM görüntüleri dikkate alındığında PBA katkılamasının P3HB'nin hücresele etkileşimleri üzerinde olumlu etkileri olduğu görülmüştür.

## 5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasında P3HB polimeri PBA, PNMPBA ve PMBA ile katkılanmıştır. Doku iskelesi üretimi için dondurarak kurutma yöntemi, geleneksel elektroğirme yöntemi ve ıslak elektroğirme yöntemleri uygulanmıştır. Dondurarak kurutma yöntemi ile PBA, PNMPBA ve PBA katkılı P3HB 3B süngerimsi doku iskeleleri, geleneksel elektroğirme yöntemi ile PBA katkılı P3HB 2B fibröz doku iskeleleri ve ıslak elektroğirme yöntemi ile PBA katkılı P3HB 3B fibröz pamuksu doku iskeleleri üretilmiştir. Yapılan katkılama ile P3HB'nin doku mühendisliği açısından dezavantaj oluşturan yüksek kristalinite, yüksek hidrofobisite ve düşük biyobozunma hızı gibi özellikleri iyileştirilmeye çalışılmıştır. Ardından, yapılan katkılama ile P3HB'nin hücre uyumluluğuna olan etkisi araştırılmıştır. Elde edilen doku iskeleleri ile yürütülen karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmaları sonucunda ulaşılan önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- ❖ Daha önce hiçbir doku mühendisliği çalışmasında kullanılmamış olan PBA, PNMPBA ve PMBA polimerleri ile P3HB'nin çözme koşulları ve karışma oranları optimize edilmiştir.
- ❖ Dondurarak kurutma yöntemi için çözücü olarak kloforom, P3HB oranı %5 (w/v) olarak belirlenirken; katkılama ajanlarının oranları, her katkılama polimeri için, P3HB çözelti içerisinde kütlece 100 birim kabul edilerek P3HB'ye oranla %2, %5 ve %10 (w/w) olarak belirlenmiştir. Ardından çeşitli dondurma işlemleri uygulanarak, polimer karışımları dondurarak kurutma cihazına alınmış ve 96 saat sonunda 3B süngerimsi doku iskeleleri elde edilmiştir. Üretilen iskelelerin morfolojik incelemesi SEM analizi ile yapılmıştır. PBA türevleriyle katkılanmış iskelelerde katkılama oranı arttıkça gözenekliliğin azaldığı, belirgin gözeneklilik artışının sadece PBA ile katkılanmış gruplarda olduğu, ancak tüm katkılama gruplarında P3HB'ye göre pürüzlülük artışı olduğu tespit edilmiştir.
- ❖ Dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen iskelelerin mekanik özelliklerinin belirlenebilmesi için basma mekanik testi uygulanmıştır. Analiz sonucunda P3HB ve %2 PBA katkılı P3HB iskelelerin sıkıştırma dirençleri sırasıyla  $14.00 \pm 0.00$  kPa ve  $5.66 \pm 1.04$  kPa olarak, elastik modül değerleri ise sırasıyla  $27.40 \pm 0.00$  kPa ve  $12.06 \pm 3.20$  kPa olarak bulunmuştur. Diğer iskelelerden, iskelelerin analiz için uygun ölçütlere getirilememesi nedeniyle ölçüm alınamamıştır. Ayrıca PNMPBA

ve PMBA içeren doku iskelelerinin dondurarak kurutma cihazının uyguladığı yüksek vakum ile parçalandığı gözlemlenmiştir.

- ❖ Katkılama polimerlerinin P3HB'nin kristal yapısında yarattığı değişiklikler X-ışını kırınımı (XRD) analizi ile tespit edilmiştir. Saf P3HB içeren iskelelerin kristalinitesi %52.70 olarak, %2 PBA, PNMPBA ve PMBA katkılaması yapılmış grupların kristalinitesi ise sırasıyla %48.84, %42.50 ve %46.84 olarak; %5 PBA, PNMPBA ve PMBA katkılaması yapılmış grupların kristalinitesi sırasıyla %46.46, %46.01 ve %46.61 olarak; %10 PBA, PNMPBA ve PMBA katkılaması yapılmış grupların kristalinitesi de sırasıyla %36.91, %41.21 ve %46.27 olarak bulunmuştur. Kristalinitedeki en fazla düşüşün %10 PBA katkılaması yapılan grupta olduğu tespit edilmiştir.
- ❖ Yapılan sitotoksikite testi sonucunda, saf P3HB ve PBA/türevleri ile katkılanmış P3HB'nin, katkılama oranı %10'a çıkarıldığında bile hücreler için sitotoksik etki yaratmadığı görülmüştür. Ayrıca tüm dilüsyonlar ve gruplarda, ekstraksiyon ortamının bulunmadığı ortama kıyasla % 100'den fazla canlılık gözlenmiştir.
- ❖ Çalışmada kullanılan katkılama polimerlerinin bozunma davranışları daha önce hiçbir çalışmada incelenmemiştir. Bu nedenle P3HB ve katkılı P3HB iskelelerin enzimatik ve hidrolitik davranışları takip edilmiştir. Gravimetrik olarak kütle kaybı ölçümlerinden anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Bu nedenle bozunurluğun belirlenmesi için, test süresince malzemelerin morfolojilerindeki değişimler SEM görüntüleri ile incelenmiştir. Yapılan görsel incelemelerden sonra %2 PBA katkılı P3HB ve %10 PBA katkılı P3HB iskelelerin daha fazla bozunmaya uğradığı tespit edilmiştir.
- ❖ Dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen iskelelerin karakterizasyon çalışmaları sonucunda iskelelerin mekanik ve morfolojik özelliklerinin doku mühendisliği uygulamalarına elverişli olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle P3HB polimerine daha uygun olduğu düşünülen elektroğirme yöntemine geçilmiştir.
- ❖ Elektroğirme yönteminde iki farklı teknik kullanılmıştır. Geleneksel elektroğirme yöntemi ile çözücü, katkılama oranı, elektroğirme koşulları gibi parametreler belirlenmeye çalışılmıştır. Elektroğirme yönteminde çözücü olarak HFIP kullanılmasına karar verilmiş ayrıca, PNMPBA ve PBA polimerlerinin bu yöntemle uygun olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle elektroğirme yöntemine sadece PBA

katkı polimeri ile devam edilmiştir. En uygun viskoziteye %5 (w/v) P3HB ve %10 (w/w) PBA katkılı P3HB çözeltilerinin sahip olduğu ve eğirme için optimal koşulların 15 kV voltaj, 22.5 cm şırınga-toplayıcı uzaklığı ve 1.0 mL/sa akış hızı olduğu tespit edilmiştir.

- ❖ Islak elektroegirme aşamasında, geleneksel elektroegirmede kullanılan çözeltilerin viskozitesinin yeterli olmadığı görülüp, P3HB oranı %10'a çıkarılmıştır. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonrasında ise 15 kV voltaj, 16.5 cm şırınga-toplayıcı uzaklığı ve 1 mL/sa akış hızının optimal eğirme parametreleri olduğuna karar verilmiştir.
- ❖ Elde edilen fibröz doku iskelelerinin morfolojik incelemesi SEM analizi ile yapılmıştır. İki boyutlu fiberler oldukça sıkı bir yapıda iken, 3B fiberlerin pamuksu bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca ImageJ programı ile yapılan çap analizinde, geleneksel elektroegirme yöntemiyle üretilen %5 P3HB ve %10 PBA katkılı P3HB fiberlerin çapları sırasıyla  $4.44\pm 1.81$   $\mu\text{m}$  ve  $3.21\pm 1.82$   $\mu\text{m}$ , ıslak elektroegirme ile üretilen %10 P3HB ve %10 PBA katkılı P3HB fiberlerin çapları sırasıyla  $5.08\pm 1.57$   $\mu\text{m}$  ve  $5.12\pm 1.63$   $\mu\text{m}$  olarak bulunmuştur. Üç boyutlu ıslak elektroegirme ile üretilen fiberlerin ortalama çapı, 2B geleneksel elektroegirme ile üretilen fiberlere kıyasla daha yüksektir.
- ❖ Elde edilen fiber doku iskelelerinin mekanik dayanımları 2B fibröz iskelelere çekme testi yapılarak belirlenmiştir. İskelelerin çekme dirençleri sırasıyla 4.00 MPa ve 8.20 MPa olarak bulunurken, elastik modül değerleri sırasıyla 152.00 MPa ve 290.00 MPa olarak bulunmuştur. Yapılan katkılama ile P3HB'nin mekanik özellikleri iyileştirilmiştir.
- ❖ Ayrıca fibröz 3B iskeleler ile aynı polimer oranındaki filmler üzerinde su temas açısı analizleri gerçekleştirilmiştir. İskelelerin su temas açıları %5 P3HB için  $88.30\pm 19.90^\circ$  iken %10 PBA katkılı P3HB için  $48.90\pm 9.00^\circ$ 'dir. Yapılan katkılama hidrofobiteyi önemli oranda azaltmıştır.
- ❖ Su alım kapasitesi ölçümleri ise ıslak elektroegirme yöntemi ile üretilen 3B doku iskeleleri ile yapılmıştır. Üç boyutlu fibröz doku iskelelerinin su alım kapasiteleri %10 P3HB için  $356.70\pm 25.00$  olarak, %10 PBA katkılı P3HB için  $443.60\pm 101.10$  olarak tespit edilmiştir. PBA katkılamasının yapıya elastikiyet kazandırarak su alım kapasitesini de arttırdığı belirlenmiştir.

- ❖ Hücresel uyumluluğun incelenebilmesi için P3HB ve PBA katkılı P3HB fibröz 3B iskeleler ile MC3T3-E1 preosteoblastik hücre hattı kullanılarak hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla kültürün 1, 4, 7, 14 ve 21. günlerinde MTT analizi ve hücre morfolojisinin takibi için kültürün 1, 7, 14 ve 21. günlerinde SEM analizi gerçekleştirilmiştir.
- ❖ Hücrelerin %10 PBA katkılı P3HB fibröz doku iskelelerinde daha etkin tutunma ve yayılım gösterdiği, hücrelerin daha düzenli olduğu ve daha yoğun ECM salgıladığı, SEM görüntülerinden yola çıkılarak söylenebilmektedir. MTT sonuçları da bu bulguyu desteklemektedir.

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, bir aminoasit türevi olan PBA katkılmasının, bir bakteriyal biyopoliester olan P3HB'nin kristalinitesini ve hidrofobitesini azalttığı ve buna bağlı olarak bozunma hızını arttırdığı belirlenmiştir. PBA ve P3HB karışımının herhangi bir toksik etki göstermeden, hücre tutunması, çoğalmasını ve yayılmasını saf P3HB'ye göre daha iyi desteklediği tespit edilmiştir. Ayrıca ıslak elektroçirme ile elde edilen 3B boyutlu fibröz yapının boyutsal olarak doğal ECM'yi iyi bir şekilde taklit ettiği, bunun yanında hücrelerin tutunma ve yayılma davranışları açısından daha uygun bir ortam yarattığı da bulgular arasındadır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Chen, G.Q., Qiong W., The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials, *Biomaterials*, 26(33), 6565-6578, **2005**.
- [2] Pan, P., Zhao, L., Zhu, B., He, Y., Inoue, Y., Fractionated crystallization and self-nucleation behavior of poly (ethylene oxide) in its miscible blends with poly (3-hydroxybutyrate), *Journal of Applied Polymer Science*, 117(5), 3013-3022, **2010**.
- [3] Reis, K. C., Pereira, J., Smith, A. C., Carvalho, C. W. P., Wellner, N., Yakimets, I., Characterization of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHB-HV)/maize starch blend films, *Journal of Food Engineering*, 89(4), 361-369, **2008**.
- [4] Artsis, M. I., Bonartsev, A. P., Iordanskii, A. L., Bonartseva, G. A., Zaikov, G. E., Biodegradation and medical application of microbial poly (3-hydroxybutyrate), *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 523(1), 21-593, **2010**.
- [5] Freier, T., Kunze, C., Nischan, C., Kramer, S., Sternberg, K., Saß, M., Schmitz, K. P., In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly (3-hydroxybutyrate), *Biomaterials*, 23(13), 2649-2657, **2002**.
- [6] Gogolewski, S., Jovanovic, M., Perren, S. M., Dillon, J. G., Hughes, M. K., Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides (PLA), poly (3-hydroxybutyrate)(PHB), and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHB/VA), *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 27(9), 1135-1148, **1993**.
- [7] González-Obeso, C., Song, W. L., Rodriguez-Pérez, M. A., Mano, J. F., Superhydrophobic to superhydrophilic biomimetic poly (3-hydroxybutyrate) surfaces made by phase inversion, *In Materials Science Forum*, Trans Tech Publications, 730, 44-49, **2013**.
- [8] Peschel, G., Dahse, H. M., Konrad, A., Wieland, G. D., Mueller, P. J., Martin, D. P., Roth, M., Growth of keratinocytes on porous films of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (4-hydroxybutyrate) blended with hyaluronic acid and chitosan, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85(4), 1072-1081, **2008**.
- [9] O'Brien, F. J., Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today*, 14(3), 88-95, **2011**.
- [10] Nerem, R. M., Sambanis, A., Tissue engineering: from biology to biological substitutes, *Tissue Engineering*, 1(1), 3-13, **1995**.
- [11] Yannas, I. V., Lee, E., Orgill, D. P., Skrabut, E. M., Murphy, G. F., Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(3), 933-937, **1989**.
- [12] O'Brien, F. J., Harley, B. A., Yannas, I. V., Gibson, L. J., The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds, *Biomaterials*, 26(4), 433-441, **2005**.



- [13] Velema, J., Kaplan, D., Biopolymer-based biomaterials as scaffolds for tissue engineering, *In Tissue Engineering I*, Springer Berlin Heidelberg, 187-238, **2006**.
- [14] Gomes, M. E., Reis, R. L., Biodegradable polymers and composites in biomedical applications: from catgut to tissue engineering, part 1 available systems and their properties, *International Materials Reviews*, 49(5), 261-273, **2004**.
- [15] Yang, S., Leong, K. F., Du, Z., Chua, C. K., The design of scaffolds for use in tissue engineering, part I. traditional factors, *Tissue Engineering*, 7(6), 679-689, **2001**.
- [16] Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., Kenny, J. M., Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review, *Polymer Degradation and Stability*, 95(11), 2126-2146, **2010**.
- [17] Soykeabkaew, N., Thanomsilp, C., Suwantong, O., A review: Starch-based composite foams, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 78, 246-263, **2015**.
- [18] Sill, T. J., von Recum, H. A., Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials*, 29(13), 1989-2006, **2008**.
- [19] Reneker, D. H., Yarin, A. L., Electrospinning jets and polymer nanofibers, *Polymer*, 49(10), 2387-2425, **2008**.
- [20] Agarwal, S., Wendorff, J. H., Greiner, A., Use of electrospinning technique for biomedical applications, *Polymer*, 49(26), 5603-5621, **2008**.
- [21] Cai, S., Xu, H., Jiang, Q., Yang, Y., Novel 3D electrospun scaffolds with fibers oriented randomly and evenly in three dimensions to closely mimic the unique architectures of extracellular matrices in soft tissues: fabrication and mechanism study, *Langmuir*, 29(7), 2311-2318, **2013**.
- [22] Zinn, M., Witholt, B., Egli, T., Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53(1), 5-21, **2001**.
- [23] Chen, G. Q., Wang, Y., Medical applications of biopolyesters polyhydroxyalkanoates, *Chinese Journal of Polymer Science*, 31(5), 719-736, **2013**.
- [24] Hablot, E., Bordes, P., Pollet, E., Avérous, L., Thermal and thermo-mechanical degradation of poly (3-hydroxybutyrate)-based multiphase systems, *Polymer Degradation and Stability*, 93(2), 413-421, **2008**.
- [25] Carrasco, F., Dionisi, D., Martinelli, A., Majone, M., Thermal stability of polyhydroxyalkanoates, *Journal of Applied Polymer Science*, 100(3), 2111-2121, **2006**.
- [26] Knowles, J. C., Mahmud, F. A., Hastings, G. W., Piezoelectric characteristics of a polyhydroxybutyrate-based composite, *Clinical Materials*, 8(1-2), 155-158, **1991**.

- [27] Smith, P. B., Pasztor, A. J., McKelvy, M. L., Meunier, D. M., Froelicher, S. W., Wang, F. Y., Analysis of synthetic polymers and rubbers, *Analytical Chemistry*, 71(12), 61-80, **1999**.
- [28] Sugita, A., Mitsubayashi, M., Tasaka, S., Electric activity in rigid rod-like polymer, poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate), *Polymer*, 47(14), 5141-5144, **2006**.
- [29] Nebe, B., Forster, C., Pommerenke, H., Fulda, G., Behrend, D., Bernewski, U., Rychly, J., Structural alterations of adhesion mediating components in cells cultured on poly- $\beta$ -hydroxy butyric acid, *Biomaterials*, 22(17), 2425-2434, **2001**.
- [30] Shishatskaya, E. I., Volova, T. G., A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for in vitro cell cultures, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15(8), 915-923, **2004**.
- [31] Xu, X. Y., Li, X. T., Peng, S. W., Xiao, J. F., Liu, C., Fang, G., Chen, G. Q., The behaviour of neural stem cells on polyhydroxyalkanoate nanofiber scaffolds, *Biomaterials*, 31(14), 3967-3975, **2010**.
- [32] Masaeli, E., Morshed, M., Rasekhian, P., Karbasi, S., Karbalaie, K., Karamali, F., Baharvand, H., Does the tissue engineering architecture of poly (3-hydroxybutyrate) scaffold affects cell-material interactions?, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(7), 1907-1918, **2012**.
- [33] Ni, J., Wang, M., In vitro evaluation of hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composite, *Materials Science and Engineering: C*, 20(1), 101-109, **2002**.
- [34] Luklinska, Z. B., Bonfield, W., Morphology and ultrastructure of the interface between hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite implant and bone, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8(6), 379-383, **1997**.
- [35] Chen, L. J., Wang, M., Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer, *Biomaterials*, 23(13), 2631-2639, **2002**.
- [36] Doyle, C., Tanner, E. T., Bonfield, W., In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite, *Biomaterials*, 12(9), 841-847, **1991**.
- [37] Saadat, A., Behnamghader, A., Karbasi, S., Abedi, D., Soleimani, M., Shafiee, A., Comparison of acellular and cellular bioactivity of poly 3-hydroxybutyrate/hydroxyapatite nanocomposite and poly 3-hydroxybutyrate scaffolds, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(3), 587-593, **2013**.
- [38] Guzmán, D., Kirsebom, H., Solano, C., Quillaguamán, J., Hatti-Kaul, R., Preparation of hydrophilic poly (3-hydroxybutyrate) macroporous scaffolds through enzyme-mediated modifications, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 26(5), 452-463, **2011**.
- [39] Rentsch, C., Rentsch, B., Breier, A., Hofmann, A., Manthey, S., Scharnweber, D., Zwipp, H., Evaluation of the osteogenic potential and vascularization of 3D

poly (3) hydroxybutyrate scaffolds subcutaneously implanted in nude rats, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92(1), 185-195, **2010**.

- [40] Tesema, Y., Raghavan, D., Stubbs, J. I. I. I., Bone cell viability on collagen immobilized poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) membrane: Effect of surface chemistry, *Journal of Applied Polymer Science*, 93(5), 2445-2453, **2004**.
- [41] Chen, X., Zhang, X., Zhu, Y., Zhang, J., Hu, P., Surface modification of polyhydroxyalkanoates by ion implantation, Characterization and cytocompatibility improvement, *Polymer Journal*, 35(2), 148-154, **2003**.
- [42] Wu, T. P., Hu, R., Zhang, X. B., Li, W., Chen, F., Biocompatibility of modified poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid to adrenocortical cells, *Journal of Wuhan University of Technology--Materials Science Edition*, 19(2), 38-40, **2004**.
- [43] Xu, S., Luo, R., Wu, L., Xu, K., Chen, G. Q., Blending and characterizations of microbial poly (3-hydroxybutyrate) with dendrimers, *Journal of Applied Polymer Science*, 102(4), 3782-3790, **2006**.
- [44] Wang, L., Zhu, W., Wang, X., Chen, X., Chen, G. Q., Xu, K., Processability modifications of poly (3-hydroxybutyrate) by plasticizing, blending, and stabilizing, *Journal of Applied Polymer Science*, 107(1), 166-173, **2008**.
- [45] Foroughi, M. R., Karbasi, S., Ebrahimi-Kahrizangi, R., Mechanical evaluation of nHAp scaffold coated with poly-3-hydroxybutyrate for bone tissue engineering, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13(2), 1555-1562 **2013**.
- [46] El-Hadi, A., Schnabel, R., Straube, E., Müller, G., Henning, S., Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends, *Polymer Testing*, 21(6), 665-674, **2002**.
- [47] Hajiali, H., Hosseinalipour, M., Karbasi, S., Shokrgozar, M. A., The influence of bioglass nanoparticles on the biodegradation and biocompatibility of poly (3-hydroxybutyrate) scaffolds, *The International Journal of Artificial Organs*, 35(11), 1015-1024, **2012**.
- [48] Shokuhfar, T., Makradi, A., Titus, E., Cabral, G., Ahzi, S., Sousa, A. C. M., Gracio, J., Prediction of the mechanical properties of hydroxyapatite/polymethyl methacrylate/carbon nanotubes nanocomposite, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 8(8), 4279-4284, **2008**.
- [49] Avella, M., Martuscelli, E., Poly-d(-)(3-hydroxybutyrate)/poly (ethylene oxide) blends: phase diagram, thermal and crystallization behaviour, *Polymer*, 29(10), 1731-1737, **1988**.
- [50] Asran, A. S., Razghandi, K., Aggarwal, N., Michler, G. H., Groth, T., Nanofibers from blends of polyvinyl alcohol and polyhydroxy butyrate as potential scaffold material for tissue engineering of skin, *Biomacromolecules*, 11(12), 3413-3421, **2010**.

- [51] Cao, A., Asakawa, N., Yosmn, N., Inoue, Y., Phase structure and biodegradation of the bacterial poly(3-hydroxybutyric acid)/chemosynthetic poly(3-hydroxypropionic acid) blend, *Polymer Journal*, 30(9), 743-752, **1998**.
- [52] Ikejima, T., Inoue, Y., Crystallization behavior and environmental biodegradability of the blend films of poly (3-hydroxybutyric acid) with chitin and chitosan, *Carbohydrate Polymers*, 41(4), 351-356, **2000**.
- [53] Suttiwijitpukdee, N., Sato, H., Zhang, J., Hashimoto, T., Effects of intermolecular hydrogen bondings on isothermal crystallization behavior of polymer blends of cellulose acetate butyrate and poly (3-hydroxybutyrate), *Macromolecules*, 44(9), 3467-3477, **2011**.
- [54] Chan, R. T., Garvey, C. J., Marçal, H., Russell, R. A., Holden, P. J., Foster, L. J. R., Manipulation of polyhydroxybutyrate properties through blending with ethyl-cellulose for a composite biomaterial, *International Journal of Polymer Science*, 2011, **2011**.
- [55] Deng, X., Hao, J., Yuan, M., Xiong, C., Zhao, S. Miscibility, thermal behaviour, morphology and mechanical properties of binary blends of poly [(R)-3-hydroxybutyrate] with poly ( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate)+, *Polymer International*, 50(1), 37-44, **2001**.
- [56] Zhang, M., Thomas, N. L., Blending polylactic acid with polyhydroxybutyrate: the effect on thermal, mechanical, and biodegradation properties, *Advances in Polymer Technology*, 30(2), 67-79, **2011**.
- [57] Greco, P., Martuscelli, E. Crystallization and thermal behaviour of poly (d (—)-3-hydroxybutyrate)-based blends, *Polymer*, 30(8), 1475-1483, **1989**.
- [58] He, Y., Shuai, X., Cao, A., Kasuya, K. I., Inoue, Y., Enzymatic biodegradation of chemosynthetic atactic P(3HB) enhanced by an amorphous non-biodegradable polymer: blend of atactic P(3HB) with PMMA, *Macromolecular Rapid Communications*, 21(18), 1277-1281, **2000**.
- [59] Bonartsev, A. P., Yakovlev, S. G., Zharkova, I. I., Boskhomdzhev, A. P., Bagrov, D. V., Myshkina, V. L., Voinova, V. V., Cell attachment on poly (3-hydroxybutyrate)-poly (ethylene glycol) copolymer produced by azotobacter chroococcum 7B, *BMC Biochemistry*, 14(1), 12, **2013**.
- [60] Guan, J., Fujimoto, K. L., Sacks, M. S., Wagner, W. R., Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications, *Biomaterials*, 26(18), 3961-3971, **2005**.
- [61] Wang, Y., Huang, W., Ren, L., Chen, X., Ke, Y., Fabrication and characterization of a PAM modified PHBV/BG scaffold, *Chinese Science Bulletin*, 54(17), 2940-2946, **2009**.
- [62] Zhao, Q., Cheng, G., Song, C., Zeng, Y., Tao, J., Zhang, L., Crystallization behavior and biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (ethylene glycol) multiblock copolymers, *Polymer Degradation and Stability*, 91(6), 1240-1246, **2006**.

- [63] Li, Z., Yang, X., Wu, L., Chen, Z., Lin, Y., Xu, K., Chen, G. Q., Synthesis, characterization and biocompatibility of biodegradable elastomeric poly (ether-ester urethane) s based on poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) and poly (ethylene glycol) via melting polymerization, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(9), 1179-1202, **2009**.
- [64] Chiellini, E., Corti, A., Kowalczyk, M., Solaro, R., Biodegradation of poly (vinyl alcohol)/poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) graft copolymers and relevant blends, *Biorelated Polymers*, 329-340, **2001**.
- [65] Kumagai, Y., Doi, Y., Enzymatic degradation of binary blends of microbial poly (3-hydroxybutyrate) with enzymatically active polymers, *Polymer Degradation and Stability*, 37(3), 253-256, **1992**.
- [66] Ha, C. S., Cho, W. J., Miscibility, properties, and biodegradability of microbial polyester containing blends, *Progress in Polymer Science*, 27(4), 759-809, **2002**.
- [67] Santos, A. R., Ferreira, B. M., Duek, E. A., Dolder, H., Wada, R. S., Wada, M. L. F., Differentiation pattern of vero cells cultured on poly (L-lactic acid)/poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) blends, *Artificial Organs*, 28(4), 381-389, **2004**.
- [68] Cheng, G., Cai, Z., Wang, L., Biocompatibility and biodegradation of poly (hydroxybutyrate)/poly (ethylene glycol) blend films, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14(12), 1073-1078, **2003**.
- [69] Novikov, L. N., Novikova, L. N., Mosahebi, A., Wiberg, M., Terenghi, G., Kellerth, J. O., A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury, *Biomaterials*, 23(16), 3369-3376, **2002**.
- [70] Mowery, B. P., Lindner, A. H., Weisblum, B., Stahl, S. S., Gellman, S. H., Structure– activity relationships among random nylon-3 copolymers that mimic antibacterial host-defense peptides, *Journal of the American Chemical Society*, 131(28), 9735-9745, **2009**.
- [71] Liu, R., Chen, X., Hayouka, Z., Chakraborty, S., Falk, S. P., Weisblum, B., Gellman, S. H., Nylon-3 polymers with selective antifungal activity, *Journal of the American Chemical Society*, 135(14), 5270-5273, **2013**.
- [72] Liu, R., Vang, K. Z., Kreeger, P. K., Gellman, S. H., Masters, K. S., Experimental and computational analysis of cellular interactions with nylon-3-bearing substrates, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(10), 2750-2759, **2012**.
- [73] Derave, W., Özdemir, M. S., Harris, R. C., Pottier, A., Reyngoudt, H., Koppo, K., Achten, E.,  $\beta$ -Alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. *Journal of Applied Physiology*, 103(5), 1736-1743, **2007**.
- [74] Hill, C. A., Harris, R. C., Kim, H. J., Harris, B. D., Sale, C., Boobis, L. H., Wise, J. A., Influence of  $\beta$ -alanine supplementation on skeletal muscle carnosine

- concentrations and high intensity cycling capacity, *Amino Acids*, 32(2), 225-233, **2007**.
- [75] Yamamoto, F., Misumi, T., *U.S. Patent No. 5,015,707*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, **1991**.
- [76] Lee, M. R., Stahl, S. S., Gellman, S. H., Masters, K. S., Nylon-3 copolymers that generate cell-adhesive surfaces identified by library screening, *Journal of the American Chemical Society*, 131(46), 16779-16789, **2009**.
- [77] Dohm, M. T., Mowery, B. P., Czyzewski, A. M., Stahl, S. S., Gellman, S. H., Barron, A. E., Biophysical mimicry of lung surfactant protein B by random nylon-3 copolymers, *Journal of the American Chemical Society*, 132(23), 7957-7967, **2010**.
- [78] Zhang, J., Markiewicz, M. J., Mowery, B. P., Weisblum, B., Stahl, S. S., Gellman, S. H., C-terminal functionalization of nylon-3 polymers: effects of C-terminal groups on antibacterial and hemolytic activities, *Biomacromolecules*, 13(2), 323-331, **2011**.
- [79] Zhang, J., Markiewicz, M. J., Weisblum, B., Stahl, S. S., Gellman, S. H., Functionally diverse nylon-3 copolymers from readily accessible  $\beta$ -lactams, *ACS Macro Letters*, 1(6), 714-717, **2012**.
- [80] Liu, R., Masters, K. S., Gellman, S. H., Polymer chain length effects on fibroblast attachment on nylon-3-modified surfaces, *Biomacromolecules*, 13(4), 1100-1105, **2012**.
- [81] Chakraborty, S., Liu, R., Lemke, J. J., Hayouka, Z., Welch, R. A., Weisblum, B., Gellman, S. H., Effects of cyclic vs acyclic hydrophobic subunits on the chemical structure and biological properties of nylon-3 copolymers, *ACS Macro Letters*, 2(8), 753-756, **2013**.
- [82] Yamano, N., Nakayama, A., Kawasaki, N., Yamamoto, N., Aiba, S., Mechanism and characterization of polyamide 4 degradation by pseudomonas sp, *Journal of Polymers and the Environment*, 16(2), 141-146, **2008**.
- [83] Friedrich, J., Zalar, P., Mohorčič, M., Klun, U., Kržan, A., Ability of fungi to degrade synthetic polymer nylon-6, *Chemosphere*, 67(10), 2089-2095, **2007**.
- [84] Sudhakar, M., Priyadarshini, C., Doble, M., Murthy, P. S., Venkatesan, R. Marine bacteria mediated degradation of nylon 66 and 6, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60(3), 144-151, **2007**.
- [85] Deguchi, T., Kakezawa, M., Nishida, T., Nylon biodegradation by lignin-degrading fungi, *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 329-331, **1997**.
- [86] Ribeiro-Samy, S., Silva, N. A., Correlo, V. M., Fraga, J. S., Pinto, L., Teixeira-Castro, A., Salgado, A. J., Development and characterization of a PHB-HV-based 3D scaffold for a tissue engineering and cell-therapy combinatorial approach for

- spinal cord injury regeneration, *Macromolecular Bioscience*, 13(11), 1576-1592, **2013**.
- [87] Sultana, N., Wang, M., Fabrication of HA/PHBV composite scaffolds through the emulsion freezing/freeze-drying process and characterisation of the scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(7), 2555, **2008**.
- [88] Zonari, A., Cerqueira, M. T., Novikoff, S., Goes, A. M., Marques, A. P., Correlo, V. M., Reis, R. L., Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) bilayer skin tissue engineering constructs with improved epidermal rearrangement, *Macromolecular Bioscience*, 14(7), 977-990, **2014**.
- [89] 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(9), 1665-1674, **2007**.
- [90] Mavis, B., Demirtaş, T. T., Gümüşderelioǧlu, M., Gündüz, G., Çolak, Ü. Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate, *Acta Biomaterialia*, 5(8), 3098-3111, **2009**.
- [91] Arslan, A., Şimşek, M., Aldemir, S. D., Kazaroǧlu, N. M., Gümüşderelioǧlu, M., Honey-based PET or PET/chitosan fibrous wound dressings: effect of honey on electrospinning process, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25(10), 999-1012, **2014**.
- [92] Beşkardeş, I. G., Demirtaş, T. T., Durukan, M. D., Gümüşderelioǧlu, M., Microwave-assisted fabrication of chitosan–hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(11), 1233-1246, **2015**.
- [93] Gümüşderelioǧlu, M., Tunçay, E. Ö., Kaynak, G., Demirtaş, T. T., Aydın, S. T., Hakkı, S. S., Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31, 120-128, **2015**.
- [94] Poli(3-hidroksibutirat)/poli-β-alanin ve türevlerinin ikili karışımları: yeni doku iskelesi malzemeleri, 114Z039 no’lu TÜBİTAK projesi, **2016**.
- [95] Ramakrishna, S, An introduction to electrospinning and nanofibers, *World Scientific*, **2005**.
- [96] Gerçek, I., Tıǧlı, R. S., Gümüşderelioǧlu, M., A novel scaffold based on formation and agglomeration of PCL microbeads by freeze-drying, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 86(4), 1012-1022, **2008**.
- [97] Arıcıoǧlu, M. K., Mert, B., Soydan, Y., Polimer malzemelerin mekanik analiz yöntemleri, *SAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1-2), 51-58, **2000**.
- [98] Hong, S., Kim, G., Fabrication of size-controlled three-dimensional structures consisting of electrohydrodynamically produced polycaprolactone

micro/nanofibers, *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 103(4), 1009-1014, **2011**.

- [99] Betz, M.W., Yoon, D.M., Fisher, J.P., Engineering polymeric scaffolds for bone grafts, in engineering of functional skeletal tissues, (eds: Bronner F., Farach-Carson M.C., Mikos A.G., 2007), Springer London, London, 81-94, **2007**.
- [100] Özgür, H., Gemici, Z., Bayındır, M., Akıllı Nano Yüzeyler, *Bilim ve Teknik*, 52-56, Nisan, **2007**.
- [101] Masaeli, E., Wieringa, P. A., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M. H., Sadri, S., van Blitterswijk, C. A., Moroni, L., Peptide functionalized polyhydroxyalkanoate nanofibrous scaffolds enhance schwann cells activity, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(7), 1559-1569, **2014**.
- [102] Nisbet, D. R., Forsythe, J. S., Shen, W., Finkelstein, D. I., Horne, M. K., Review paper: a review of the cellular response on electrospun nanofibers for tissue engineering, *Journal of Biomaterials Applications*, 24(1), 7-29, **2009**.
- [103] Kadler, K. E., Holmes, D. F., Trotter, J. A., Chapman, J. A., Collagen fibril formation. *Biochemical Journal*, 316(1), 1-11, **1996**.



# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

**Adı Soyadı :** Elvan KONUK

**Doğum Yeri :** Çankaya/ANKARA

**Medeni Hali :** Bekar

**E-posta :** elvankonuk2368@gmail.com

**Adresi :** Seyranbağları Mah., Seyran Caddesi, Oba Apt., 5/11, Çankaya/ANKARA

## Eğitim

- **Lise :** Bahçelievler Anadolu Lisesi
- **Lisans :** Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü
- **Yüksek Lisans :** Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı
- **Doktora :** -

## Yabancı Dil Düzeyi

- İngilizce : YDS – 81.25/100

## İş Deneyimi

-

## Deneyim Alanları

- Nanoteknoloji, nanotıp, biyomalzemeler, polimer bilimi, malzeme karakterizasyon yöntemleri, elektroçirme, doku mühendisliği.

## Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

## Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

## Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Çatıker, E., Konuk, E., Gültan, T., GÜMÜŞDERELİOĞLU, M., *Binary Blends of Poly(3 hydroxybutyrate)/Poly( $\beta$ -alanine) and Its Derivatives: New Tissue Scaffold Materials, International Conference on Advances in functional Materials 2016*, Güney Kore, 8-11 Ağustos 2016, (Sözlü Sunum).



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

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 19/06/2017

Tez Başlığı / Konusu: P3HB ve PBA Polimerleri İkili Karışımlarının Doku İskelesi Olarak Değerlendirilmesi  
Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 84 sayfalık kısmına ilişkin, 19/06/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6 'dır.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

19.06.2017

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Elvan KONUK

Öğrenci No: N14328151

Anabilim Dalı: Nanoteknoloji ve Nanotıp

Programı: Tezli Yüksek Lisans

Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Menemşe Gümüçderehoğlu

(Unvan, Ad Soyad, İmza)