

**HACİMSEL İSKELET KASI HASARLARI İÇİN POLİMER
BAZLI DESTEK MALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF POLYMER BASED SUPPORT
MATERIALS FOR VOLUMETRIC SKELETAL MUSCLE
DAMAGE**

BERK BAŞTÜRKMEN

DOÇ. DR. EDA AYŞE AKSOY

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Polimer Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

Tek başına dünyamı var eden annem, Asuman KARA'ya

ÖZET

HACİMSEL İSKELET KASI HASARLARI İÇİN POLİMER BAZLI DESTEK MALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ

Berk BAŞTÜRKMEN

Yüksek Lisans, Polimer Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Eda Ayşe AKSOY

Haziran 2020, 106 sayfa

Önemli bir sosyal ve ekonomik yükü oluşturan hacimsel kas kayıpları her yıl milyonlarca insanı kazalar, savaşlar ve tümör operasyonları sebepleri ile etkilemektedir. İskelet kası yapısı doğal onarım mekanizmasına sahip olmasına rağmen, kritik seviyenin üzerindeki kayıplarda kendi kendine iyileşmeyi sağlayamamaktadır. Bu durum ciddi oranda fonksiyonel hasarlar ve estetik eksikliklerle sebep olmaktadır. İskelet kası doku mühendisliği yaklaşımlarında hacimsel kas kaybını desteklemek ve hücrel davranışları yönlendirmek için fonksiyonel doku iskelesi tasarımlarına odaklanılmıştır.

Bu tez çalışmasında, hacimsel iskelet kası hasarları için polimer bazlı destek malzemelerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için doğal kas dokusunu taklit edebilmek amacıyla hizalanmış, hücrel gelişimi ve yönelimi destekleyecek seviyede elektriksel aktiviteye sahip poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) bazlı fiber iskeleler hazırlanmıştır. Fiber iskelelerin üretimi için bilgisayar destekli

Döngüsel Islak Eğirme Düzeneği (DIED) geliştirilmiştir. İletken özelliğe sahip gümüş nanoteller (AgNT) ile katkılanmış PCL-AgNT kompozit fiberler yüksek verim ile üretilmiştir. DIED üretim parametrelerinin; PCL molekül ağırlığı, çözücü sistemi, çöktürme banyosu sıcaklığı, PCL ve AgNT derişimleri vb. optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Fiberlerin kimyasal, morfolojik, ısıl özellikleri ve biyobozunma davranışları karakterize edilmiştir. C2C12 fare myoblast iskelet kası hücrelerinin elektriksel uyarım altında ve elektriksel uyarım uygulanmadan PCL ve PCL-AgNT kompozit fiber iskeleler üzerindeki çoğalma davranışları ve morfolojileri incelenmiştir. Hücre kültür çalışmalarının 7. gününde, 1.5 V ile 3 V elektriksel uyarım gerilimi altında PCL-AgNT kompozit fiber iskele yüzeylerinde PCL fiberler göre daha fazla hücre çoğalması ve canlılığı gözlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında DIED ile antibakteriyel özelliğe sahip kompozit fiber formülasyonları geliştirilmiştir. Antibakteriyel ilaç etken madde sülfatiazol - AgNT kompleksi hazırlanmış ve kompozit fiber üretimi DIED ile gerçekleştirilmiştir. Sülfatiazol - AgNT yüklü fiberlerin antibakteriyel özellikleri disk difüzyon testi ile 4 farklı bakteri türü için incelenmiş, yüksek başarı elde edilen bakteri türleri ile erken aşama bakteriyel tutunma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, PCL-AgNT kompozit fiberler ve antibakteriyel formları iskelet kası doku destek malzemeleri adayı olarak başarılı ve umut vaat edici özellikler sunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Poli(ϵ -kaprolakton), Gümüş Nanotel, Islak eğirme, Kompozit Fiber, İskelet Kası Doku Mühendisliği, Antibakteriyel.

ABSTRACT

Development of Polymer Based Support Materials for Volumetric Skeletal Muscle Damage

Berk BAŞTÜRKMEN

Master of Science, Department of Polymer Science and Technology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Eda Ayşe AKSOY

June 2020, 106 pages

Volumetric muscle losses, which constitute an important social and economic burden, affect millions of people every year due to accidents, wars and tumor operations. Although skeletal muscle structure has a natural repair mechanism, it cannot provide self-healing in losses above critical level. This causes serious functional damage and aesthetic deficiencies. Skeletal muscle tissue engineering approaches have focused on functional tissue scaffolding designs to support volumetric muscle loss and guide cellular behavior.

In this thesis, it is aimed to develop polymer based support materials for volumetric skeletal muscle injuries. For this purpose, poly(ϵ -caprolactone) (PCL) based aligned fiber scaffolds were prepared in order to mimic natural muscle

tissue and provide an electrical activity for cellular development and orientation. A computer-aided Rotational Wet Spinning System (DIED) was developed for fiber production. Silver nanowire (AgNT) containing PCL-AgNT composite fiber scaffolds were produced with high yield. The optimization of DIED production parameters were carried in terms of PCL molecular weight, solvent system, precipitation bath temperature, PCL and AgNT concentrations etc. The chemical, morphological, thermal properties and biodegradation profiles of fibers were characterized. The proliferation behavior and morphology of C2C12 mouse myoblast skeletal muscle cells were investigated on PCL and PCL-AgNT composite fibers scaffolds under electrical stimulation and without electrical stimulation. On the 7th day of cell culture studies, higher cell proliferation and viability were observed on PCL-AgNT composite fiber surfaces compared to PCL fibers under 1.5 V and 3 V electrical stimulation.

Within the scope of the thesis, composite fiber formulations with antibacterial properties were also developed with DIED. Antibacterial drug active agent sulfatiazole - AgNT complex was prepared and composite fiber production was carried out with DIED. Antibacterial properties of Sulfatiazole - AgNT loaded fibers were examined for 4 different bacteria types by disk diffusion test, and early stage bacterial adhesion studies were carried out with high success bacteria types.

As a result, PCL-AgNT composite fibers and their antibacterial forms provided successful and promising properties as candidates for skeletal muscle tissue support materials.

Keywords: Poly(ϵ -caprolactone), Silver Nanowire, Wet Spinning, Composite Fiber, Skeletal Muscle Tissue Engineering, Antibacterial.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince beni yönlendiren, değerli bilgi birikimi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, farklı üniversite disiplinlerini tecrübe edebilmem için çabalayan, akademik ve sosyal ilişkilerin de kendisinde çok şey öğrendiğim değerli danışman hocam Doç. Dr. Eda Ayşe AKSOY'a,

Bilgisi, tecrübesi, anlayışı ile her zaman bana desteğini hissettiren için saygıdeğer hocam Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM'a, polimer biliminde ilerlememe fırsat veren tecrübesini ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Murat ŞEN'e,

Sağladığı imkanlar ile sentez ve analiz çalışmalarımı titizlik ile gerçekleştirmeme olanak sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Emrah ÜNALAN'a, hücre kültürü çalışmalarımın planlanması ve gerçekleştirilmesinde laboratuvarını açan, bilgi, tecrübe ve altyapı desteği yaratan hocam Doç. Dr. Pınar YILGÖR HURİ'ye, ilaç etken madde ile antibakteriyel çalışmalarımındaki destekleri için hocalarım Doç. Dr. Miyase Gözde GÜNDÜZ'e ve Dr. Öğr. Üyesi Ceren ÖZKUL'a

Araştırma zamanlarını ayırarak bana tecrübeleri destek olan Doğa DOĞANAY'a ve Merve Nur GÜVEN'e, hücre kültür deney ve analizlerimde bana eşlik eden ve birikimini paylaşan Emre ERGENE'ye, yorumları ile katkıda bulunan Abdullah EYİDOĞAN, Şeyda GÖKYER ve Ebru TALAK'a, destekleri ve güzel anılarımız için Dr. Semih ÇALAMAK, Dr. Merve GÜLTEKİNOĞLU, Şükrü ÖZTÜRK, Minela ASLAN, Halime SERİNÇAY ve Burak İPEK 'e

Lisans eğitimimden bu yana çok değerli arkadaşlığının yanı sıra fikir ve düşüncelerini her koşulda benimle paylaşan arkadaşım Gürkan TIRYAKI'ye

Deney düzeneğini oluşturmamda değerli bilgi birikimini ve zamanını benimle paylaşan arkadaşım Burak ALTUNTAŞ'a ve sağladığı elektronik malzeme desteğinden ötürü Edel Krone şirketine, değerli yorumları için saygıdeğer hocam Prof. Dr. Zeki ALKAN'a

Her koşulda bana sonsuz destek sağlayan canım aileme,

Gönülden teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER.....	x
ÇİZELGELER.....	i
SİMGELER VE KISALTMALAR	ii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. İskelet Kası Yapısı ve Organizasyonu	2
2.2. Hacimsel İskelet Kası Hasarları ve Klinik Yaklaşımlar	3
2.3. İskelet Kası Doku Mühendisliği Yaklaşımı	4
2.4. Myofiber Gelişimi için Kritik Biyokimyasal ve Biyofiziksel İpuçları	5
2.5. İskelet Kası için Rejeneratif, Biyobozunur Destek Malzemeleri	6
2.5.1. Doğal Polimerler.....	7
2.5.2. Sentetik Polimerler	8
2.5.3. Kompozit Malzemeler.....	10
2.6. Fiber Üretim Teknikleri.....	11
2.6.1. Elektro-eğirme Tekniği	11
2.6.2. Islak-eğirme Tekniği	12
2.7. PCL Fiber Bazlı İskelet Kası Doku Mühendisliği Malzemeleri Üzerine Literatür Taraması	13
2.8. Poli(ε-kaprolakton)	15
2.9. Gümüş Nanoteller.....	19
2.10. İlaç Etken Madde	20
2.11. Tezin Çalışmasının Amacı ve Hedefi.....	22
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	24
3.1. Materyal.....	24

3.1.1. Kimyasal Malzemeler	24
3.1.2. Elektronik Malzemeler	25
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Döngüsel Islak Eğirme Düzeneği.....	25
3.2.2. Gümüş Nanotellerin Eldesi	27
3.2.3. İskelet Kası Doku Destek Malzemelerinin Hazırlanması	28
3.2.3.1. DIED ile PCL Fiberlerin Hazırlanması	28
3.2.3.2. DIED ile PCL-AgNT Fiberlerin Hazırlanması.....	29
3.2.4. Antibakteriyel Özellikte Fiberlerin Hazırlanması	30
3.2.4.1. DIED ile Sülfatiazol Yüklü PCL Fiberlerin Hazırlanması.....	30
3.2.4.2. DIED ile Sülfatiazol - Gümüş Nano Tel Yüklü PCL Fiberlerin Hazırlanması.....	30
3.3. Karakterizasyon Yöntemleri	31
3.3.1. Morfolojik Karakterizasyonlar	31
3.3.2. Kimyasal Karakterizasyonlar	31
3.3.3. Termal Karakterizasyon.....	32
3.3.3.1. Termogravimetrik Analiz	32
3.3.3.2. Simultane Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi	32
3.4. Biyobozunma Çalışmaları	32
3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	33
3.5.1. Hücre Kültürü Elektriksel Uyarım Çalışmaları.....	34
3.5.2. Hücre Canlılık Testi (alamarBlue®).....	35
3.5.3. Hücrelerdeki Morfolojik Değişimlerin İncelenmesi	35
3.5.3.1. Canlı-Ölü Boyaması	35
3.5.3.2. Hücre Morfolojilerinin Taramalı Elektron Mikroskobu İncelenmesi.....	36
3.6. Mikrobiyoloji Çalışmaları	37
3.6.1. Disk Difüzyon Testi.....	37
3.6.2. Bakteriyel Tutunma Testi.....	37
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	39
4.1. Döngüsel Islak Eğirme Düzeneği ile Fiber Üretim Optimizasyonu	39
4.1.1. PCL Molekül Ağırlığının Optimizasyonu	39
4.1.2. Çözücü Sistem Optimizasyonu.....	42

4.1.3. Çöktürme Banyosu Sıcaklığı Optimizasyonu	43
4.1.4. Polimer Derişim Optimizasyonu	44
4.1.5. Kompozit Fiberlerde Gümüş Nanotel Miktarı Optimizasyonu	45
4.2. Gümüş Nanotellerin Karakterizasyon Bulguları	47
4.3. İskelet Kas İskelelerinin Karakterizasyon Sonuçları	48
4.3.1. Morfolojik Özellikler	48
4.3.2. Kimyasal Özellikler	49
4.3.3. Termal Özellikler	51
4.3.4. Biyobozunma Davranışları	55
4.3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçlar ve Değerlendirme	57
4.3.5.1. Alamar Mavisi Boyama ile Hücre Canlılığı Tayini Sonuçları	58
4.3.5.2. Canlı-Ölü Boyama, Konfokal Mikroskop Görüntüleri	59
4.3.5.3. Hücre Morfolojilerin SEM ile İncelenmesi	63
4.4. Sülfatiazol - AgNT Yüklü Fiberlere ait Karakterizasyon Sonuçları	69
4.4.1. Sülfatiazol - AgNT Kompleksinin Kimyasal ve Morfolojik Özellikleri	72
4.4.2. Sülfatiazol - AgNT Yüklü Fiberlerin Morfolojik Özellikleri	74
4.4.3. Sülfatiazol - AgNT Yüklü Filmlerin Kimyasal Özellikleri	77
4.4.4. Sülfatiazol - AgNT Yüklü Filmlerin Termal Özellikleri	80
4.4.5. Sülfatiazol - AgNT Yüklü Fiberlerin Biyobozunma Davranışları	85
4.4.6. Sülfatiazol - AgNT Yüklü Fiber ve Filmlerin Antibakteriyel Etkinlikleri	87
4.4.6.1 Disk Difüzyon Testi Sonuçları	87
4.4.6.2. Bakteriyel Tutunma Testi Sonuçları	92
5. TOPLU SONUÇLAR	97
6. KAYNAKLAR	100
EKLER	107
EK 1 - Tezden Türetilmiş Bildiriler	107
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	108
ÖZGEÇMİŞ	109

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. İskelet kas dokusu yapısının şematik görünümü [9].	3
Şekil 2.2. Doğal iskelet kası rejenerasyonunun şematik görünümü [9].	4
Şekil 2.3. İskelet kası doku mühendisliği yaklaşımlarına genel bakış.	5
Şekil 2.4. Temel elektro-eğirme düzeneği şematik gösterimi [27].	12
Şekil 2.5. (a) Klasik ıslak-eğirme tekniği ve (b) modifiye edilmiş ıslak-eğirme tekniği uygulamalarının şematik gösterimi [30].	13
Şekil 2.6. PCL bazlı sistemler: nanoküreler (a,b), nanofiberler (c,d), köpükler (e,f), örülü yapılar (g,h,i), üç boyutlu basım modelleri (j-u).	16
Şekil 2.7. Poli(ϵ -kaprolakton) kimyasal yapısı.	17
Şekil 2.8. PCL bozunmasını etkileyen çevresel ve diğer faktörler [53].	18
Şekil 2.9. Nanotellerin SEM görüntüleri (a). Nanoteller için XRD paterni (b). Nanotellerin düşük (c) ve yüksek (d) çözünürlüklü TEM görüntüleri [59].	20
Şekil 2.10. Sülfonamid grubu ilaçların kimyasal yapısı.	21
Şekil 2.11. Gümüş sülfadiazin kompleksinin kimyasal yapısı.	22
Şekil 2.12. Gümüş sülfatiazol kompleksinin kimyasal yapısı.	22
Şekil 3.1. DIED düzeneği haberleşme protokolü.	26
Şekil 3.2. DIED düzeneği fotoğraf görüntüsü.	27
Şekil 3.3. Aseton içerisinde çözülmüş PCL ve PCL-AgNT çözeltileri.	29
Şekil 3.4. Bilgisayar kontrollü DIED ile fiber üretimine ait şematik gösterim.	30
Şekil 3.5. Teflon çerçevelere sarılmış PCL ve PCL-AgNT fiber görüntüleri.	33
Şekil 3.6. Hücre ekimi öncesi (a) ve sonrası (b) numuneler.	34
Şekil 3.7. Hücre kültürü elektriksel uyarım düzeneği şematik gösterimi.	35
Şekil 3.8. SEM analizi için hazırlanan yüzeyi altın kaplanmış hücreli örnekler.	36
Şekil 4.1. Düşük molekül ağırlıklara sahip parçalanmış PCL fiber yapıları görüntüsü. (a) PCL10kDa, (b) PCL60kDa	39
Şekil 4.2. PCL10kDa ve PCL60kDa parçalanmış fiber yapılarına ait SEM görüntüleri. (a) PCL10kDa 5000x büyütme, (b) PCL10kDa 1000x büyütme, (c) PCL60kDa 10.000x büyütme, (d) PCL60kDa 1000x büyütme.	40
Şekil 4.3. Yüksek molekül ağırlıkta fiziksel bütünlüğe sahip, PCL80kDa fiber iskele görüntüsü.	41

Şekil 4.4. PCL80kDa fiber yüzeyine ait SEM görüntüleri. (a) PCL80kDa 5000x büyütme, (b) PCL80kDa 1000x büyütme. (c) PCL80kDa 100x büyütme. .	42
Şekil 4.5. Çözücü sisteminin fiber oluşumuna etkisi. (a) PCL-kloroform çözeltisi ile 4°C'de etanol çöktürme banyosu. (b) PCL-aseton çözeltisi ile 4°C'de etanol çöktürme banyosu.....	43
Şekil 4.6. Çöktürme banyosu sıcaklığının fiber oluşumuna etkisi. (a) 24 °C (b) 4 °C (c) -18 °C.....	43
Şekil 4.7. Besleme çözeltisi polimer derişiminin fiber üretimine etkisi. (a) PCL80kDa-10 (b) PCL80kDa-15 (c) PCL80kDa-20.....	44
Şekil 4.8. PCL80kDa-20 çözeltisinde, polimere oranla AgNT derişiminin artması ile fiber üretiminde gerçekleşen değişim. (a) %0 (w/w) AgNT, (b) %0.5 (w/w) AgNT, (c) %2 (w/w) AgNT ve (d) %5 (w/w) AgNT.	45
Şekil 4.9. Farklı AgNT derişimlerinde hazırlanan PCL filmlere ait görüntü. (a) %0 (w/w) AgNT, (b) %0.5 (w/w) AgNT, (c) %1 (w/w) AgNT , ve (d) %2 (w/w) AgNT.	45
Şekil 4.10. PCL ve PCL-AgNT kompozit fiberlerin yatay ve dikey görüntüleri. (a, b) PCL80kDa-20, (c, d) PCL80kDa-20-AgNT-2	46
Şekil 4.11. AgNT SEM görüntüleri ve çap- boy yüzde dağılımları. (a) 40000 büyütme, (b) 300000 büyütme, (c, d) AgNT çap - boy % dağılımı.	47
Şekil 4.12. Fiber yüzeylerinin SEM görüntüleri (a) PCL fiber (b) %0.5 (w/w) AgNT-PCL fiber yüzeyi. (c) %1 (w/w) AgNT-PCL fiber yüzeyi. (d) %2 (w/w) AgNT-PCL fiber yüzeyi. Tüm görüntüler x10.000 büyütme ile alınmıştır...	48
Şekil 4.13. %2 (w/w) AgNT-PCL fiber yüzeyi (a) SEM görüntüsü (x5000 büyütme) (b) EDX analizi sonucu.....	49
Şekil 4.14. PCL ve PCL-AgNT filmlere ait FTIR Spektrumları.	50
Şekil 4.15. PCL-AgNT, PVP kaynaklı C=O gerilimine ait FTIR spektrumları. ..	51
Şekil 4.16. PCL filmine ait TGA termogramı.	52
Şekil 4.17. PCL filmine ait DSC termogramı.....	53
Şekil 4.18. PCL-AgNT filmine ait TGA termogramı.....	54
Şekil 4.19. PCL-AgNT filmine ait DSC termogramı.....	54
Şekil 4.20. Film ve Fiber numunelerin, PBS ve PBS-Lipaz çözeltisi ortamlarındaki bozunma profilleri. (a) Film numuneler, (b) Fiber numuneler.	56

- Şekil 4.21.** 21 günlük PBS içerisinde lipaz varlığında bozunmadan sonraki SEM görüntüleri. (a) PCL ve (b) PCL-AgNT. Her iki görüntü de x5000 ve x20000 yakınlaşmalar ile alınmıştır. 57
- Şekil 4.22.** Elektriksel uyarım olmaksızın, fiber iskeleler yüzeyindeki canlı hücre sayısının, Alamar mavisi hücre canlılığı testi ile belirlenmesi (*P < 0.05). . 58
- Şekil 4.23.** Elektriksel uyarım altında, fiber iskeleler yüzeyindeki canlı hücre sayısının, Alamar mavisi hücre canlılığı testi ile belirlenmesi (*P < 0.05). . 59
- Şekil 4.24** Elektriksel uyarım olmadan PCL ve PCL-AgNT fiberlerden alınan konfokal mikroskop görüntüleri. (a) PCL 5x büyütme (b), PCL 10x büyütme, (c) PCL-AgNT 5x büyütme ve (d) PCL-AgNT 10x büyütme. (7. Gün, canlı hücreler yeşil renk ile belirlenmektedir.) 60
- Şekil 4.25.** Elektriksel uyarımın; 3V gerilim, 1 Hz frekans ve 1 ms sinyal genişliği değerlerinde uygulanmasıyla PCL ve PCL-AgNT fiberlerden alınan konfokal mikroskop görüntüleri. (a) PCL 5x büyütme, (b) PCL 10x büyütme, (c) PCL-AgNT 5x büyütme ve (d) PCL-AgNT 10x büyütme. (7. Gün, canlı hücreler yeşil renk ile belirlenmektedir.) 61
- Şekil 4.26.** Elektriksel uyarımın; 1.5 V gerilim, 1 Hz frekans ve 1 ms sinyal genişliği değerlerinde uygulanmasıyla PCL ve PCL-AgNT fiberlerden alınan konfokal mikroskop görüntüleri. (a) PCL 5x büyütme, (b) PCL 10x büyütme, (c) PCL-AgNT 5x büyütme ve (d) PCL-AgNT 10x büyütme. (7. Gün, canlı hücreler yeşil renk ile belirlenmektedir.) 62
- Şekil 4.27.** Elektriksel uyarım uygulanmadan, PCL-AgNT kompozit fiberler ile gerçekleştirilen 7 günlük hücre kültürü çalışması sonunda fiber yüzeyleri SEM görüntüleri. (a) 5000x büyütme, (b) 2000x büyütme, (c) 1000x büyütme. Aynı fiberlerin farklı bölgesinden alınmış görüntüler; (d) 5000x büyütme, (e) 2000x büyütme ve (f) 1000x büyütme. 63
- Şekil 4.28.** Elektriksel uyarım uygulanmadan, PCL fiberler ile gerçekleştirilen 7 günlük hücre kültürü çalışması sonunda fiber yüzeyleri SEM görüntüleri. (a) 5000x büyütme, (b) 2000x büyütme ve (c) 1000x büyütme. 64
- Şekil 4.29.** Hücre kültürü çalışmaları sonunda, 3V elektriksel uyarım uygulanmış PCL-AgNT kompozit fiber yüzeyleri SEM görüntüleri. (a) 5000x büyütme, (b) 2000x büyütme, (c) 1000x büyütme. Aynı fiberlerin farklı

bölgesinden alınmış görüntüler; (d) 5000x büyütme, (e) 2000x büyütme ve (f) 1000x büyütme.	64
Şekil 4.30. Hücre kültürü çalışmaları sonunda, 3V elektriksel uyarım gerçekleştirilmiş, PCL fiber yüzeyleri SEM görüntüleri. (a) 5000x büyütme, (b) 2000x büyütme ve (c) 1000x büyütme.....	65
Şekil 4.31. Hücre kültürü çalışmaları sonunda, 1.5 V elektriksel uyarım uygulanmış PCL-AgNT kompozit fiber yüzeyleri SEM görüntüleri. (a) 5000x büyütme, (b) 2000x büyütme, (c) 1000x büyütme. Aynı fiberlerin farklı bölgesinden alınmış görüntüler; (d) 5000x büyütme, (e) 2000x büyütme ve (f) 1000x büyütme.	65
Şekil 4.32. Hücre kültürü çalışmaları sonunda, 1.5 V elektriksel uyarım gerçekleştirilmiş, PCL fiber yüzeyleri SEM görüntüleri. (a) 5000x büyütme, (b) 2000x büyütme ve (c) 1000x büyütme.....	66
Şekil 4.33. PCL ve PCL-AgNT fiber iskeleler yüzeyinden, hücre çalışmalarının 7. gününde alınmış konfokal ve SEM görüntüleri. (Tüm SEM görüntüleri x2000 büyütme ile alınmıştır.).....	67
Şekil 4.34. Gümüş sülfadiyazın kimyasal yapısı.	70
Şekil 4.35. PCL-ST ve PCL-ST-AgNT kompozit fiberlerin yatay ve dikey görüntüleri. (a, b) PCL-ST, (c, d) PCL-ST-AgNT.....	71
Şekil 4.36. ST-AgNT kompleksi (a) Etanol içerisinde dağınık halde bulunan AgNT dispersiyonu ve (b) ST karıştırıldıktan sonra etanol ile oluşan faz ayrımı görüntüleri.	72
Şekil 4.37. (a) Gümüş ST ve (b) AgNT yapısında bulunan PVP kimyasal yapısı gösterimi.	72
Şekil 4.38. AgNT-ST yapısına ait FTIR spektrumu.	73
Şekil 4.39. (a) AgNT'lerden (x 40000 büyütme) ve (b), (c) AgNT-ST karışımından alınan SEM görüntüleri (x120000 büyütme).	74
Şekil 4.40. PCL-ST fiberlerin SEM görüntüleri. Tek fiber için, (a) 5000x büyütme, (b) 2500x büyütme, (c) 1300x büyütme. Fiberler demeti için, (d) 600x büyütme, (c) 300x büyütme ve (d) 150x büyütme.	75
Şekil 4.41. PCL-ST-AgNT fiberlerin SEM görüntüleri. Tek fiber için, (a) 5000x büyütme, (b) 2500x büyütme, (c) 1300x büyütme. Fiber demeti için, (d) 600x büyütme, (c) 300x büyütme ve (d) 150x büyütme.	76

Şekil 4.42. ST molekül yapısı gösterimi.	77
Şekil 4.43. ST ilaç etken maddesine ait FTIR spektrumu.....	78
Şekil 4.44. PCL-ST ve PCL-ST-AgNT numunelere ait FTIR spektrumu.	78
Şekil 4.45. ST ilaç etken maddesine ait TGA termogramı.....	80
Şekil 4.46. ST ilaç etken maddesine ait DSC termogramı.	81
Şekil 4.47. PCL-ST filmine ait TGA termogramı.....	82
Şekil 4.48. PCL-ST filmine ait DSC termogramı.....	82
Şekil 4.49. PCL-ST-AgNT filmine ait TGA termogramı.	83
Şekil 4.50. PCL-ST-AgNT filmine ait DSC termogramı.	84
Şekil 4.51. PCL-ST fiber yüzeyinden alınan SEM görüntüsü. (x5000 ve şekil içi x40000 büyütme).....	85
Şekil 4.52. Fiber numunelerin lipaz varlığında PBS çözeltisi ortamlarındaki biyobozunma profilleri.....	86
Şekil 4.53. Fiberlerin, 16 gün PBS içerisinde lipaz varlığında bozunmaları sonrasındaki SEM görüntüleri. (a) PCL-ST ve (b) PCL-ST-AgNT (Görüntüler x2500 ve görüntü içi x20000 büyütme ile alınmıştır.)	87
Şekil 4.54. Sülfonamidlerin antibakteriyel aktivite mekanizmasının şematik gösterimi.....	89
Şekil 4.55. Sülfityazolun antibakteriyel aktivite mekanizması.....	89
Şekil 4.56. Disk Difüzyon testi sonucu örneklere ait inhibisyon zonları. (a,b) <i>E. coli</i> ATCC 25922, (c,d) <i>S. aureus</i> ATCC 29213, (e,f) MRSA ATCC 43300, (g,h) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	91
Şekil 4.57. Fiber gruplarının yüzeylerine tutunan canlı bakteri sayıları (*P<0.05).	92
Şekil 4.58. PCL, PCL-AgNT, PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiber yüzeylerinde <i>S. aureus</i> tutunması SEM görüntüleri. (Büyütme 20000x ve 10000x)	94
Şekil 4.59. PCL, PCL-AgNT,PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiber yüzeylerinde <i>E. coli</i> tutunması SEM görüntüleri. (Büyütme 20000x ve 10000x).....	95

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilen iskele materyalleri ve formları [19].....	7
Çizelge 2.2. Yaygın olarak kullanılan doğal polimerler, kaynakları ve fonksiyonları.....	8
Çizelge 2.3. Doku mühendisliğinde sık kullanılan biyobozunur poliestерler ve temel biyobozunma özellikleri.	10
Çizelge 3.1. PCL molekül ağırlığı ve çözelti derişimi optimizasyonu oranları ..	28
Çizelge 3.2. Hücre kültür çalışmaları deneysel gruplar.....	34
Çizelge 4.1. Numune adı, kompozisyon derişimi ve üretim verimi değerleri. ...	47
Çizelge 4.2. PCL ve PCL-AgNT numunelerin FTIR spektrumlarından elde edilen bant konumları ve literatürdeki karşılıkları.	50
Çizelge 4.3. DSC termogramlarından elde edilen ısı geçişler.....	55
Çizelge 4.4. Numune adı, kompozisyon derişimi ve üretim verimi değerleri. ...	71
Çizelge 4.5. AgNT-ST numunesinin FTIR spektrumundan elde edilen konumlar ve literatürdeki karşılıkları.	73
Çizelge 4.6. PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiber çap değerleri istatistiksel analizi....	76
Çizelge 4.7. ST, PCL-ST ve PCL-ST-AgNT numunelerin FTIR spektrumlarından elde edilen bant konumları ve literatürdeki karşılıkları ..	79
Çizelge 4.8. Disk difüzyon testi sonucunda malzemelerin belirli bakteri türleri üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları.	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

T_m	Erime sıcaklığı
T_d	Termal bozunma sıcaklığı
M_n	Sayıca ortalama molekül ağırlığı

Kısaltmalar

ECM	Hücre Dışı Matriks
VML	Hacimsel İskelet Kası Kaybı
TE	Doku Mühendisliği
3D	Üç Boyutlu
PLA	Poli(laktik asit)
PGA	Poli(glikolik asit)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PCL	Poli(ϵ -kaprolakton)
hSkMCs	İnsan İskelet Kası Hücreleri
PANI	Polianilin
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
AgNT	Gümüş Nanotel
PVP	Poli(vinil piroolidon)
PPy	Polipirol
EG	Etilen Glikol
ST	Sülfatiazol
ATCC	Amerika Tipi Kültür Koleksiyonu
MRSA	Metisile dirençli Staphylococcus aureus
TSA	Tryptic Soy Agar

MHA	Mueller Hinton Agar
FBS	Fetal Sığır Serumu
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
EthD-1	Ethidium Homodimer-1
DIED	Döngüsel Islak Eğirme Düzeneği
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi
TGA	Termogravimetrik Analizör
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
EDX	Enerji Yayılımlı X-Işını

1. GİRİŞ

İskelet kasları, vücut ağırlığının yaklaşık %40'ını oluşturmakta olup, uzuvlarda kontrolü, hareketi, solunumu veya karın bölgesindeki iç organların korunması gibi işlevlere sahiptir. Kaza ve savaş sonucu yaralanmalar, tümör eksizyonları veya kas erimesi durumları, hacimsel kas kaybına sebep olabilmektedir. İskelet kası dokusu doğal onarım potansiyeline sahiptir ancak kritik hacimden (%20 ve üzerinde oluşan kas hasarı) daha yüksek seviyede oluşan kas hasarlarında normal fizyolojik süreçler ile iyileşme görülmez. Kritik seviyede kas kayıplarında, fonksiyon kaybını önlemek için cerrahi müdahale gerekmektedir. Hacimsel kas kayıplarında uygulanan rutin klinik tedavi yöntemi, sağlıklı kas dokusunun otogreftidir. Ancak, donör doku kıtlığı, verici bölgede fonksiyon kaybı ve greft kaynağı olan sağlıklı dokuda hastalık oluşması, cerrahi nakil operasyonları için önemli derecede sınırlamalar oluşturmaktadır. Hacimsel kas kayıplarınınin tedavi edilmesine yönelik doku mühendisliği yaklaşımları, mevcut cerrahi yöntemlere göre birçok potansiyel avantaja sahiptirler [1].

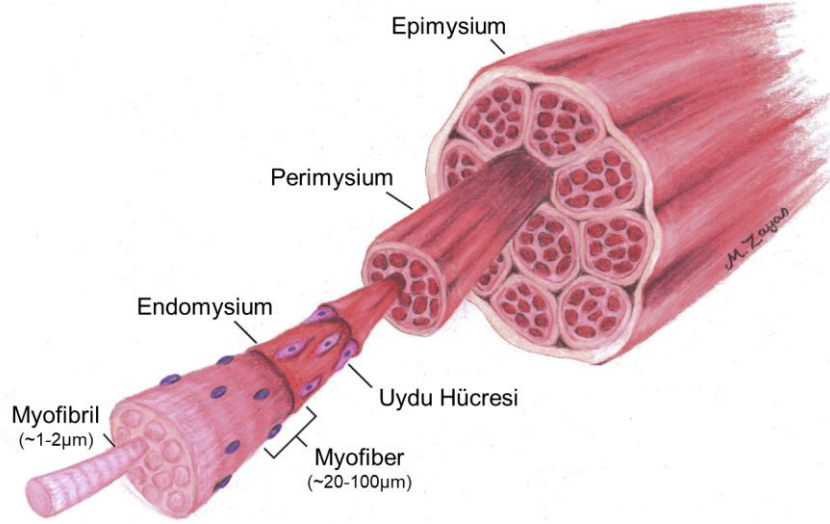
Biyomalzeme ve doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla tercih edilen poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) çeşitli fabrikasyon yöntemleri ile farklı formlarda işlenebilen, mekanik ve ısıl kararlılığı olan, biyoyumlu ve biyobozunurl özellikler gösteren FDA onaylı bir poliesterdir [2]. Kemik, kırık, tendon, iskelet kası, kalp, damar, deri ve sinir ağı sistemlerine yönelik iskele temelli doku mühendisliği uygulamalarında çeşitli formlarda kullanılmaktadır [3].

Bu tez çalışmasında, hacimsel iskelet kası hasarları için polimer bazlı destek malzemelerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bilgisayar kontrollü döngüsel hareket kazandırılarak modifiye edilmiş ıslak eğirme tekniği ile yüksek hacimde, hizalanmış, biyoyumlu, biyobozunur, iskelet kas hücrelerinin gelişimini ve yönelimini destekleyecek seviyede iletken özelliğe sahip iskelet kası iskelesi üretimi ve bu iskelenin antibakteriyel özelliğe sahip bir formülasyonun da geliştirilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskelet Kası Yapısı ve Organizasyonu

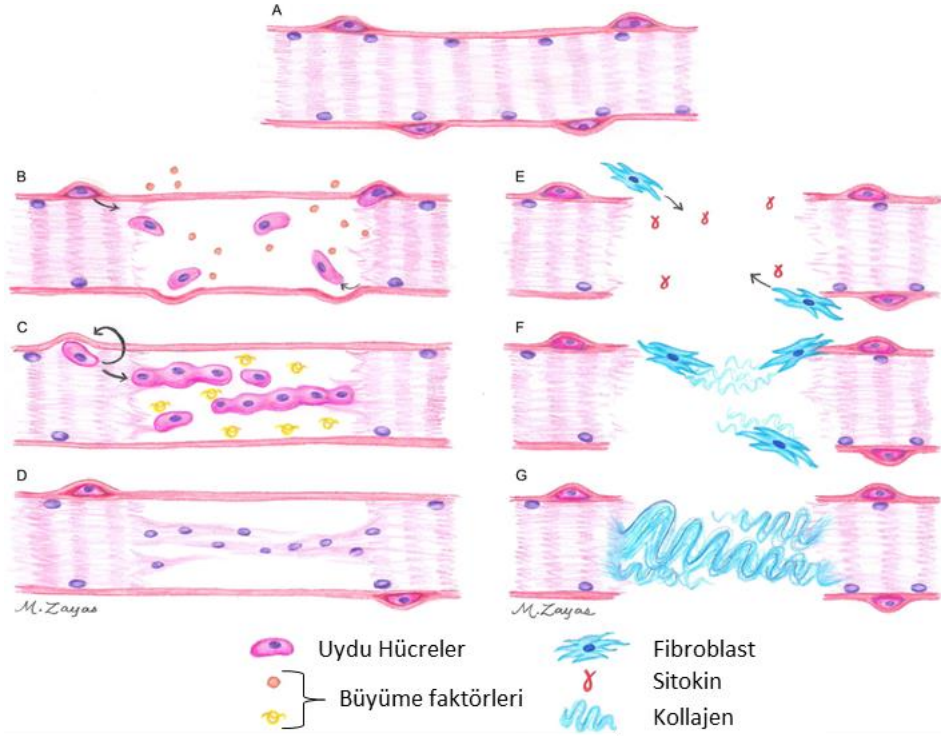
Kas dokusu; düz kas, kalp kası ve iskelet kası olmak üzere 3 grupta sınıflandırılabilir. İskelet kası, insan vücudundaki en büyük doku kütleini temsil etmekte olup, toplam vücut kütleinin yaklaşık %40-45'ini oluşturmaktadır [4]. İskelet kası dokusu, myoblast kas hücreleri, organize sinir ağları, kan damarları ve hücre dışı matriksi (ECM) yapılarından oluşan bileşik bir yapıdır [5]. İskelet kası, bağlayıcı doku (tendo, aponevroz) ile iskelete bağlı olduğu noktalar aracılığıyla hareketliliği koordine eder. İskelet kasında kasılma, iç içe geçmiş aktin ve myozin filamentlerden oluşan sarkomer adındaki birimler tarafından sağlanır [6]. Birbirine kaynaşan çoklu myoblastların bir araya gelmesiyle myofibriller oluşmaktadır. Myofibril, uzunluğu boyunca birbirini takip eden sarkomerlerden oluşur. Birçok myofibrilin bir araya gelmesiyle oluşan demet, laminin-2, fibronektin ve tip IV kolajenden oluşan ince bağ doku tabakası, endomysiyum ile kaplanarak kas için temel yapı olan myofiberi oluşturmaktadır. Basit anlamda myofiberler, yaklaşık 20 ile 100 µm aralığında değişen çaplara sahip, çoklu myofibril kümeleridir. Birbirine paralel yaklaşık 20-80 adet myofiber, tip I kolajence zengin perimisiyum tabakasıyla sarılarak fiber demetlerini oluştururlar. Son olarak, birkaç fiber demeti, epimisiyum tabaka ile sarılarak kas dokusu formunu oluşturur [7]. Uydu hücreleri olarak adlandırılan iskelet kası progenitör hücreleri, iskelet kası dokusunun yenilenmesinden sorumlu birincil hücre tipidir [8]. İskelet kas dokusu yapısının şematik görünümü Şekil 2.1.'de sunulmuştur.



Şekil 2.1. İskelet kas dokusu yapısının şematik görünümü [9].

2.2. Hacimsel İskelet Kası Hasarları ve Klinik Yaklaşımlar

İskelet kası dokusunda hacimsel kas kaybı (VML), belirli bir bölgede %20'den fazla oluşan kas kaybı ile tanımlanabilir ve son derece ciddi kas yaralanmalarıdır [10,11]. İskelet kası dokusu yüksek yenilenebilme özelliğine sahip olsa dahi, bu tür yaralanmalarda, temel membran ve bağ dokusu içeren büyük miktarda iskelet kasının hasar alması, onarımı yönlendiren yapısal, mekanik ve biyokimyasal ip uçlarının ortadan kalkmasına ve iskelet kasının kendi kendini iyileştirmede yetersiz kalmasına sebep olur [12,13]. VML tedavisi için mevcut altın standart yaklaşım, otolog doku transferidir. Ancak, donör bölgede hasara ve fonksiyonel, estetik eksikliğe sebep olmaktadır. Ayrıca, implantasyon için otolog doku sıklıkla transfere uygun olmaz veya yaralanan alanın boyutundan daha küçüktür, bu da yetersiz fonksiyonel iyileşmeye neden olmaktadır. Son derece yetersiz kalan mevcut tedavi yerine, iskelet kası rejenerasyonunu sağlamak ve yönlendirmek için kullanıma hazır biyomimetik yapı iskelelerinin geliştirilmesine önemli ölçüde ihtiyaç duyulmaktadır. İskelet kasının doğal rejenerasyonu şematik olarak Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



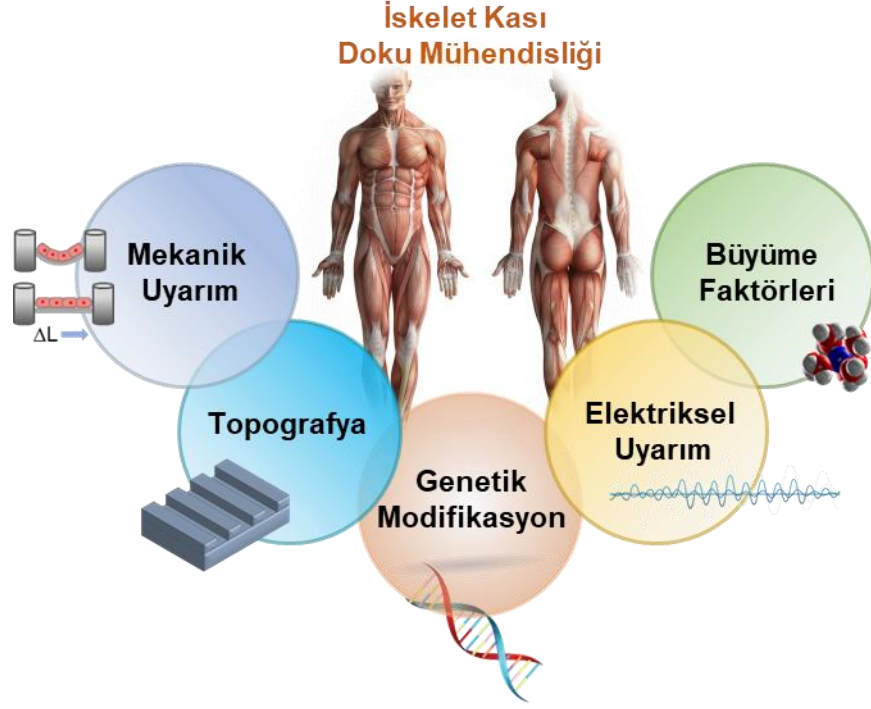
Şekil 2.2. Doğal iskelet kası rejenerasyonunun şematik görünümü [9].

Şekil 2.2.'ye göre iskelet kası iyileşme mekanizması; (A) Uydular, olgun iskelet kasının sarkomları ve bazal lamina arasında konumlanmıştır. (B) Yaralanma üzerine, uydular hasarlı bölgeye geçer ve çoğalmaya başlar. (C) Uydular sonrasında, olgunlaşmamış myofiberler oluşturmak için birleşecek (D), mevcut sağlıklı myofiberlerle kaynaşacak ve daha sonra fonksiyonel dokuyu yeniden oluşturmak için daha fazla kontraktil protein eksprese ederek olgunlaşacaklardır. VML yaralanmalarında, (E), bazal lamina, fibroblastların yara bölgesine geçişini kolaylaştırarak yok edilir veya çıkarılır. (F) Uygun sinyalizasyon işaretlerinin olmaması durumunda, fibroblastlar kollajen biriktirmeye başlar, (G) nihayetinde kitlesel yara dokusu oluşumuna yol açar [9].

2.3. İskelet Kası Doku Mühendisliği Yaklaşımı

Doku mühendisliği (TE), hızla gelişmekte olan disiplinler arası bir alandır ve hasarlı doku ve organların, fonksiyonel bir şekilde tamamen yerine geçecek veya iyileşmesini destekleyecek ürünler geliştirmek amacıyla yaşam, malzeme ve mühendislik bilimlerindeki ilkeleri ve teknolojileri birleştirir [14]. Doku mühendisliği yapısının ana bileşeni, hücrede tutunmayı, çoğalmayı ve doku oluşumunu destekleyen biyomalzeme tabanlı, üç boyutlu (3D) platform olan bir

iskeledir. İskelet kası rejenerasyonu için kullanılan iskeleler, geniş bir doku hacmi boyunca yoğun biçimde paketlenmiş, yüksek oranda hizalanmış myofiber oluşumunu sağlamalı ve desteklemelidir. İskelet kası doku mühendisliği yaklaşımlarına genel olarak iskele topografyası, elektriksel ve mekanik uyarımlar ve büyüme faktörleri ön plana çıkmaktadır (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. İskelet kası doku mühendisliği yaklaşımlarına genel bakış.

İskelet kas dokusu, çok çekirdekli kas hücrelerinden oluşan yüksek derecede yönlendirilmiş, yoğun paketlenmiş myofiber demetleri içerir. Myofiberlerin uygun şekilde hizalanması sağlanmazsa, myoblastlar rasgele dönen desenlerde gelişir, bu durumda kas lifleri verimli kasılma sağlayamazlar ve kuvvet oluşturamazlar. Verimli bir kasılmanın gerçekleşebilmesi için, myofiberlerin aynı anizotropi ile birbirine paralel olacak şekilde gelişmesi gerekir [15]. Bu nedenle, kas dokusu mühendisliği iskeleleri, kas hücrelerini önceden hizalamak, hücre füzyonunu yönlendirmek ve uzun ve kalın myofiber oluşumunu teşvik etmek için anizotropik bir yapıda geliştirilmektedir.

2.4. Myofiber Gelişimi için Kritik Biyokimyasal ve Biyofiziksel İpuçları

Anizotropik yapıya sahip iskeleler, hücre morfolojisini etkileyen ve yüksek yoğunluklu hücre tabakalarının oluşumuna yol açan myoblast hizalanmasını

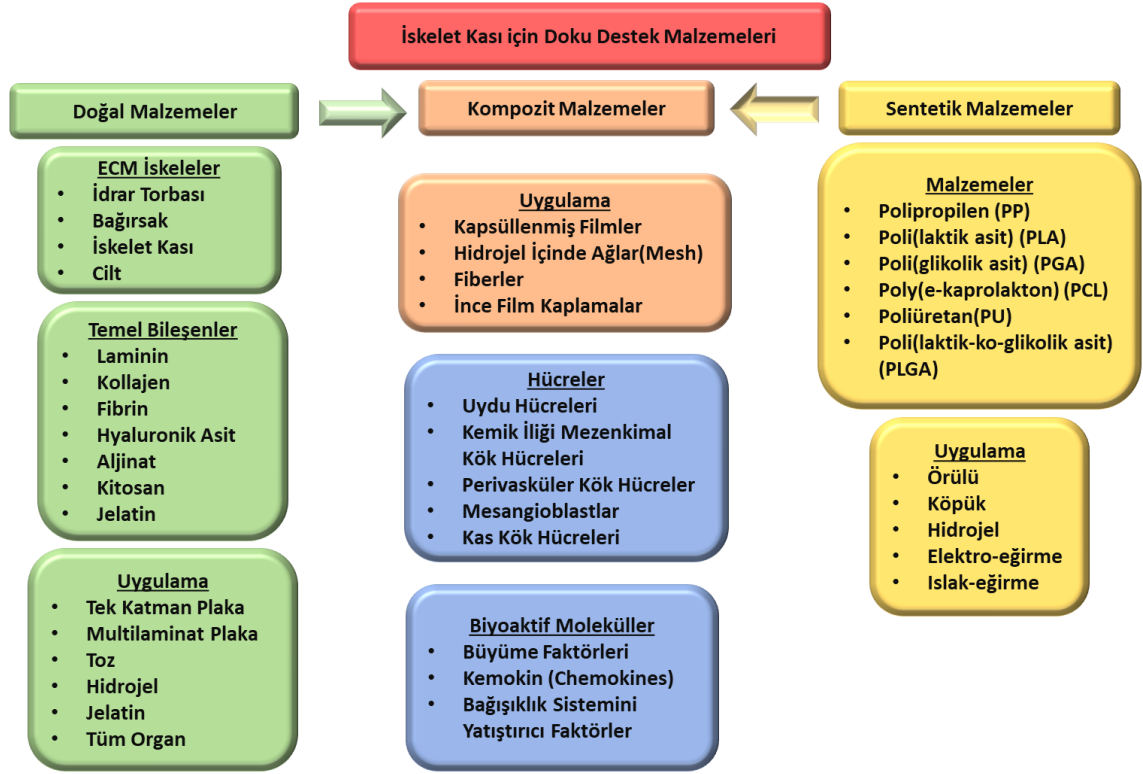
desteklemek için temas rehberliği sağlayan kritik biyofiziksel ipuçları sunmaktadır. Ayrıca iskele sertliğinin doğal kas dokusu sertliği ile uyuşması, hücrelerin ilgili mekanik kuvvetlere maruz kalabilmesi için kritik önem taşımaktadır. İskele sertliğine bağlı olarak, hücreler arası sinyalizasyon, çoğalma, farklılaşma ve diğer metabolik olaylar gibi hücresel üst düzey mekanizmalar değişiklik göstermektedir (Şekil 2.3.). Doğal kas hücre dışı matriksinden (ECM) büyük oranda daha sert yapıya sahip bir iskelede myoblastların davranışları ve fenotipleri değişiklik göstermekte bu da myofiberlerin oluşmasını önlemektedir [16].

Kas gelişiminde normal fizyolojik süreçlerin yanında merkezi sinir sisteminin sağladığı elektriksel uyarımlar, myofiberlerin olgunlaşmasını desteklemekte kritik bir rol oynamaktadır [17]. Elektriksel darbelerin yönlendirmesi olmadan, kas dokusu gelişimi birincil myotüp aşamasından ileriye devam edememekte ve myofibere gelişim sağlanamamaktadır [18].

2.5. İskelet Kası için Rejeneratif, Biyobozunur Destek Malzemeleri

Doku mühendisliği stratejilerinde, hasarlı dokuları yenilemek, desteklemek veya değiştirmek için temel olarak hücre bazlı yaklaşımlar, biyoaktif moleküller, doğal veya sentetik iskele malzemeleri veya tüm bunların kombinasyonları olarak çeşitli stratejiler oluşturulabilmektedir (Çizelge 2.1.). Literatürde doğal polimerden, sentetik polimerlerden veya kombinasyonlarından oluşturulan, biyo-taklitçi malzemeler hasarlı iskelet kası onarımını sağlamak, desteklemek amacıyla bir anlamda kılavuzluk edebilen yapı iskelelerinin hazırlandığı birçok çalışma mevcuttur.

Çizelge 2.1. Doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilen iskele materyalleri ve formları [19].



2.5.1. Doğal Polimerler

Doğal polimerler, bitkiler, hayvanlar, mikro organizmalar gibi yenilenebilir kaynaklardan türetilmekte ve bu nedenle doğada yaygın şekilde bulunmaktadır. Bu malzemeler, kompleks yapılar ve farklı fizyolojik işlevler yerine, geniş bir alanda benzersiz dağılıma sahiptirler. Pseudoplastik akış davranışı, jelleşme kabiliyeti, ıslanabilirlik kapasitesi, biyobozunurluk gibi çeşitli özelliklerinden dolayı doku mühendisliği uygulamalarında büyük potansiyele sahiptirler. Ek olarak, kimyasal modifikasyonların (hidroliz, oksidasyon, indirgeme, esterleşme, eterleşme, çapraz bağlama reaksiyonları, vb.) [20] enzimatik modifikasyonların veya diğer moleküllerle konjugasyonun gerçekleştirilebilmesi için birçok fonksiyonel gruba (amino, karboksilik ve hidroksil grupları) sahiptirler [21] [22]. Bu durum kimya stratejilerinin geliştirilmesine ve çeşitliliğe sahip ürünlerin eldesine olanak sağlamaktadır. Doğal kökenli polimerler özgün olarak enzimler tarafından parçalanabilmektedirler. Bu da fizyolojik mekanizmalar tarafından metabolize edilebilme eğilimlerini daha yüksek hale getirmektedir.

Ancak doğal polimerler kaynaklarına bağlı olarak buldukları safsızlıklar ve endotoksinlerden dolayı istenmeyen bağıışıklık tepkisi uyandırabilmektedirler. Büyük ölçekli izolasyon prosedürleri sırasında ürünler, partiden partiye farklılık gösterebilmektedirler. Bu da tekrarlanabilir üretimde ciddi dezavantaj getirmektedir. Ayrıca doğal polimerlerin hedefe yönelik işlenebilirlikleri ve mekanik dayanımları sınırlıdır. Çizelge 2.2.'de en çok kullanılan doğal polimerlerin, elde edilme kaynakları ve genel fonksiyonları verilmiştir.

Çizelge 2.2. Yaygın olarak kullanılan doğal polimerler, kaynakları ve fonksiyonları.

Doğal Polimer	Kaynağı	Fonksiyonu
Kolajen	Sığır, balık ve diğer türlerden izole edilir	Doku mimarisinin temel bileşeni oluşturur, mekanik güç sağlar, hücre tutunmasını ve büyümeyi destekler, hücre nakli için biyo-uyumlu matriks sağlar.
Jelatin	Kolajen hidrolizi	Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılır, üç boyutlu hücre kültürü için matriks ve doku mühendisliği yapı iskelelerinin bir bileşeni olarak ağırlıklı şekilde araştırılmaktadır.
Elastin	Sığır ve kuşların elastik dokularından izole edilir	Dokulara esneklik sağlama amacıyla doku mimarisinin temel bileşeni olarak kullanılır.
Keratin	Deriden, saçtan, sığır ve kuş tırnaklarından izole edilir	Hücre gelişimi için matriks olarak, yara örtülerinde ve cilt bakım ürünlerinde bileşen olarak kullanılır.
İpek	Böcek larvalarından izole edilir	Doku mühendisliği yapı iskelelerinin bileşeni ve hücre kültürü için alt katman olarak kullanılır.
Kitosan	Böcek dış iskeletinden, kabuklu deniz hayvanlarından izole edilir	Yapısal bileşen olarak kullanılır.

2.5.2. Sentetik Polimerler

Sentetik polimerler, kontrollü bir yapıya, yüksek işlenebilme esnekliğine sahiptir, bu sebeple immünolojik reaksiyon oluşturma potansiyelleri düşüktür. Geçmişten

günümüze biyobozunur sentetik polimerlerin, implantlar, ilaç salım sistemleri ve doku mühendisliği iskeleleri olarak kullanılabilmesi için önemli çabalar sarf edilmiştir. Polimerlerde biyobozunma sırasında ana zincirde ayrılmalar, kopmalar ve molekül ağırlığında azalmalar meydana gelmektedir. Polimer bazlı biyomateryalin vücut içerisinde emiliminin ve resorpsiyonunun gerçekleşebilmesi için makromolekül ana zincirinin biyoparçalanabilir bağlar içermesi önemlidir. Böylece bu tür bağlar, hidrolitik, enzimatik veya oksidatif doğal bozunma mekanizmaları sonucu parçalanarak daha düşük molekül ağırlıklı zincirler verebilmektedir [23].

Alifatik poliestерler, biyomedikal alanda en sık kullanılan sentetik biyobozunur polimerlerdir. Bu polimerler genellikle ana zincirdeki ester gruplarının hidrolizi ile bozunurlar. Ester bağının hidrolizi sonucu alkol ve asit fonksiyonel yapılı gruplar oluşur. Sentetik polimerlerin sentez sırasında yapısı, kompozisyonu ve molekül ağırlığı ayarlanarak bozunma hızları ve bozunma ürünleri kolaylıkla kontrol altına alınabilmektedir [24]. Çizelge 2.3.'de doku mühendisliğinde sık kullanılan biyobozunur poliestерler ve temel özellikleri sunulmuştur.

Alifatik biyobozunur poliestерlerin yanı sıra, polianhidridler, polifosfazenler, poliüretanlar ve poli(glisерol sebakat)larda ve birbirlerine karşı sahip oldukları farklı birçok avantajlar ile doku mühendisliği uygulamalarında tasarlanan stratejiye en uygun polimeri seçme açısından geniş bir yelpaze sunmaktadırlar.

Çizelge 2.3. Doku mühendisliğinde sık kullanılan biyobozunur poliestерler ve temel biyobozunma özellikleri.

Poliester	Biyobozunma türü ve biyoyumluluk	Biyobozunma süresi	Uygulama
Poli(laktik asit) PLA	Enzimatik Hidroliz Metabolik bozunma ürünleri Lokalize Enflamasyon	5 ay - 5 yıl	Cilt, Kıkırdak, Kemik, Bağ, Tendo, Damar, Sinir, Karaciğer, Kas
Poli(glikolik asit) PGA	Enzimatik Hidroliz Metabolik bozunma ürünleri Lokalize Enflamasyon	1 - 12 ay	Cilt, Kıkırdak, Kemik, Bağ, Tendo, Damar, Sinir, Kas
Poli(laktik-ko-glikolik asit) PLGA	Enzimatik Hidroliz Metabolik bozunma ürünleri Lokalize Enflamasyon	1 - 12 ay	Cilt, Kıkırdak, Kemik, Bağ, Tendo, Damar, Sinir, Kas
Poli(ϵ -kaprolakton) PCL	Hidroliz Minimal Enflamasyon	6 ay - 3 yıl veya daha fazla	Cilt, Kıkırdak, Kemik, Kas, Sinir

2.5.3. Kompozit Malzemeler

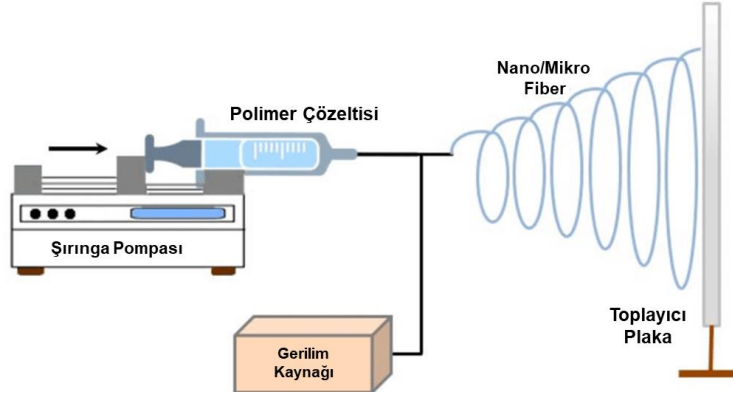
Doğal ve sentetik polimerlerin kendi içlerinden, birbirlerinden bağımsız avantajları bir araya getirilerek daha uyumlu, tedaviye kolay yanıt verebilen, mekanik özellikler açısından daha güçlü destek sağlayabilen iskeleler geliştirilebilmektedir. Genel anlamda kompozit iskelelerde, hem sentetik malzemelerin istenilen mekanik dayanım, işlenebilirlik özellikleri hem de doğal ECM iskelelerin yapıcı, destekleyici özellikleri bir araya getirilmeye çalışılır.

2.6. Fiber Üretim Teknikleri

Polimerik fiber doku iskeleleri üretilirken, yaygın olarak elektro-eğirme ve ıslak-eğirme teknikleri kullanılmaktadır. Her iki tekniğin de kendine özgü avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır.

2.6.1. Elektro-eğirme Tekniği

Elektro-eğirme tekniği, polimer fiber üretimi için hızlı ve düşük maliyetli bir tekniktir ve doku mühendisliğinde fiber iskeleler üretmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu teknik ile 3 nm değerinden 10 μm 'ye kadar geniş bir çap aralığında, sürekli ve uzun fiberler elde etmek mümkündür [25]. Şekil 2.4.'de gösterildiği gibi, polimer çözeltisi, toplama plakasını hedefleyen bir şırınga yardımıyla iğne, kapiler tüp veya iğne ucundan sıkılır. Yüzey gerilimi, polimeri iğne ucunda tutar, ancak yüksek gerilime sahip (birkaç kV) elektrik alanının uygulanmasıyla iğne ucundaki polimer içinde itici bir kuvvet oluşur. Bu itme kuvveti, yüzey geriliminin çekici kuvvetini aştığında, topraklanmış, nötr toplama plakasına doğru yönlendirilen bir polimer çözeltisi jeti elde edilir. Çözücü, polimer jeti ile plakaya ulaşmadan buharlaşarak plaka üzerinde fiber polimer ağ oluşturur. Bu prosedürde fiber çapını kontrol etmek için ayarlanabilen birkaç değişken vardır. Ana değişkenler, çözelti içinde çözülen polimer konsantrasyonu, polimer çözelti akış hızı, uygulanan voltajın büyüklüğü ve iğneden toplama plakasına olan mesafeyi içermektedir. Elektro-eğirme tekniği ile çeşitli doğal ve sentetik ve hibrit polimerler ile iskeleler üretilmiştir. Ancak bu yöntemde, sentetik polimerler ile çalışmak, doğal polimerlere göre daha kolaydır. Doğal polimerler, elektro-eğirme için gerekli olan çözeltisi viskozite değerini yakalamak için sentetik polimerlerle veya tuzlarla harmanlanırlar. Yassı sabit bir toplayıcı plaka yerine, dönen bir silindir toplayıcı kullanılarak fiberlerde tek yönlü hizalanma sağlanabilmektedir [26].

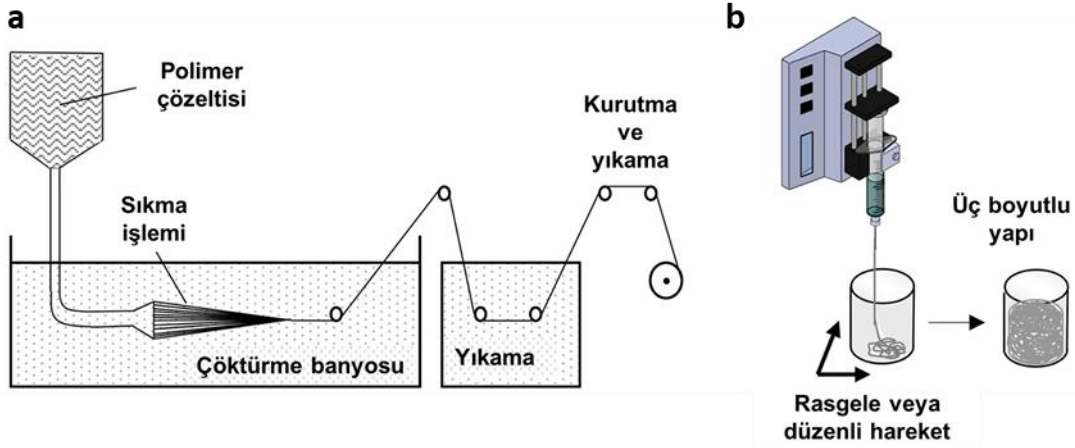


Şekil 2.4. Temel elektro-eğirme düzeneği şematik gösterimi [27].

Kolayca elde edilebilir ve düşük maliyetli ekipmanlarla uygulanabilir olması, fiber morfolojisinin istenilen parametrelerde elde edilebilir olması, yüksek yüzey-hacim oranı ve yeterli moleküler ağırlığa sahip her tür polimeri işleyebilir olması gibi avantajlara sahiptir. Toksik çözücü barındırabilmesi, özellikle doku mühendisliği uygulamalarında ihtiyaç duyulan üç boyutlu yapıların eldesinde ve bu yapılarda aranan gözenekliliğin oluşturulmasında büyük dezavantaja sahiptir. Ayrıca üretim hızı ve boyutu, ayarlanması gereken bir çok değişken parametre ile optimizasyonu kolay olmayan tekniktir [28].

2.6.2. Islak-eğirme Tekniği

Islak-eğirme tekniği doku mühendisliğinde biyotaklitçi, fiber bazlı iskele hazırlamada klasik bir yöntem olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [29]. Bu teknik elektro-eğirme tekniğine göre, daha düşük maliyetli, kolay optimize edilir ve yüksek verimli olması gibi avantajlara sahiptir. Teknik temel olarak, polimerin iyi çözücüsünde tamamen çözünmesi ile elde edilen çözeltinin, polimer için kötü çözücü veya iyi çözücü-kötü çözücü karışımından elde edilen çöktürme banyosuna doğrudan sıkılmasıyla mikrometre skalasında istenilen çapta fiber eldesine dayanır. Islak-eğirme tekniğinde fiber çapı, polimer derişimi, sıkım hızı, iğne çapı gibi basit parametrelerle kolaylıkla ayarlanabilmektedir. Ancak bu teknik ile nano ve mikron altı çapta fiber üretmek oldukça zordur. Islak-eğirme tekniği ile üretilen fiberlerin, bir sarım makarasında toplanması, bilgisayar kontrollü bir sistemde ekstrüzyon sırasında çöktürme banyosunun rastgele veya düzenli hareketleri, tekniğin üç boyutlu üretim sistemler ile modifikasyonu gibi çeşitli stratejiler kolaylıkla uygulanabilmekte ve araştırılmaktadır (Şekil 2.5.) [30].



Şekil 2.5. (a) Klasik ıslak-eğirme tekniği ve (b) modifiye edilmiş ıslak-eğirme tekniği uygulamalarının şematik gösterimi [30].

Islak eğirme tekniği özellikle, elektro-eğirme ve diğer (eriyik, kuru-eğirme) teknikler ile düşük termal dayanımlarından ötürü üretimi imkansız veya çok zorlu olan doğal polimerlerden (kolajen, kitosan, ipek vb.) fiber eldesini sağlamış ve kolaylaştırmıştır [31,32]. Bu tekniğin polimer çeşitliliği ve yükleme stratejisi açısından çok yönlülüğü, fiberlerin antibiyotik, protein, büyüme faktörleri ve genler dahil olmak üzere çok çeşitli biyoaktif bileşiklerle işlevselleştirilebilmesi en büyük avantajlarından biridir. Ayrıca parametrelerin kolaylıkla ayarlanmasıyla kontrollü ilaç salım sistemleri elde edilebilmektedir [33].

2.7. PCL Fiber Bazlı İskelet Kası Doku Mühendisliği Malzemeleri Üzerine Literatür Taraması

İskelet kası doku mühendisliği ve fiber iskele üzerine literatür taraması gerçekleştirildiğinde, 180'nin üzerinde yayın bulunduğu görülmektedir. Bu çalışmalar incelendiğinde; fiber üretim tekniği olarak genellikle elektro-eğirme tekniğinin kullanıldığı, ıslak-eğirme tekniği üzerine yapılan çalışmaların daha az olduğu görülmektedir. Genel olarak iskelet kası doku mühendisliği fiber iskeleler ait çalışmalarda polimer seçimi, üretim stratejisi ve teknikler bu bölümde özetlenmiştir. Choi ve ark. [34], elektro-eğirme tekniği kullanarak PCL-kolajen harmanı tabanlı, implante edilebilir, nanofiber yapıda kas iskelesi hazırlamışlardır. İskeleyi oluşturan fiberlerin myoblastları yönlendirip yönlendirmediğini incelemek için farklı yönelimli fiberlere sahip iskeleler hazırlamışlardır. Nanofiber iskeleler üzerine insan iskelet kası hücrelerinin

(hSkMCs) ekip tutunma, çoğalma ve organizasyon incelemeleri gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak, tek yönlü hizalanmış nanofiber iskelelerde, rasgele yönelimli iskelelere göre önemli ölçüde daha fazla hücrenin indüklendiği ve iskelet kas hücresi hizalanmasının sağlanarak myotüp oluşumunun gözlemlendiğini göstermişlerdir. Aviss ve ark. [35] elektro-eğirme tekniği kullanarak, hiçbir yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmeden PLGA ile hücrelere temas rehberliği sağlayacak, birbirine hizalı nanofiberlerden oluşan bir iskele hazırlamışlardır. C2C12 fare myoblast hücreleri ile yapılan bu çalışmada hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşması incelemiştir. Çalışmada yüksek seviyede hizalanmış nanofiberlerden oluşan iskelelerin myoblast hizalanması için topografik rehberlik sağlayabildiğini gösterilmiştir. Williamson ve ark. ıslak eğirme yöntemi kullanılarak PCL bazlı iskelet kası iskelesi ürettikleri çalışmada biyouyumluluğu arttırmak adına fiber yüzeylerine jelatin kaplama yapmışlardır. Jelatin modifiye fiber yapılarında fibroblast ve myoblastların proliferasyonu gösterilmiştir. Benzer şekilde sentetik polimerler veya doğal-sentetik polimer harmanları ile yapılan çalışmalarda iskelenin hizalanmış fiberlerden oluşmasının hücre organizasyonunda büyük öneme sahip olduğu literatürde gösterilmiştir [19,36-39].

Ayrıca iskele yapısına elektriksel iletkenlik sağlayacak yapıların katılması ile elektro-aktif iskelelerin hazırlanmasının ve in vitro hücre kültürü çalışmalarında elektriksel uyarım sağlanmasının, hücre proliferasyonunu, hizalanmasını ve myotüpe farklılaşmasını artırıcı etkide bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Chen ve ark. [40] elektro-eğirme tekniği ile PCL ve farklı elektriksel iletkenlik değerlerine sahip PCL-polianilin (PANI) harman kompozisyonları ile hizalı ve rasgele yönlenmiş fiber iskeleler hazırlamışlardır. C2C12 hücre hattı ile gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında, herhangi bir elektriksel uyarım uygulanmamıştır. PCL-polianilin fiberlerinde iletken polimerin varlığının sitotoksik etkiye sebep olmadığı ayrıca myoblast oryantasyonunun ve proliferasyonunun PCL fiberlere göre anlamlı daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ku ve ark. [41], topografik yönlendiriciliğe ve elektroaktiviteye sahip PCL-PANI bazlı nanofiber iskele üretimi gerçekleştirmiş ve bu özelliklerin myoblast davranışını üzerindeki etkilerini incelemiştir. Çalışmada myoblast morfolojisinin ve myotüp oluşumunun fiber hizalanmasına bağlı olduğunu

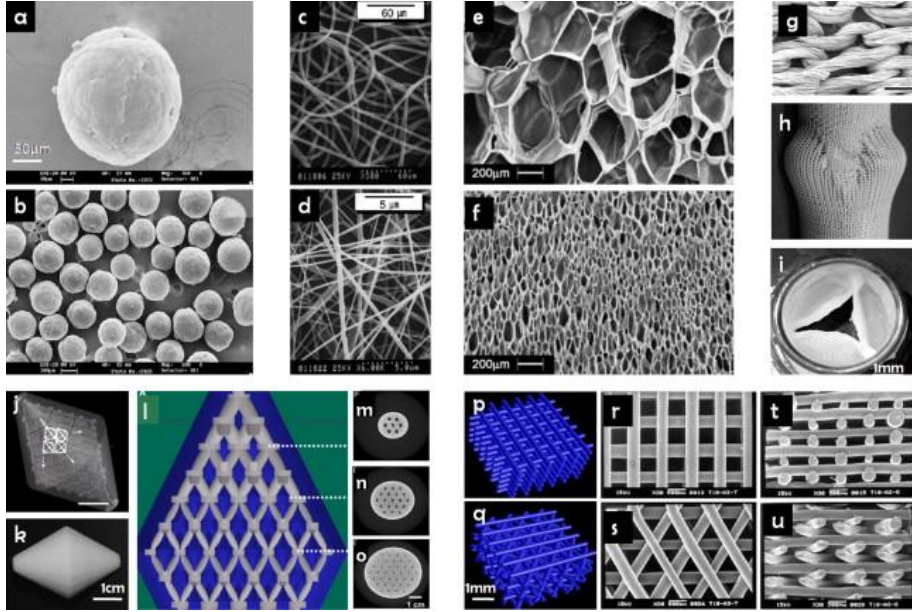
bildirilmiştir. Ayrıca myotüp oluşumunun iletken özellikteki PANI miktarı ile anlamlı biçimde arttığı myozin ağır zincir ve gen (myogenin, tropinin T) ifade seviyeleri incelenerek gösterilmiştir. Literatürde fiber iskelelere iletkenlik özellik kazandırmak amacıyla, karbon nanotüplerin kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur [42,43].

Hücre kültüründe elektriksel uyarımın etkisini incelemek amacıyla planlanan çalışmalarda mevcuttur. Patel ve ark. [44], kollajen ve laminin-111 kaplı polidimetilsiloksan kalıplar üzerine C2C12 hücreleri ekerek elektriksel uyarım (3 gün için günlük 1 saat, 1 Volt, 2 Hz frekansında 2 ms süre kare dalga) uygulamasının etkisini incelemişlerdir. Çalışmada, elektriksel uyarımın myojenik aktiviteyi, çoğalma ve homojen dağılımı arttırdığı gösterilmiştir. Sirivisoot ve ark. [43] poliüretan - karbon nanotüp bazlı kompozit fiber iskeleler hazırlamış ve C2C12 hücreler ile gerçekleştirdikleri çalışmada, elektriksel uyarımın etkisini incelemişlerdir. Sonuç olarak, elektriksel uyarım uygulanmadığında myotüp formasyonunu iskele morfolojisinin belirlediğini, elektriksel uyarımın varlığında ise myotüp formasyonunun iskele elektriksel iletkenliğine bağlı olduğunu göstermişlerdir. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda, iskelet kası doku mühendisliği çalışmalarında fiber doku iskeleleri üzerinde elektriksel uyarımın altında hücresel davranışların halen araştırılması gereken önemli bir konu olduğu görülmektedir.

2.8. Poli(ϵ -kaprolakton)

Kolaylıkla tekrar edilebilir üretimi sağlanabilen, kontrollü ilaç-etken madde salımı yapabilen, biyobozunur ve biyoyumlu özelliklere sahip implantların, doku iskelelerin, filmlerin geliştirilmesinde PCL önemli bir yere sahiptir [45]. PCL mükemmel biyoyumluluk özelliğinin yanı sıra, kolay işlenebilirliği, güvenli biyobozunma mekanizması sebebi ile de biyomedikal alanda araştırmacılar tarafından büyük bir ilgi görmektedir. PCL, ϵ -kaprolaktonun yüksek verimli lakton halka açılması polimerizasyonu ile sentezlenen ve nihai molekül ağırlığı seçilecek katalizör güçlü etkisi ile kolaylıkla belirlenebilen petrol bazlı bir poliesterdir. Genellikle 3000 ile 80.000 g/mol arasında molekül ağırlığına sahiptir. Molekül ağırlığındaki bu dağılım biyobozunma oranının ve etken madde salım karakterinin değiştirilebilmesini uygun hale getirmektedir. PCL, hidrofobik, yarı

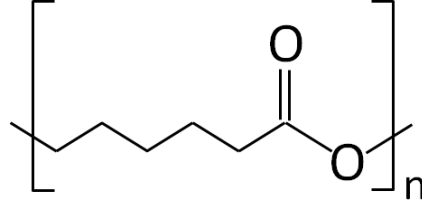
kristal bir polimerdir ve molekül ağırlığının artmasıyla kristallenme oranı azalır. PCL 60 °C civarında erime noktası sıcaklığına sahiptir. Bu sıcaklık PCL'i üç boyutlu basım sistemlerinde kullanım için de cezbedici hale getirmektedir. PCL ayarlanabilir fizikokimyasal ve mekanik özellikleri sayesinde, ilaç salım sistemleri, yara örtüleri, cerrahi dikişlerin yanı sıra kemik, kırıkdağ, sinir, tendon, diş gibi geniş skaladaki biyomedikal uygulamalarda başarı ve performans sağlamıştır (Şekil 2.6.) [46-50].



Şekil 2.6. PCL bazlı sistemler: nanoküreler (a,b), nanofiberler (c,d), köpükler (e,f), örülü yapılar (g,h,i), üç boyutlu basım modelleri (j-u).

PCL'in kolaylıkla üretilebilmesi ve modifiye edilebilmesinin yanında, bir diğer üstünlüğü reolojik ve visko-elastik özelliklere sahip olmasıdır. Bu durum PCL'i eriyik ve çözünür formda işlenebilir kılmaktadır. PCL kimyasal yapısı Şekil 2.7.'de sunulmuştur.

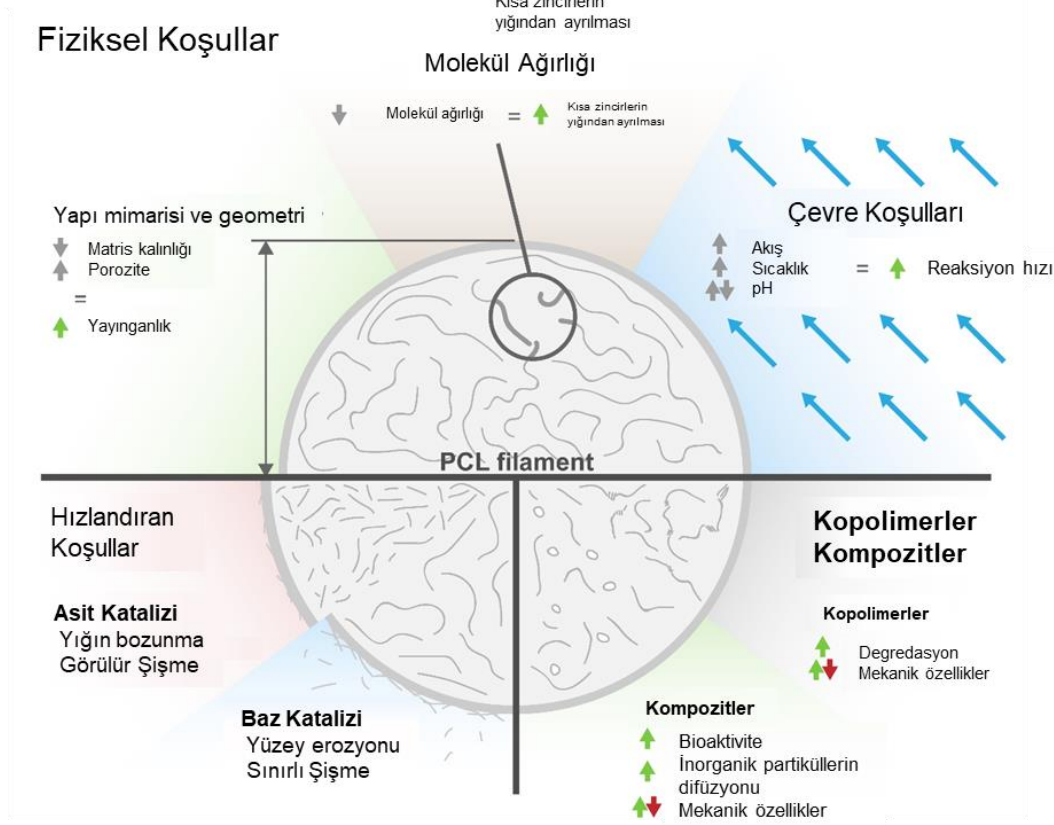
PCL molekül ağırlığına bağlı olarak kloroform, diklorometan, karbon tetraklorür, benzen, toluen, sikloheksanon ve 2-nitropropan içinde oda sıcaklığında iyi çözünürlüğe sahiptir. Aseton, 2-bütanon, etil asetat, dimetilformamid ve asetonitril çözücülerinde düşük çözünürlüğe ve alkol, petrol eteri, dietil eter PCL için çözücü olmayan sistemlerdir [51].



Şekil 2.7. Poli(ϵ -kaprolakton) kimyasal yapısı.

PCL yavaş bozunan alifatik polyesterdir (Şekil 2.7.). Polimerin çevresel bozunması genel olarak mantarlar, bakteriler ve algler gibi mikroorganizmaların sağladığı, oksidatif, enzimatik ve pH ilişkili ortamların ester gruplarının hidrolizini katalize etmesi ile gerçekleşmektedir. Moleküler ağırlıktaki ilk düşüşün ve makroskopik yapısal parçalanmanın ardından oluşan küçük polimer parçaları hücreler veya mikroorganizmalar tarafından tamamen metabolize edilebilir. PCL gibi ester grupları içeren polimerler, hidroliz yoluyla bozulmaya karşı hassastırlar. Bozunma farklı koşullar altında meydana gelen mekanizmalar için değişken kinetiğe sahip kimyasal veya enzimatik yollar boyunca gerçekleşebilir. Genel olarak, enzimatik olmayan, rastgele zincir kesimi, PCL bozulmasında baskın bir durum olarak tanımlanmıştır ve hem asit hem baz katalizörlü ester hidrolizi ile gerçekleşebilmektedir. PCL zincir uç grupları hidrolitik bozunma hızı için oldukça belirleyicidir. Hidroksil grupları tarafından sonlandırılan zincirler, karboksilik asitlerle sonlananlara göre çok daha stabildir. Bu durum karboksilik asitlerin otokatalitik etkisinden kaynaklanmaktadır [52,53].

PCL Bozunması



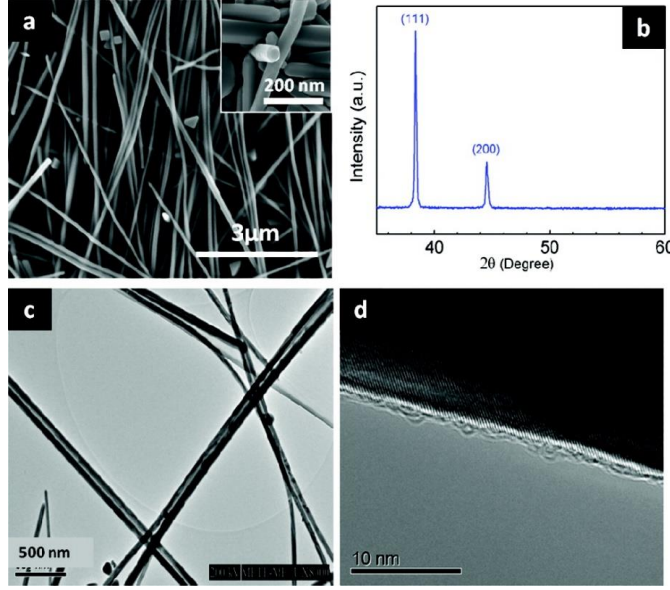
Şekil 2.8. PCL bozunmasını etkileyen çevresel ve diğer faktörler [53].

Biyomedikal biyobozunur polimerlerin in vivo olarak bozunması, hidrolitik olarak duyarlı fonksiyonel grupların kimyasal stabilitesi, malzemenin kimyasal özellikleri (hidrofobik veya hidrofilik karakter), moleküler ağırlığı ve dağılımı, fizikokimyasal faktörler (pH, iyonik kuvvet, ve sıcaklık), katkı maddelerinin varlığı, polimer morfolojisi (kristalli veya amorf), boyut ve geometri, hidroliz mekanizması, işlem şartları ve implantasyon bölgesi gibi bir çok parametreye bağlı olarak değişmektedir [54]. Bu parametreler PCL içinde geçerlidir. Şekil 2.8.'de PCL bozunması mekanizmasını etkileyen çevresel ve diğer faktörler gösterilmiştir.

PCL yumuşak ve sert doku gereksinimleri için uygun, biyouyumlu, biyorezorbe olabilen bir malzeme olarak kabul edilmektedir [55,56]. Fibroblast ve osteoblastların gelişimini desteklemek için tasarlanan farklı iskele formları ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir. PCL çok sayıda tıbbi cihazındaki kullanımı için Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır [57].

2.9. Gümüş Nanoteller

Gümüş nanoteller (AgNT) genellikle 10-200 nm aralığında çapa ve 5-100 µm aralığında değişen boylara sahip nano yapılardır (Şekil 2.9.). Gümüş nanotelin tanımlanması için en önemli standart 10'dan büyük en-boy oranına sahip olmasıdır. Aksi takdirde daha küçük en boy oranına sahip benzer yapılar olan nanoçubuklar (nanorods) olarak sınıflandırılmaları gerekir. Gümüş nanoteller gümüş atomlarından oluşur, ancak kristal şekli için geleneksel bir tanım verilmemiştir. Bunun nedeni, elektrokimyasal yöntemler ile sentezlenen gümüş nanotellerin genellikle tek kristalden meydana gelmesiyken, ıslak kimya yöntemi ile gerçekleştirilen sentezlerin çoklu ikizlenmiş kristaller (multiply twinned crystal) ile gerçekleşmesidir. Tellerin morfolojisi de tam olarak tanımlanmamıştır. Örneğin sert şablon yöntemi (hard template method) ile sentezlenen gümüş nanotellerin tele benzer görüntüleri olsa da bireysel nanotel çapları genellikle benzer değildir. Buna karşılık poliol yöntemi sentezlenen gümüş nanoteller, genellikle diğer usullerle sentezlenenlerden daha homojen çap ve boy dağılımına sahiptirler. Bu reaksiyon, inorganik tuzun bir poliol tarafından yüksek sıcaklıkta indirgenmesine dayanmaktadır. Bu reaksiyonlar sırasında, etilen glikol indirgeyici ajan ve çözücü olarak ikili rol üstlenirken, poli(vinil piroolidon) PVP hem kaplanma aracı hem de gümüş nanoparçacıkların birikmesini önlemek amacıyla kullanılır [58,59]. Sentezde ikili şırınga pompasının kullanımı ile AgNO₃ enjeksiyon hızı hassas bir şekilde kontrol edilerek sentezin en önemli basamağı olan çekirdeklenme aşaması sağlanmış olur. PVP ve AgNO₃ molar oran, birbirlerine yakın değerlerde çap ve boya sahip gümüş nanotellerin sentezini etkileyen önemli bir parametredir. Bu işlemin dezavantajı, enjeksiyon oranının çok doğru bir şekilde kontrol edilmesinin gerekliliği ve bu nedenle büyük ölçekte sentezin yapılmasının zorluğudur.



Şekil 2.9. Nanotellerin SEM görüntüleri (a). Nanoteller için XRD paterni (b).

Nanotellerin düşük (c) ve yüksek (d) çözünürlüklü TEM görüntüleri [59].

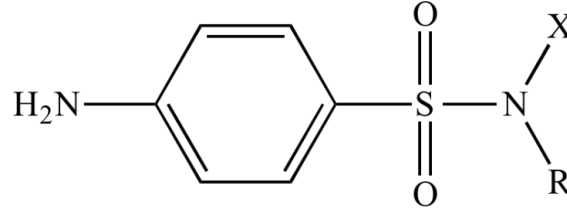
Gümüş kateterler ve yara örtüleri gibi tıbbi malzemelerde, küçük çaplı lokalize enfeksiyonları önlemek için antibakteriyel etki yaratmaktadır. Bu sebeple gümüş katkılı polimerik ince filmler, süngerler, fiberler ve nanopartiküller gibi farklı formlarda yaygın olarak hazırlanmaktadır. Memeli hücrelerin, bakterilere göre gümüş toksisitesine karşı çok daha yüksek direnç gösterdiği gösterilmiştir [60]. Gümüş nanotellerin biyoyumluluğunun her bir uygulamada dikkatlice araştırılması gerekmektedir.

Gümüş nanoteller üzerine oluşan ilgi nanoteknoloji alanında her yıl katlanarak artmakta ve hızla bilgi birikimini oluşturmaktadır.

2.10. İlaç Etkin Madde

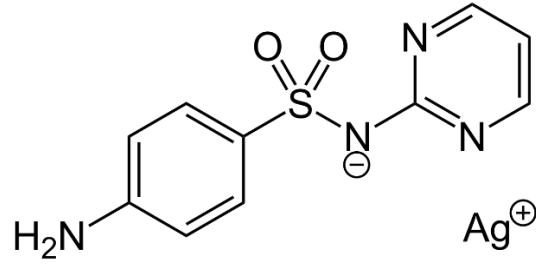
Keşiflerinden bu yana yaklaşık 100 yıldır, sülfonamid ilaçlar (sülfa ilaçları) bakteriyel, protozoal ve fungal enfeksiyonlara karşı sahip oldukları geniş yelpazedeki aktiviteleriyle insanlar, hayvan ve su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılmaktadırlar [61]. Bakteri metabolizması için hayati önem taşıyan bir büyüme faktörü olan tetrahidrofolik asidin biyosentezinde kullanılan p-aminobenzoik asidin (PABA) kullanımını engelleyerek bakteri gelişimini engelleyen ilaç grubunu oluştururlar [62].

Sülfonamidler, bir sülfonamid grubunun (-SO₂-NH-) sülfür atomuna C4 tarafından bağlanan bir anilin halkası ile oluşturulur. Sülfonamidlerin kimyasal genel gösterimi Şekil 2.10.'de gösterilmiştir. Sülfonamid azot atomu, bir hidrojen atomu veya bir aromatik heterosiklik halka ile farklı şekilde ikame edilebilir. Bu yapıdaki ilaçlar sülfanilamid, sülfatiazol, sülfapyridine, sülfadiazine vb. olarak sıralanabilir.



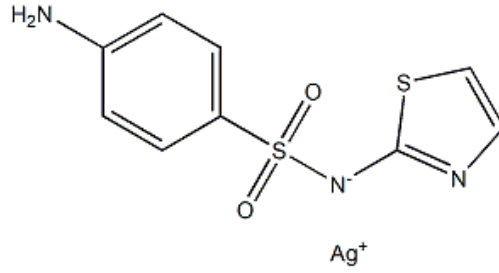
Şekil 2.10. Sülfonamid grubu ilaçların kimyasal yapısı.

1960'larda sentezlenen gümüş sülfadiazin, cilt enfeksiyonlarını önlemek için yanık tedavilerinde kullanılan ilk gümüş sülfonamid bazlı ilaç olmuştur [63]. Gümüş sülfadiazin kimyasal yapı Şekil 2.11.'de verilmiştir. Çoklu hedefleme mekanizması nedeniyle, gümüş bazlı antimikrobiyal ajanlar genellikle bakteriyel direncin üstesinden gelebilmektedir. Gümüşün proteinleri inaktive edebildiği, tiyol gruplarına bağlanabildiği ve stabil bağlar oluşturabildiği gösterilmiştir. Gümüş ayrıca, disülfür bağlarının oluşumuna yol açan katalitik redoks reaksiyonlarında da yer alabilir. Disülfür bağlarının oluşumu, protein ikincil ve üçüncül yapılarında değişikliklere yol açabilir, bu da anahtar enzimlerin inaktivasyonuna sebep olabilir [64]. Modak ve ark., *Pseudomonas aeruginosa*'nın yüksek gümüş sülfadiazin dozlarına maruz bırakılmasını inceleyerek, gümüşün %12'sinin DNA'ya bağlı görüldüğünü gözlemlemiştir [65]. Gümüş iyonları ayrıca bakteri hücre duvarının yapısını değiştirerek hareket kabiliyetinde ve stabilitesinde değişikliklere ve bunu izleyen bakteri ölümüne yol açabilmektedir [66].



Şekil 2.11. Gümüş sülfadiazin kompleksinin kimyasal yapısı.

Sülfatiazol (ST), sülfonamidlerin keşfinden sonra insanlarda kullanılan ilk sülfonamidlerden biriydi. Cilt enfeksiyonlarının tedavisinde diğer ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır. Sülfatiazolün birçok metal kompleksi literatürde bulunmaktadır. Gümüş - ST kompleksinin kimyasal yapısı Şekil 2.12.'de verilmiştir.



Şekil 2.12. Gümüş sülfatiazol kompleksinin kimyasal yapısı.

2.11. Tezin Çalışmasının Amacı ve Hedefi

Bu tez çalışmasında, hacimsel iskelet kası hasarları için polimer bazlı destek malzemelerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. İskelet kası iskelelerinin yüksek hacimde, hizalanmış, biyouyumlu, biyobozunur olması ve iskelet kas hücrelerinin gelişimini ve yönelimini desteklemesi tez çalışmasının temel hedefleridir. Hacimsel iskelet kası hasarına destek olacak hacimde fiber iskele üretimi için bilgisayar destekli Döngüsel Islak Eğirme Düzeneği (DIED) geliştirilmesi amaçlanmıştır. Elektriksel uyarım altında iskelet kas hücrelerinin gelişimini ve yönelimini desteklemek amacı ile gümüş nanotellerin PCL'e katılanması ve in vitro incelemeler yapılması amaçlanmıştır. Tez çalışması kapsamında DIED ile antibakteriyel özelliğe sahip kompozit fiber formülasyonlarının da geliştirilmesi planlanmıştır. Ticari ürün gümüş sülfatiazol kompleksinin mekanizması hipotez alınarak, antibakteriyel ilaç etken madde sülfatiazol - AgNT kompleksi hazırlanması ve etkinliğinin değerlendirilmesi

amaçlanmıştır. Yüksek verimde, hizalanmış, sülfatiazol - AgNT içeren PCL fiberlerin DIED ile üretimi, karakterizasyonu ve antibakteriyel etkinliklerin değerlendirilmesi tezin hedefleri olarak belirlenmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL, Mn: 80000; 25 °C'de yoğunluğu: 1,145 g/mL) Sigma-Aldrich, ABD şirketinden kas iskeletonun temel malzemesi olarak kullanılmak üzere temin edilmiştir. Polivinilpirolidon (PVP, Mw: 55000, toz), Etilen Glikol (EG, \geq %99,8 saflıkta, anhidrus) Sigma-Aldrich, ABD ve gümüş nitrat (AgNO₃, \geq %99,7 saflıkta) Fisher firmalarından, gümüş nanotellerin (AgNT) sentezinde kullanılmak üzere tedarik edilmiştir. Islak eğirme aşamasında PCL çözücüsü olarak aseton (\geq %99,5 CAS No: 67-64-1 Honeywell DIEDel-de Haen), çöktürücü banyosu olarak etanol (\geq 99,9 CAS No: 64-17-5 ISOLAB) kullanılmıştır. Etanol kullanılmadan önce -18 °C'de bekletilmiştir. Antibakteriyel ilaç etken madde olarak sülfatiazol (\geq %98,0 CAS No: 72-14-0, Katalog No: S9876 Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite testleri için American Type Culture Collection (ATCC) standart suşları olan, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 standart suşları kullanılmıştır. Bakteriyel kültür için besiyeri olarak Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco, Detroit, MI) kullanılmıştır. Disk difüzyon testi için, Mueller Hinton Agar (MHA) (Difco, Detroit, MI) basiyeri kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları için, -172 °C'de muhafaza edilen, pasaj 4 C2C12 (CRL-1772™, ATCC, UK) fare myoblast hücre hattı kullanılmıştır. Hücre çoğaltma ve indüklemeye işlemlerinde besiyeri, l-glutamin ve yüksek glikoz içerikli DMEM (Biological Industries, Ref.No: 01-055-1A), %10 fetal sığır serumu (FBS, Biological Industries, Ref.No: 1609757) ve %1 penisilin streptomisin (Biological Industries, Ref.No: BI-03-031-1B) ile hazırlanarak kullanılmıştır. Hücre inkübasyon işlemi T75 hücre kültür şişesinde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin şişeden uzaklaştırılma işleminde, şişe yüzeyini FBS'den arındırmak için PBS çözeltisi (BI, İsrail), hücreleri yüzeyden ayırmak için Tripsin EDTA (Biological Industries, Ref.No: 03-053-1B) kullanılmıştır. Hücre kültürü boyunca canlı hücre sayımı için, %10 Alamar mavisi (AlamarBlue™, Katalog No: DAL1025, Thermo Fisher, ABD), yüksek glikoz içerikli, fenol kırmızısı ve l-

glutamin içermeyen DMEM (Biological Industries, Ref.No: 01-053-1A) kullanılmıştır. Canlı-Ölü hücre boyaması (Thermo Fisher, ABD) için, Kalsein-AM ve Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) işaretleyiciler kullanılmıştır. Biyobozunma çalışmaları için, fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS, toz, pH: 7,4 Firma Stok No: P3813 Sigma-Aldrich, ABD), lipaz enzimi (*Porcine pancreas* Type II, Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır.

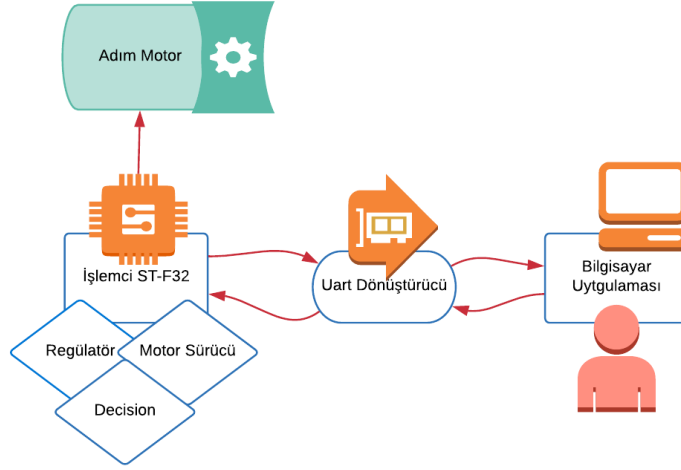
3.1.2. Elektronik Malzemeler

Tez kapsamında geliştirilerek ıslak eğirme yöntemine adapte edilen, çöktürücü banyosuna döngüsel hareket kazandıran cihaz için, STM 32 F işlemci, TMC 2113 motor sürücü kartı, NEMA 11 tip adım motor, PL-2303 USB-UART haberleşme çevirici kart ve adaptör (12 Volt, 2 Amper) malzemeleri kullanılmıştır. Sistem kontrol arayüzü C# ve Phyton programlama dilleri ile hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Döngüsel Islak Eğirme Düzeneği

STM 32 F işlemci, TMC 2113 motor sürücü, NEMA 11 tip adım motor ve PL-2303 USB-UART haberleşme çevirici elemanları, uygun bağlantıları gerçekleştirilerek soğutma özellikli alüminyum kasa içerisine sabitlenmiştir. Motor şaftı (6 mm, D şaft) ile çöktürme havuzu arasındaki bağlantı, şaft adaptörü (30 mm temas yüzeyi çapı) ile sağlanmıştır. Çöktürücü havuzunun, motor tutucusu üzerinde muhafaza edilerek dönmesini sağlamak amacıyla, 10 derece negatif eğime sahip paslanmaz çelik konteyner kullanılmıştır.



Şekil 3.1. DIED düzeneği haberleşme protokolü.

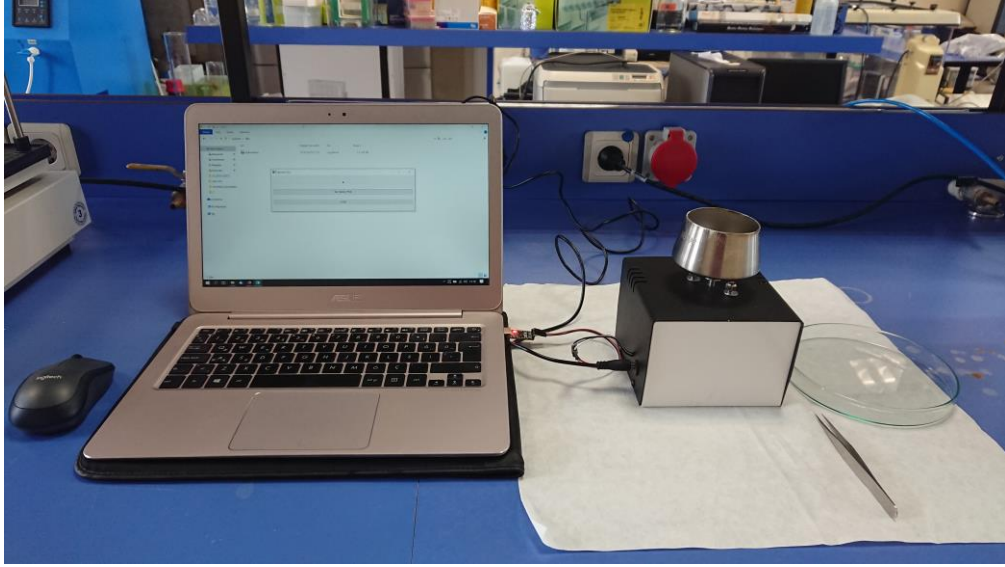
Şekil 3.1.'de temel anlamda DIED düzeneği birimler arası haberleşme protokolü verilmiştir. Genel olarak devre kartı beslemek için DC 12 V adaptör kullanılmıştır. Kart üzerindeki motor sürücü ve diğer entegrelerin beslenmesi 3 V'luk regülâtör aracılığı ile sağlanmıştır. Adım motoru sürebilmek giriş voltajı 12 V'u 27 V'a yükselten 24 V'luk "stem up convertor" entegre kullanılmıştır.

Adım motor elektrik enerjisini dönme hareketine çeviren elektromanyetik cihazlardır. Elektrik enerjisi verildiğinde rotor ve rotora bağlı şaft, sabit açısız birimlerde (adım) dönmeye başlar. Motorun düşük hızlarda da dönebilmesini sağlamak için yazılım ve elektronik tasarımla beraber motordaki kutupların arasında da hareket sağlanmıştır. Böylece daha yüksek maliyetli bir motora ihtiyaç duymadan düşük dönüş hızlarına ulaşılabilmektedir. Bu işleme mikro adım adı verilmektedir ve bu işlem ile oluşan tork kaybı deney düzeneğimiz için önem oluşturacak boyutta olmamaktadır.

İşlemci ile bilgisayar arasındaki haberleşme FT232 uart ile sağlandı. Bilgisayar üzerinde python yazılımı ile hazırlanmış olan arayüz üzerinden dönüş yönü ve % dönüş hızı ayarlanabilmektedir. Hız ve dönüş yönünün belirlenmesinin ardından basılan uygulama komutu FT232 üzerinden işlemciye aktarılır. İşlemci bu komut ile daha önceden motorun karakteristik özelliklerine bağlı olarak belirlediğimiz tabloda karşılığı gelen değer üzerinden motoru sürer.

Adım motorlarda tork değeri uygulanan akım ile belirlenmektedir. Ancak motor karakteristiğine göre değişiklik göstererek, motora uygulanan akım değeri

artıkça motor ısınmakta ve titreşimli bir şekilde çalışmaya başlamaktadır. Bu durum deney esnasında, titreşim ile üretilen fiberlerin formunu bozmakta ve verimsiz çalışman motorun deney düzeneğini ısıtmasına sebep olmaktadır. Bunu önlemek amacıyla deneyler için ihtiyaç duyulan tork değerini sağlayacak akım değeri çok hassas bir şekilde belirlenmiş, uzun süreler ile deney koşulları altında denemeler yapılmıştır. Deney düzeneğinin görüntüsü Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. DIED düzeneği fotoğraf görüntüsü.

3.2.2. Gümüş Nanotellerin Eldesi

Gümüş nanoteller poliol yöntemi ile Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Bölümünde Prof. Dr. Emrah ÜNALAN'ın yönettiği araştırma laboratuvarı bünyesinde sentezlenmiştir. Bu yöntemde gümüş kaynağı olarak gümüş nitrat ($AgNO_3$), stabilize edici polimer olarak polivinilpirolidon (PVP) ve hem çözücü hem de indirgeyici olarak etilen glikol kullanılmıştır. Poliol yönteminde $170\text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklıkta 5 mL EG içerisinde çözünmüş 200 mg PVP ve 3 mg tuz çözeltisine 2.5 mL EG içerisinde çözünmüş 50 mg gümüş nitratın damlatılarak eklenmesiyle işlem gerçekleştirilmiştir. Damlatma işleminin başlamasıyla gümüş nano parçacıklar oluşmakta ve devam edildikçe tek yönlü büyümeyle (PVP yardımıyla) nano parçacıklar gümüş nano tel halini almaktadır. Nano tel olamayan gümüş nano parçacıklar da büyüyerek istenmeyen yan ürünleri oluşturmaktadır. Üretim sırasında çözeltinin renk değiştirmesinden nano parçacık ve nano tel oluşumu takip edilebilmektedir.

3.2.3. İskelet Kası Doku Destek Malzemelerinin Hazırlanması

3.2.3.1. DIED ile PCL Fiberlerin Hazırlanması

Optimizasyon için, farklı molekül ağırlığına sahip PCL polimerleri, çözünme ve fiber formda üretim verimliliği incelenmiştir. Çözünme özellikleri aseton ve kloroform çözücü sistemlerinde farklı derişim ve sıcaklıkta çözümlenerek incelenmiş, çöktürme banyosu sıcaklığının fiber oluşumuna olan etkisi incelenmiştir. Fiber çapları DIED dönüş hızı ve enjektör iğne ucu değiştirilerek belirlenmiştir. Optimum parametrelerde fiber üretim işlemi için 80000 molekül ağırlıklı PCL, aseton içerisinde hacimce %20 olacak şekilde 40 °C sıcak su banyosu varlığında 300 rpm hızda manyetik karıştırıcı ile homojen bir çözelti oluşuncaya kadar yaklaşık 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Homojen çözünmenin oluşumu çözeltinin tamamen şeffaflık kazanmasıyla takip edilebilmektedir. Çözünme işlemi sonrasında PCL-Aseton çözeltisinin tamamı 5ml polipropilen (PP) enjektöre aktarılmış, üretim süresince hava almayacak şekilde muhafaza edilmiştir. -18 °C'de bekletilen etanol, DIED üzerindeki küvete aktarılmış, belirlenen dönüş hızına, bilgisayar tarafından durağan pozisyondan sabit ivme ile ulaşmıştır. Enjektör içerisindeki PCL çözeltisi düz uçlu 22G enjektör iğnesi ile çöktürme havuzuna, havuzun dönme hareketi esnasında sıkılmıştır. Sıkma işleminin bitmesinin ardından havuz, sabit ivme ile bulunduğu hızdan durağan pozisyona getirilmiştir. Oluşan fiberler banyo küveti ile birlikte -18 °C'de 24 saat boyunca muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. PCL molekül ağırlığı ve çözelti derişimi optimizasyonu oranları

Örnek	PCL Ortalama Molekül Ağırlığı (kDa)	Polimer / Çözücü Oranı % (w/v)
PCL10kDa	10	20
PCL60kDa	60	20
PCL80kDa-10	80	10
PCL80kDa-15	80	15
PCL80kDa-20	80	20

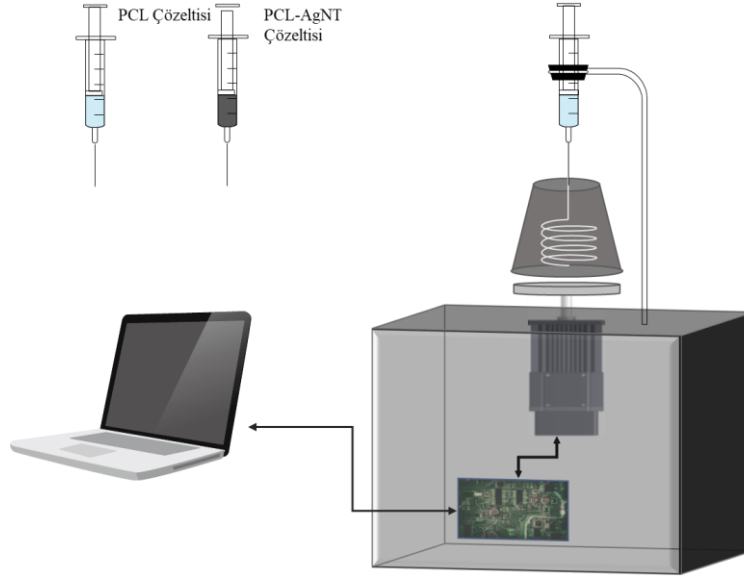
3.2.3.2. DIED ile PCL-AgNT Fiberlerin Hazırlanması

Etanol içerisinde disperse halde bulunan AgNT'ler, etanol içerisinde ayrılarak, PCL için çözücü olarak kullanılan aseton içerisinde dağıtılmıştır. Belirli hacimde AgNT-etanol dispersiyonu 50 mL'lik falkon içerisinde alınmış ve 7000 rpm hızda, 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonunda dibe çöken AgNT'lerin tekrar dağılmasını önleyecek şekilde hassasça etanol falkondan uzaklaştırılmış, hemen akabinde belirlenen hacimde aseton AgNT'lerin üzerine eklenmiştir. PP enjektör içerisinde alınmış PCL ve PCL-AgNT çözeltilerine ait görüntüler Şekil 3.3.'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Aseton içerisinde çözülmüş PCL ve PCL-AgNT çözeltileri.

Aseton içerisinde çözülmüş olan PCL çözeltisi içerisinde, AgNT-aseton dispersiyonu oda sıcaklığında pipet yardımı ile damlatılarak manyetik karıştırıcı ile 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Çözelti PP enjektör içerisinde (Şekil 3.3.) alınmış ve bilgisayar kontrollü DIED yardımı ile fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem ile hazırlanan kompozit fiber kompozisyonları Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Bilgisayar kontrollü DIED ile fiber üretimine ait şematik gösterim, Şekil 3.4.'de sunulmuştur.



Şekil 3.4. Bilgisayar kontrollü DIED ile fiber üretimine ait şematik gösterim.

3.2.4. Antibakteriyel Özellikte Fiberlerin Hazırlanması

3.2.4.1. DIED ile Sülfatiazol Yüklü PCL Fiberlerin Hazırlanması

Sülfatiazol (ST), aseton içerisinde oda sıcaklığında homojen bir şekilde hızla çözülebilmektedir. ST oda sıcaklığında, nemsiz ortamda kapaklı cam şişe içerisinde muhafaza edilmektedir. ST, PCL ile ağırlıkça %1, %5 ve %10 derişimler oluşturacak miktarlarda hassas teraziyile tartılmış, aseton içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile 30 dakika sürede tamamen çözülmesi sağlanmıştır. Belirli hacimdeki ST çözeltisi, aseton içerisindeki PCL'e pipet yardımı damlatılarak ile manyetik karıştırıcıda 1 saat süresince 40 °C sıcaklıkta karıştırılmıştır. Hazırlanan çözeltide PCL %20 (w/v) derişimdedir. Film örnekler çözücü döküm yöntemi ile hazırlanmıştır. Fiber örnekler hazırlanırken, PCL-ST aseton çözeltisi PP enjektör içerisinde aktarılmış, üretim süresince hava almaması sağlanmıştır. Belirlenen dönüş hızında, DIED üzerinde 23G enjektör iğnesi ucu ile -18 °C etanol çöktürücü banyosuna enjekte edilerek fiber üretimi gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.2. DIED ile Sülfatiazol - Gümüş Nano Tel Yüklü PCL Fiberlerin Hazırlanması

Gümüş sülfadiazin piyasa preparatından esinlenerek sülfatiazol - gümüş nano tel (ST- AgNT) kompleksi hazırlanmış ve %20 (w/v) PCL çözeltisine eklenmiştir. Sülfatiazol PCL ile ağırlıkça %10 derişim oluşturacak miktarda tartılmış ve

aseton içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile 30 dakika sürede tamamen çözülmesi sağlanmıştır. Bu ST çözeltisi içerisinde ağırlıkça %2 AgNT (asetona disperse) eklenip karıştırılmıştır. Belirli hacimdeki ST-AgNT çözeltisi, %20 PCL (w/v) derişim olacak şekilde aseton içerisindeki PCL çözeltisine yavaş yavaş damlatılarak ile manyetik karıştırıcıda 1 saat süresince 40 °C sıcaklıkta karıştırılmıştır. Film numuneler çözücü döküm yöntemi ile oda sıcaklığında kurutularak hazırlanmıştır. Fiber numunelerin hazırlanması için, aseton içerisindeki PCL-ST-AgNT çözeltisi PP enjektör içerisinde aktarılmış, üretim süresince hava alması engellenmiştir. Belirlenen dönüş hızında, DIED üzerinde 23G enjektör iğnesi ucu ile -18°C etanol çöktürücü banyosuna enjekte edilerek fiber üretimi gerçekleştirilmiştir.

3.3. Karakterizasyon Yöntemleri

Kimyasal ve termal karakterizasyonlar için PCL, PCL-AgNT, PCL-ST, PCL-ST-AgNT film numuneler kullanılmıştır. Film numuneler fiberler ile aynı kompozisyona sahip olacak şekilde çözücü döküm yöntemi ile hazırlanmıştır.

3.3.1. Morfolojik Karakterizasyonlar

Numunelerin morfolojik incelemeleri ODTÜ, Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü bünyesindeki, Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM, FEI Nova, Nano SEM 430, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Enerji Yayılımlı X-Işını (EDX) dedektörü ile numunelerin elemental analizi yapılmıştır. SEM incelemesi için uygun boyutlarda hazırlanan numuneler, çift taraflı karbon bant ile örnek tutucularına yerleştirilmiş, yüzeyleri 5-10 nm kalınlığında altın-paladyum kaplanmıştır.

3.3.2. Kimyasal Karakterizasyonlar

PCL, ST antibakteriyel ilaç etken maddesinin ve PCL-Ag NW, PCL-ST, PCL-ST-AgNT kompozit örneklerin kimyasal yapısı Hacettepe Üniversitesi, HÜNİTEK bünyesindeki Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR, Thermo Nicolet IS50, ABD) kullanılarak incelenmiştir. Tüm analizler KBr kristalli ATR ataçmanı ile 600-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında ve 4 cm⁻¹ çözünürlükte, 16 tarama sayısı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. Termal Karakterizasyon

3.3.3.1. Termogravimetrik Analiz

İlaç etken madde ST ve diğer numunelerin termal bozunma davranışları Hacettepe Üniversitesi, HÜNİTEK bünyesindeki Termogravimetrik Analizör (TGA, TA Instruments Q600 SDT, ABD) ile azot atmosferinde, 10 °C/dak ısıtma hızında ve 25-500°C sıcaklık aralığında incelenmiştir.

3.3.3.2. Simultane Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi

Numunelerin ısı özellikleri ve ısı geçişler (camsı geçiş sıcaklığı T_g, erime sıcaklığı T_m ve ısı bozunma sıcaklıkları T_d) Hacettepe Üniversitesi, HÜNİTEK bünyesindeki Simultane Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (Simultane DSC, TA Instruments Q600 SDT, ABD) ile incelenmiştir. Analizler, azot atmosferinde, 10 °C/dak ısıtma hızında ve 25-500 °C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiştir.

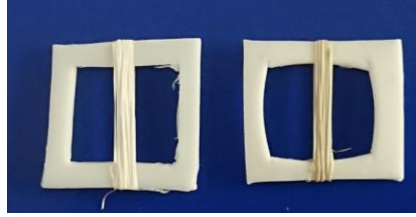
3.4. Biyobozunma Çalışmaları

PCL, PCL-AgNT, PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiberlerin biyobozunma çalışmaları enzimatik ve hidrolitik ortamda 7 gün süresince gerçekleştirilmiştir. Biyobozunma çalışmaları, optimum özelliklere sahip olan PCL, PCL-AgNT, PCL-ST ve PCL-ST-AgNT örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. Fiberler hassas terazide tartılarak, yaklaşık 70 mg ağırlıkta olacak şekilde kesilerek hazırlanmıştır. Hidrolitik biyobozunma çalışmaları 37 °C'de, 5 mL PBS (1.0 M, pH 7.4 5mL, % 0.02 sodyum azit) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Enzimatik biyobozunma çalışmaları, 5 mL PBS içerisine 0.5 mg lipaz eklenerek enzimatik ortam hazırlanmıştır. Her 24 saatte bir, örneklerin içerisinde bulunduğu çözeltiler ve enzimatik ortam yenisiyle değiştirilmiştir. Tartım işleminden önce örnekler çözeltiden uzaklaştırılmış, distile su ile yıkanmış, tamamen kuruduktan ve sonrasında tartılmıştır. Biyobozunma çalışmaları n=3 tekrar çalışılmıştır. Numunelerdeki biyobozunma miktarları, numunelerin kurutulmuş ve başlangıç ağırlıklarının karşılaştırılması ile gravimetrik olarak belirlenmiştir. Enzimatik ortamda biyobozunmaya uğrayan örneklerin morfolojik değişimleri, 21 gün sonunda SEM analizi ile incelenmiştir.

3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

PCL ve PCL-AgNT fiberleri için, iskelet kası doku mühendisliği çalışmalarına yönelik kullanımlarının araştırılması amacıyla hücre kültürü çalışmaları Ankara Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümünde Doç. Dr. Pınar Yılgör Huri yönettiği araştırma laboratuvarı bünyesinde gerçekleştirilmiştir.

Hücre ekiminden önce fiberler, 1x1cm boyutlu ortası boş teflon çerçevelere, sıkı bir şekilde ve her bir çerçevede eşit sayıda sarım olacak şekilde sarılmıştır. Şekil 3.5.'de teflon çerçevelere sarılmış fiberlere ait görüntü verilmiştir.



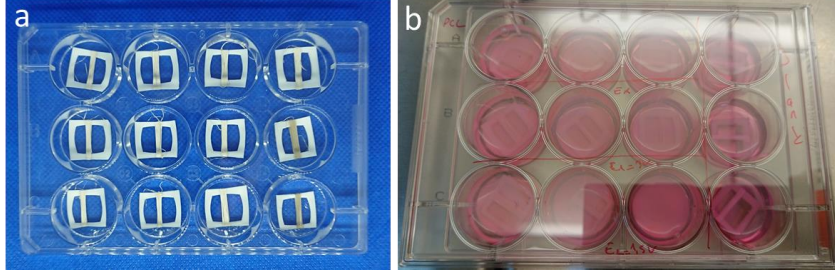
Şekil 3.5. Teflon çerçevelere sarılmış PCL ve PCL-AgNT fiber görüntüleri.

Sıvı azot tankında muhafaza edilen 4. pasaj C2C12 hücreleri hızla 37 °C'de DMEM ile karıştırılıp 250 rpm hızda, 5 dakika boyunca santrifüj edilerek dondurma çözeltisinden arındırılmıştır. Hücreler T75 hücre kültürü şişesi içerisinde 7 gün süre ile 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir.

Numunelerin %70 etanol içerisinde 1 gün süreyle çalkalayıcı cihazı üzerinde bekletilerek sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücre ekimi öncesi numuneler laminar akış kabini içerisinde, 12 kuyucuklu kültür kaplarına aktararak 30 dakika boyunca kurumaları için beklenmiştir (Şekil 3.6.a).

Besiyeri, %10 FBS, %1 PS ve yüksek glikozlu DMEM ile hazırlanmıştır. Her 48 saatte bir besiyeri yenisi ile değiştirilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler kültür şişesi yüzeyinden, fiber yüzeyine ekilmek üzere kaldırılmıştır. Hücrelerin yüzeyden kaldırması işlemi için şişe içerisinde besiyeri uzaklaştırılmıştır. Yüzey PBS çözeltisi ile yıkanarak FBS'den arındırılmıştır. 3 mL %0.1 Trypsin-EDTA çözeltisi şişe içerisinde aktararak yukarı aşağı hareketlerle tüm şişe yüzeyine yayılması sağlanmış ve 5 dakika bekletilmiştir. 6 mL besiyeri şişeye eklenmiştir. Şişe içerisindeki toplam karışım 15 mL'lik falkon tüpüne aktararak 5 dakika sürede 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Tüpün dibine çöken hücre peleti etkilenmeyecek şekilde üstte kalan çözelti ayrılmıştır.

Hücre peleti, yeni besiyeri içerisine pipet ile çek bırak yapılarak dağıtılmıştır. PCL ve PCL-AgNT fiberlerin sarılı olduğu çerçevelerin ön ve arka olmak üzere her iki yüzeyine 50000'er hücre, toplamda her iki yüzeyde 100000 hücre ekimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5.b).



Şekil 3.6. Hücre ekimi öncesi (a) ve sonrası (b) numuneler.

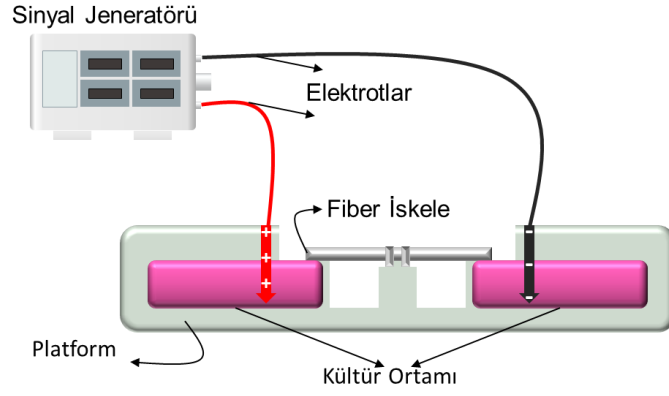
7 gün boyunca 12 kuyucuklu kültür kaplarında, yüksek glikoz içerikli DMEM içerisinde %10 FBS ve %1 PS besiyerinde, 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Hücre Kültürü Elektriksel Uyarım Çalışmaları

Elektriksel uyarım çalışmaları, 6 farklı grupta incelenmiştir (Çizelge 3.2.). Elektriksel uyarım sinyal jeneratörü aracılığı ile sağlanmış, elektriksel bağlantının çıkışına eklenen bir direnç üzerinden osiloskop yardımı ile uygulanan parametreler gözlenmiştir. Şekil 3.7.'de elektriksel uyarımın sağlandığı deney şematığı gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Hücre kültür çalışmaları deneysel gruplar.

Deneysel Grup	Gerilim (Volt)	Frekans (Hz)	Sinyal Genişliği (ms)
PCL - E ₀	0	3	1
PCL - E _{1.5V}	1.5	3	1
PCL - E _{3V}	3	3	1
PCL-AgNT - E ₀	0	3	1
PCL-AgNT - E _{1.5V}	1.5	3	1
PCL-AgNT - E _{3V}	3	3	1



Şekil 3.7. Hücre kültürü elektriksel uyarım düzeneği şematik gösterimi.

3.5.2. Hücre Canlılık Testi (alamarBlue®)

Hücre kültürü süresince hücre ekiminden sonraki 1. gün ve 7. gün sonunda metabolik olarak aktif (canlı) hücre sayısı alamarBlue testi ile belirlenmiştir. Renksiz DMEM içerisinde %10 derişimde alamarBlue çözeltisi hazırlanmıştır. Kuyucuklar içerisindeki ortam uzaklaştırılıp, steril PBS ile yıkanmıştır. Ardından hazırlanan alamarBlue çözeltisi her bir kuyucuğa eklenmiş, 1 saat süreyle inkübatöre (37 °C, %5 CO₂, nem) yerleştirilmiştir. Tüm işlemler karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Sürenin sonunda her kuyucuktan 3'er adet 200 µl örnek alınarak 96 kuyucuklu plak içerisine aktarılmıştır. Mikroplaka okuyucusunda (Elisa Plate Reader), 570 nm ve 595 nm dalga boyunda, kuyucukları ait absorbans değerleri belirlenmiştir. Daha sonra 12 kuyucuklu plalarda bulunan alamarBlue test çözeltisi uzaklaştırılmış, kuyucuklar PSB ile yıkanmış ve normal besiyeri eklenerek kültüre devam edilmiştir. Test sonunda elde edilen absorbans değerleri, kalibrasyon eğrisi yardımıyla canlı hücre sayısına çevrilmiştir.

3.5.3. Hücrelerdeki Morfolojik Değişimlerin İncelenmesi

3.5.3.1. Canlı-Ölü Boyaması

Fiberler üzerinde 7. güne ait canlı ve ölü hücrelerin görüntülenmesi ve hücre morfolojisinin incelenmesi için Canlı-Ölü Kit boyaması yapılmıştır. 10 mL steril PBS içerisinde 2 µM Kalsein-AM ve 4 µM Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) işaretleyici çözeltileri hazırlanmıştır. Canlı ve ölü hücreler sırasıyla Kalsein ve EthD-1 ile işaretlenmiştir. İşaretleme işleminden önce örnekler, temiz kuyucukları aktarılıp, steril PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra işaretleyici çözeltiler

örneklerin bulunduğu kuyucuklara aktarılmış, 20 dakika süre ile inkübatörde bekletilmiştir. Tüm işlemler karanlık ortamda yapılmış, örnekler analiz sonuna kadar ışıktan korunmuştur. İnkübasyon süresi sonunda işaretleme çözeltisi steril PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminin hemen sonrasında örneklere ait görüntüleme, Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (Leica TCS SP2) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Kalsein ve EthD-1 ile işaretlenmiş canlı ve ölü hücrelerin görüntülenmesi sırasıyla 488 nm ve 528 nm dalga boyundaki lazerler ile sağlanmıştır.

3.5.3.2. Hücre Morfolojilerinin Taramalı Elektron Mikroskobu İncelenmesi

PCL ve PCL-AgNT kompozit fiberler ile etkileşen hücrelerin morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, FEI Nova, Nano SEM 430) ile incelenmiştir. PCL ve PCL-AgNT fiberler üzerinde 7 günlük C2C12 fare myoblast hücre kültürü çalışmasının sonunda elektriksel uyarımın yapıldığı ve yapılmadığı örnek gruplarından alınan fiber iskeleler, PIPES tampon ile yıkanmış ardından kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tamponunda hazırlanan %3.7 (w/v) paraformaldehit ile 30 dakika boyunca fikse edilmiştir. Örnekler SEM analizi gerçekleştirilene kadar PIPES içerisinde, +4 °C'de saklanmış, analiz öncesi sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %100 derişimlerde etil alkol çözeltilerinden 20'şer dakika geçirilerek örneklerin oda sıcaklığında kurutulması sağlanmıştır. Kuru örnekler SEM analizi için örnek tutuculara yerleştirilmiştir. Analiz için gerekli olan yüzeyin altın kaplama işlemi gerçekleştirildikten sonra örnekler SEM ile incelenmiştir (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. SEM analizi için hazırlanan yüzeyi altın kaplanmış hücreli örnekler.

3.6. Mikrobiyoloji Çalışmaları

3.6.1. Disk Difüzyon Testi

PCI, PCL-AgNT, PCL-ST, PCL-ST-AgNT film ve fiberlerin *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 standart suşlarında antibakteriyel etkinlikleri disk difüzyon testi Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi baz alınarak yapılmıştır [67]. Hazırlanan Mueller Hinton Agar (MHA) (Difco, Detroit, MI) besiyerinden 25 mL her petriye dağıtılmıştır. Testin yapılacağı gün her besiyerinin kuruluşundan emin olduktan sonra kullanılmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonları steril eküvyon çubukları ile MHA besiyerine yoğun ekim yöntemiyle ekilmiştir. Fiber ve filmler için kullanılan konsantrasyonda gümüş nanotel ve sülfatiazol antibakteriyel ilaç etken maddesi 6 mm çapındaki steril kağıt disklere emdirilmiş ve kurumaları beklenmiştir. Film, fiber ve diskler aralarında yeterli mesafe bırakılarak inoküle edilmiş MHA plaklarına yerleştirilmiştir. Daha sonra plaklar 35 °C'de 18 saat inkübe edilmiş, ertesi gün oluşan bölgesel açılma çapları belirlenerek ölçümleri yapılmıştır.

3.6.2. Bakteriyel Tutunma Testi

S. aureus ATCC 29213 ve *E. coli* ATCC 25922 bakterileri Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerinde 24 saat 37 °C'de inkübe edilerek üretilmiştir. Taze bakteri kültürleri, PBS içerisinde süspansiyon edilerek 0.5 McFarland bulanıklığa denk gelecek şekilde hazırlanmıştır (1×10^8 cfu/mL). Daha sonra 1/10 sulandırılarak 10^7 cfu/mL bakteri süspansiyonu tutunma deneyinde kullanılmıştır. Fiber numuneler her biri ayrı kuyucukta olacak şekilde, doku kültür kabına yerleştirilmiştir. Her bir örneğin bulunduğu kuyucuğa 1 mL hazırlanan bakteri süspansiyonu eklenmiş, 37°C'da 4 saat 110 rpm'e ayarlanmış olan çalkalayıcı inkübatörde bekletilmiştir. İki kuyucuk besiyeri ve üreme kontrolü olarak kullanılmıştır. Bu süre sonunda bakteri çözeltisi atılmış, fiber yüzeyine tutunmayan bakterilerin tamamen uzaklaştırılması için her örnek PBS ile 3'er defa yıkanmıştır [68]. Yüzeye tutunmayan bakterilerin tamamen uzaklaştırılmasının ardından örnekler 1 mL PBS içerisine alınıp yüzeye tutunmuş bakterilerin çözeltiliye geçmesi için 10 dakika ultrasonik banyoda ve

ardından 1 dakika vortekste tutulmuştur. PBS çözeltisi ile seri seyreltme işlemleri yapıp canlı bakteri sayılarının belirlenmesi için TSA besiyerine yayma yöntemi kullanılarak 100 µL ekilmiştir. 4 saat, 37°C'de etüvde bekletilen besiyerlerinde üreyen koloniler sayılmıştır. Besiyerlerinde üreyen koloni sayısı ve ilgili seyreltme faktörü kullanılarak ortamda bulunan bakteri sayısı hesaplanmıştır. Tüm deneyler her bir bakteri için 2 paralel, 2 tekrarlı yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Ek olarak, tutunmayan bakterilerin PBS ile yıkama işlemi sonrasında örnekler kakodilat tamponu (0.1 M, pH 7.4) ile hazırlanan %2.5'lik (v/v) gluteraldehit içinde oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir [69]. Bu işlem sonrasında gluteraldehitin uzaklaştırılması için numuneler, kakodilat tamponu ve deiyonize suyla sırasıyla 3'er defa yıkanmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan örnekler SEM ile incelenmiştir. Deney steril koşullarda, steril çözeltiler ve malzemelerle gerçekleştirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

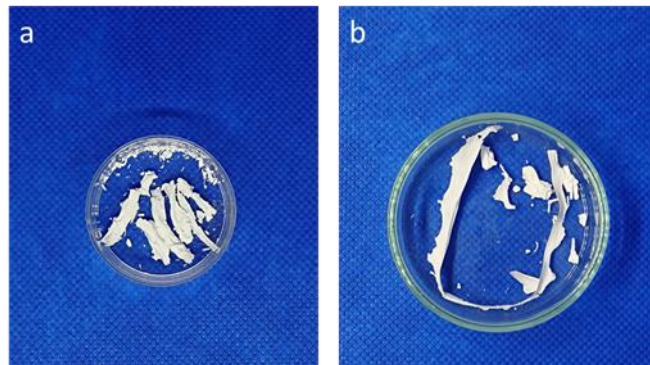
Bu tez çalışmasının ilk bölümünde, bilgisayar kontrollü döngüsel ıslak eğirme düzeneği ile gümüş nano tel katkı, biyobozunur ve biyouyumlu özelliklerde PCL bazlı fiber formda iskelet kası doku destek iskelelerinin elde edilmesi amaçlanmıştır. Tezin ikinci bölümünde antibakteriyel ilaç etken maddesi ST'nin PCL ve PCL-AgNT film, fiber kompozisyonlarına eklenmesiyle, malzemelere antibakteriyel özellik kazandırılması hedeflenmiştir. Üretilen tüm bu malzemelere ait karakterizasyon sonuçları tartışmalar ile beraber bu bölümde sunulmuştur.

4.1. Döngüsel Islak Eğirme Düzeneği ile Fiber Üretim Optimizasyonu

Bilgisayar kontrollü DIED ile yüksek verim ve fiziksel bütünlükte PCL, PCL-AgNT, PCL-ST ve PCL-ST-AgNT için fiber üretiminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. PCL molekül ağırlığı, çözücü sistemi, çöktürme banyosu sıcaklığı, PCL derişimi ve kompozit fiberler için AgNT derişimi optimize edilmiştir.

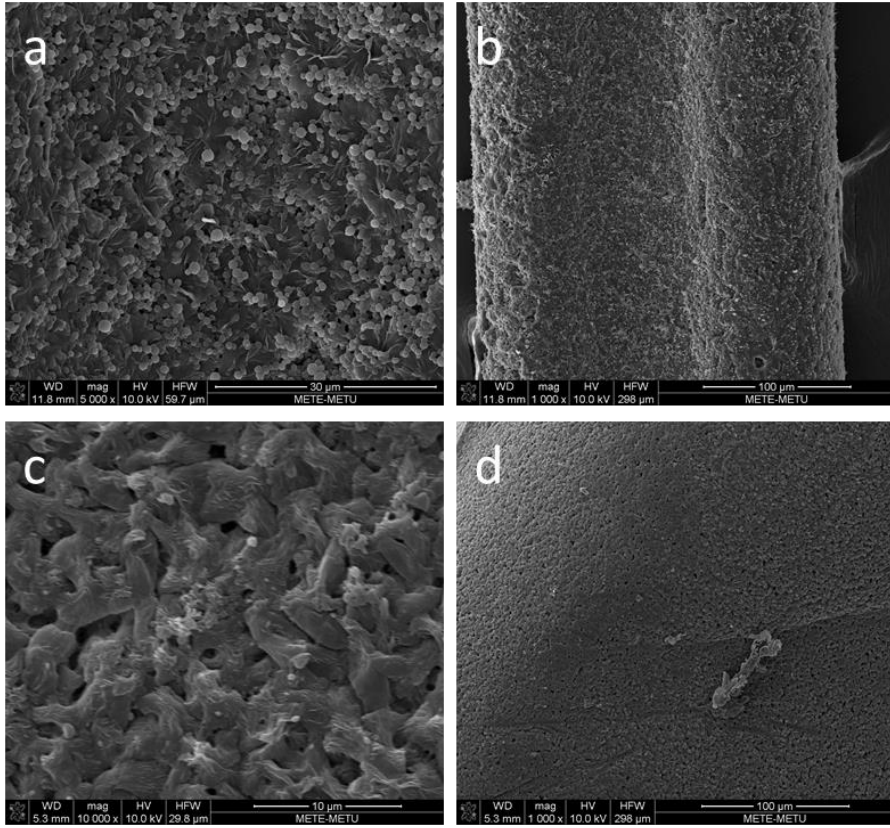
4.1.1. PCL Molekül Ağırlığının Optimizasyonu

PCL optimum molekül ağırlığının belirlenmesinde Çizelge 3.1.'de gösterildiği gibi 10 kDa, 60 kDa ve 80 kDa M_n sahip PCL ile fiber üretim çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen fiberlerin görüntüleri Şekil 4.1., Şekil 4.3.- 4.7.'de sunulmuştur. Şekil 4.1.'de gösterildiği gibi 10 kDa ve 60 kDa M_n sahip sırasıyla PCL10kDa ve PCL60kDa'nun DIED ile fiber oluşumu sağlanamamıştır.



Şekil 4.1. Düşük molekül ağırlıklara sahip parçalanmış PCL fiber yapıları görüntüsü. (a) PCL10kDa, (b) PCL60kDa

10 kDa ve 60 kDa molekül ağırlıklı polimerlerin ağırlıkça %20 oranında aseton veya kloroform çözücülerde tamamen çözünmelerinin ardından, -18°C de soğutulan çöktürme havuzuna yönlendirildiklerinde fiziksel bütünlüklerini kaybettikleri ve kırılğan, kül gibi oluşumlar meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.1.). Bunun nedeni PCL'in 10 kDa ve 60 kDa gibi düşük molekül ağırlığında zayıf mekanik özelliklere sahip olmasıdır. Düşük molekül ağırlıklarında, kristallinite mevcut olmasına rağmen polimer zincirleri zayıf Van der Waals kuvvetleri tarafından gevşek bir şekilde bağlanır ve zincirler düşük mukavemet göstererek kolayca hareket edebilir. Yüksek molekül ağırlıklarında ise zincirlerin uzaması, birbirleri arasında daha sıkı ve dolaşık bir yapı oluşturmaları polimerin mekanik özelliklerini artırıcı etkide bulunmaktadır [5]. PCL10kDa ve PCL60kDa ile elde edilen parçalanmış fiber yapılarının SEM görüntüleri Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. PCL10kDa ve PCL60kDa parçalanmış fiber yapılarına ait SEM görüntüleri. (a) PCL10kDa 5000x büyütme, (b) PCL10kDa 1000x büyütme, (c) PCL60kDa 10.000x büyütme, (d) PCL60kDa 1000x büyütme.

PCL10kDa numunesine ait Şekil 4.2.a'da verilen SEM görüntüsünde polimerin döngüsel çöktürme ortamında soğuk kötü çözücü içinde küresel formda çöktüğü gözlenmektedir. PCL10kDa numunesine ait 1000 büyütme SEM görüntüsünde tüm yüzeyinde homojen küresel oluşumlar olduğu görülmektedir (Şekil 4.2.b). PCL60kDa örneğine ait Şekil 4.2.c'de verilen SEM görüntüsünde polimerin aglomere yapılar oluşturarak çöktüğü görülmektedir. Aynı büyütmedeki PCL10kDa ve PCL60kDa numunelerine ait SEM görüntüleri (Şekil 4.2.b,d) karşılaştırıldığında PCL60kDa yüzeyinin, PCL10kDa yüzeyine göre daha az pürüzlü bir morfoloji sergilediği görülmektedir.

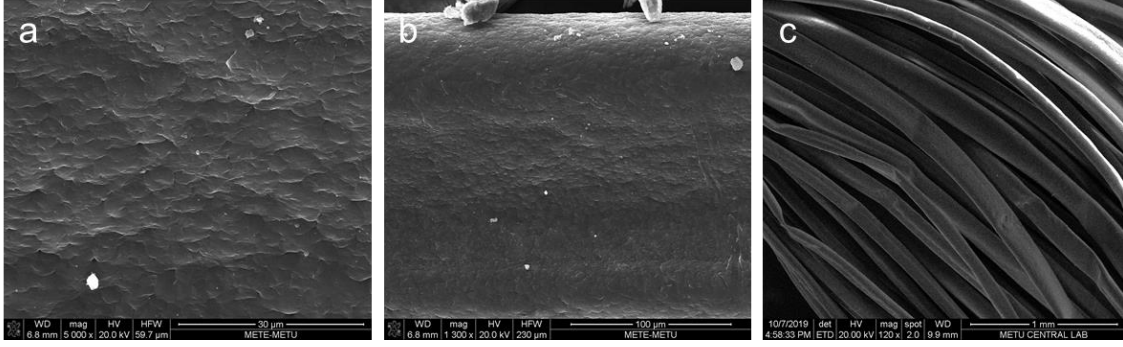
Daha yüksek ortalama molekül ağırlığına sahip PCL80kDa ile fiber üretimi verimli şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.3.'de PCL80kDa ile üretilmiş, yaklaşık 500 cm uzunluğa sahip fiber demeti sunulmuştur.



Şekil 4.3. Yüksek molekül ağırlıkta fiziksel bütünlüğe sahip, PCL80kDa fiber iskele görüntüsü.

Şekil 4.1.'deki ve Şekil 4.3.'deki görüntüler karşılaştırıldığında, PCL10kDa ve PCL60kDa numunelerinden fiber yapıları elde edilememişken, PCL80kDa ile fiziksel bütünlükte ve yüksek verimlilikte fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu farklılık, polimerin molekül ağırlığının fiziksel ve mekanik özelliklere etkisinden kaynaklanmaktadır. Polimer molekül ağırlığının artması, daha uzun polimer zincirlerin birbirleri ile daha sıkı bir arada bulunmalarını sağlar ve bu durum mekanik özelliklerin artmasına sebep olur.

PCL80kDa ile elde edilen fiber yüzeyine ait SEM görüntüleri Şekil 4.4.'de verilmiştir. Fiber demetinden alınan SEM görüntüsünde, üretim sonrası düzenli şekilde toplanmış yaklaşık 20 adet fiber görülmektedir (Şekil 4.4.c).



Şekil 4.4. PCL80kDa fiber yüzeyine ait SEM görüntüleri. (a) PCL80kDa 5000x büyütme, (b) PCL80kDa 1000x büyütme. (c) PCL80kDa 100x büyütme.

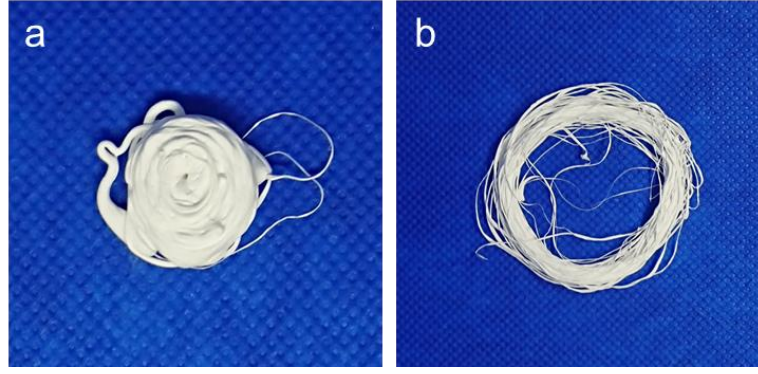
PCL80kDa fiber yüzeyi (Şekil 4.4.a-b) PCL10kDa ve PCL60kDa (Şekil 4.2.) yapılarına göre daha pürüzsüz yüzey morfolojisine sahiptir. Yüzey pürüzlülüğü, hücre çalışmalarında hücresel tutunma ve yönlenmeye yardımcı olsa da, fiber mekanik özelliklerinde istenmeyen varyasyonlara sebep olduğu bilinmektedir [70], [71].

Fiber yapıların elde edilmesinde, çöktürme banyosunun döngüsel hareket etmesinin etkisi olmuştur. Çöktürme banyosunun dönüşü enjektör ucundan sıkılan polimerin çekilmesini sağlamış bu durum da moleküler zincir hizalanmasına sebep olmuştur [72]. Böylece yüzey homojenliği artmış fiberlerin eldesi sağlanmış ayrıca ek bir işlem gerektirmeden kullanıma hazır bir şekilde toplu fiber demeti elde edilmiştir.

4.1.2. Çözücü Sistem Optimizasyonu

PCL fiber yapıların elde edilmesinde çözücü sistemi olarak, aseton ve kloroform kullanılmıştır. PCL80kDa-15 kloroform içerisinde oda sıcaklığında 300 rpm'de hızla çözünürken, aynı miktardaki polimer aseton içerisinde 45 °C'de, 300 rpm'de karıştırılarak yaklaşık iki saat içerisinde çözünmüştür.

Şekil 4.5.'de, kloroform ve aseton çözücüleri ile hazırlanan PCL80kDa-15 çözeltilerinin, 4 °C sıcaklıktaki çöktürme banyosuna sıkımından elde edilen yapılara ait görüntüler verilmiştir.

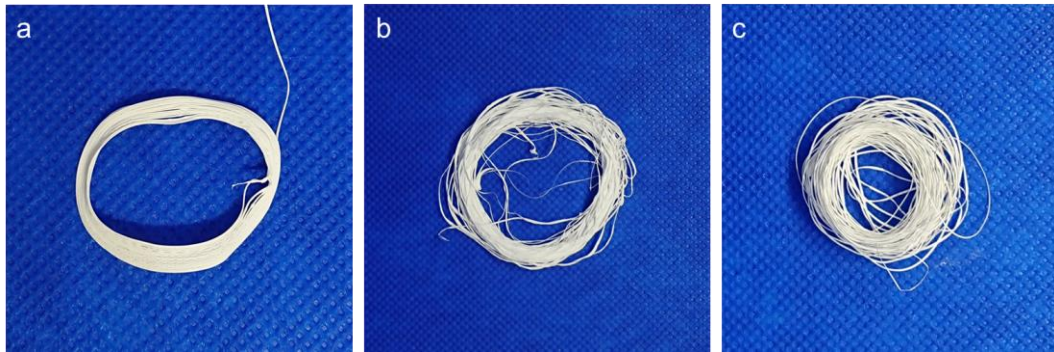


Şekil 4.5. Çözücü sisteminin fiber oluşumuna etkisi. (a) PCL-kloroform çözeltisi ile 4°C'de etanol çöktürme banyosu. (b) PCL-aseton çözeltisi ile 4°C'de etanol çöktürme banyosu.

Kloroformun asetona oranla daha az uçuculuğa sahip olması, çözelti çöktürme banyosuna sıkıldığında kloroformun zor uzaklaşmasına sebep olmuş dolayısı ile polimer form kazanamadan çökmüştür (Şekil 4.5.a,b). Aseton çözücü sistemi ile hazırlanan PCL80kDa-15 çözeltisi aynı koşullardaki çöktürme banyosuna sıkıldığında ise fiber form kazanımı sağlanmış ancak çöktürme banyosunun yeterince soğuk olmamasından dolayı birbirine yapışık fiberler elde edilmiştir. Bu yüzden çözücü sistem olarak aseton tercih edilmiştir. Çöktürme banyosunun sıcaklığı üzerinde optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür.

4.1.3. Çöktürme Banyosu Sıcaklığı Optimizasyonu

Şekil 4.6.'da çöktürme banyosunun 24 °C, 4 °C ve -18 °C sıcaklıklarda oluşunun fiberlerin eldesine etkisi gösterilmiştir.



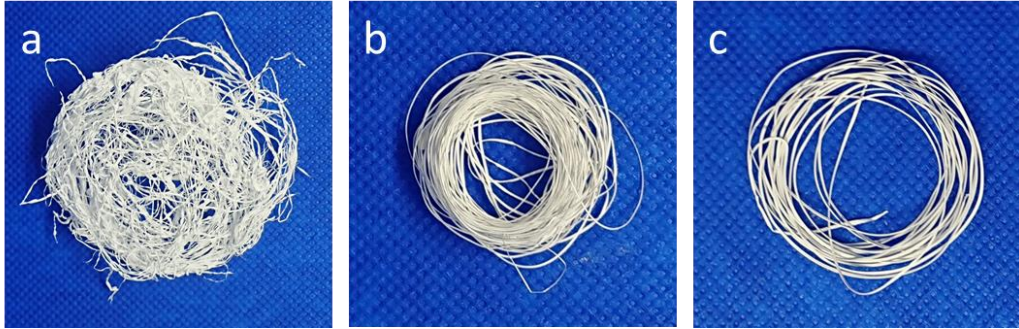
Şekil 4.6. Çöktürme banyosu sıcaklığının fiber oluşumuna etkisi. (a) 24 °C (b) 4 °C (c) -18 °C.

24 °C ve 4 °C'deki etanol sıcaklığında, PCL80kDa-20-aseton çözeltisi ile fiber üretimi denendiğinde polimerin yeterince hızlı katılaşmadığı, bu neticede Şekil

4.6.a-b'de görüldüğü gibi, katı büyük parçalar ve iç içe yapışık fiberlerin oluştuğu gözlenmiştir. -18 °C'ye soğutulmuş hazırlanan çöktürme banyosuna PCL80kDa-20-aseton çözeltisi sıkılması ile fiberlerin birbirine yapışmadan çökmesi sağlanmıştır (Şekil.4.6.c). Islak eğirme tekniği ile fiber üretiminde, iyi çözücü içerisinde tamamen çözünerek oluşturulan viskoz çözelti belirli çaptaki uçtan sıkılarak akışkan filaman formunda çöktürme banyosuna aktarılmaktadır. Bu işlem esnasında, oluşan akışkan filamandan çöktürme banyosuna ve çöktürme banyosundan filamana iki yönlü difüzyon hareketi gerçekleşir. Bu neticede polimer form kazanarak katılaştır. Katılaşma işleminin sağlanmasında gerekli olan difüzyonun gerçekleşmesinde, çöktürme banyosu sıcaklığı etkili rol oynamaktadır [73,74].

4.1.4. Polimer Derişim Optimizasyonu

Şekil 4.7.'de, besleme çözeltisi konsantrasyonunun homojen fiber üretime etkisi gösterilmiştir.

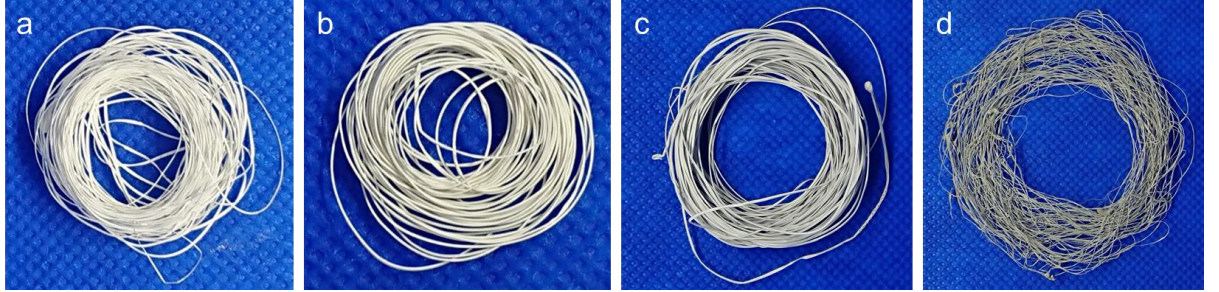


Şekil 4.7. Besleme çözeltisi polimer derişiminin fiber üretime etkisi. (a) PCL80kDa-10 (b) PCL80kDa-15 (c) PCL80kDa-20.

Farklı polimer derişimlerinde PCL-Aseton çözeltileri PCL80kDa-10, PCL80kDa-15 ve PCL80kDa-20 için fiziksel bütünlükte fiber üretim verimlilikleri incelenmiştir. %10 (w/v) derişime sahip PCL80kDa-10 çözelti yoğunluğunun yeterli olmaması sebebi ile çöktürme banyosunun dönüşü esnasında kopmalar meydana gelmiş, bütün fiber oluşumu sağlanamamıştır. %15 (w/v) derişime sahip PCL80kDa-15 ile çöktürme banyosunun 35 rpm dönüş hızında, yüksek verimde tek parça fiber üretimi kolaylıkla sağlanmıştır. %20 derişimde PCL80kDa-20 ile çöktürme banyosunun 50 rpm dönüş hızında tek parça fiber üretimi yüksek verimde gerçekleştirilmiştir. Çözelti derişimi arttıkça, çözeltinin enjektör aracılığı ile çöktürme banyosuna enjeksiyonu zorlaşmıştır (Şekil 4.7.).

4.1.5. Kompozit Fiberlerde Gümüş Nanotel Miktarı Optimizasyonu

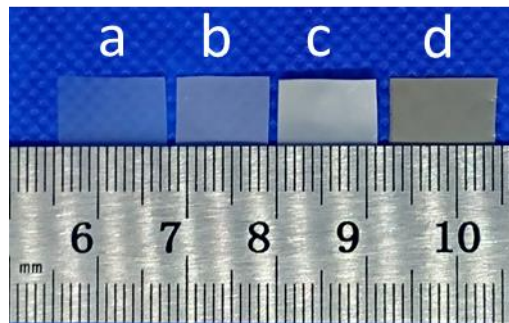
Şekil 4.8.'de, PCL80kDa-15 kompozisyonuna, farklı derişimde AgNT eklenerek hazırlanan besleme çözeltisinin -18 °C sıcaklığa soğutulmuş çöktürme banyosuna sıkılmasıyla elde edilen fiberlerin görüntüleri sunulmuştur.



Şekil 4.8. PCL80kDa-20 çözeltisinde, polimere oranla AgNT derişiminin artması ile fiber üretiminde gerçekleşen değişim. (a) %0 (w/w) AgNT, (b) %0.5 (w/w) AgNT, (c) %2 (w/w) AgNT ve (d) %5 (w/w) AgNT.

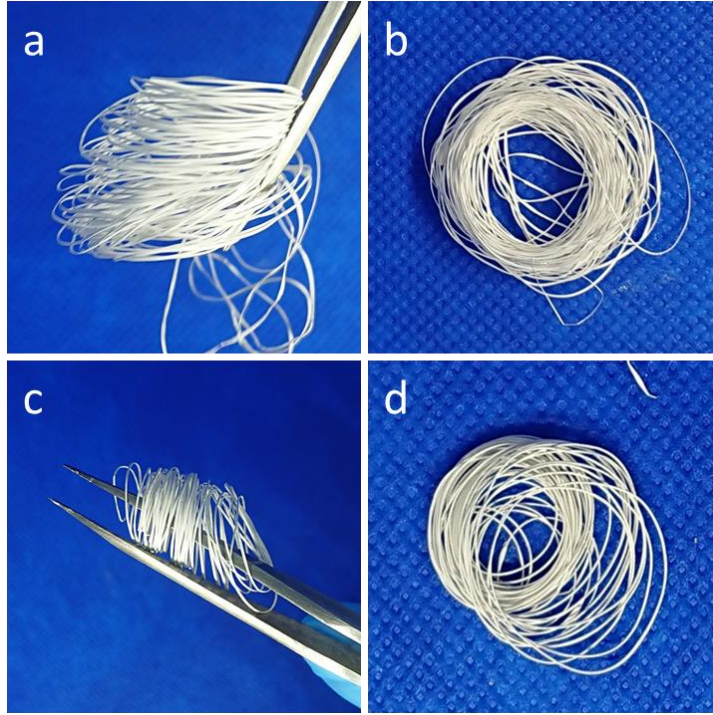
PCL80kDa-20 çözeltisinde, PCL miktarına oranla %2 (w/w) AgNT eklenmesi homojen, yüksek verimli fiber eldesi için ulaşılabilir en yüksek AgNT konsantrasyonu olarak saptanmıştır (Şekil 4.8.c). Besleme çözeltisinde AgNT konsantrasyonu arttıkça çözelti viskozitesi azalmış bu da fiziksel bütünlükte tek parça fiber üretimini olumsuz yönde etkilemiştir (Şekil 4.8.d). Besleme çözeltisindeki AgNT derişimi arttıkça fiberlerde gözle görülür bir renk değişimi meydana gelmiştir (Şekil 4.8.).

Şekil 4.9.'da çözücü döküm yöntemi ile hazırlanan filmlerde, AgNT derişimi arttıkça meydana gelen renk değişimi gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Farklı AgNT derişimlerinde hazırlanan PCL filmlere ait görüntü. (a) %0 (w/w) AgNT, (b) %0.5 (w/w) AgNT, (c) %1 (w/w) AgNT, ve (d) %2 (w/w) AgNT.

Şekil 4.10.'da gerçekleştirilen optimizasyonlar sonucunda nihai olarak hazırlanmış olan PCL ve PCL-AgNT kompozit fiberlere ait görüntüler verilmiştir.



Şekil 4.10. PCL ve PCL-AgNT kompozit fiberlerin yatay ve dikey görüntüleri. (a, b) PCL80kDa-20, (c, d) PCL80kDa-20-AgNT-2

Elde edilen bu bulgular sonucunda optimize edilen üretim koşullarının:

- PCL M_n değerinin 80 kDa olması,
- İyi çözücü sistemi olarak asetonun kullanılması,
- Çöktürme banyosunun $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye soğutulmuş etanol olması,
- Çöktürme banyosunun 50 rpm'de döngüsel harekete sahip olması,
- Besleme çözeltisinde PCL/Aseton derişiminin %20 (w/v) PCL ve AgNT-PCL derişiminin %2 (w/w) AgNT olması şeklinde saptanmıştır.

Çizelge 4.1.'de optimize edilmiş koşullarında gerçekleştirilmiş fiber üretim verimliliği ve derişim değerleri verilmiştir. Optimize edilen bu parametreler ile tezin hedefine uygun olarak yüksek verimde tek parça fiziksel bütünlükte fiberlerin üretimi sağlanmıştır.

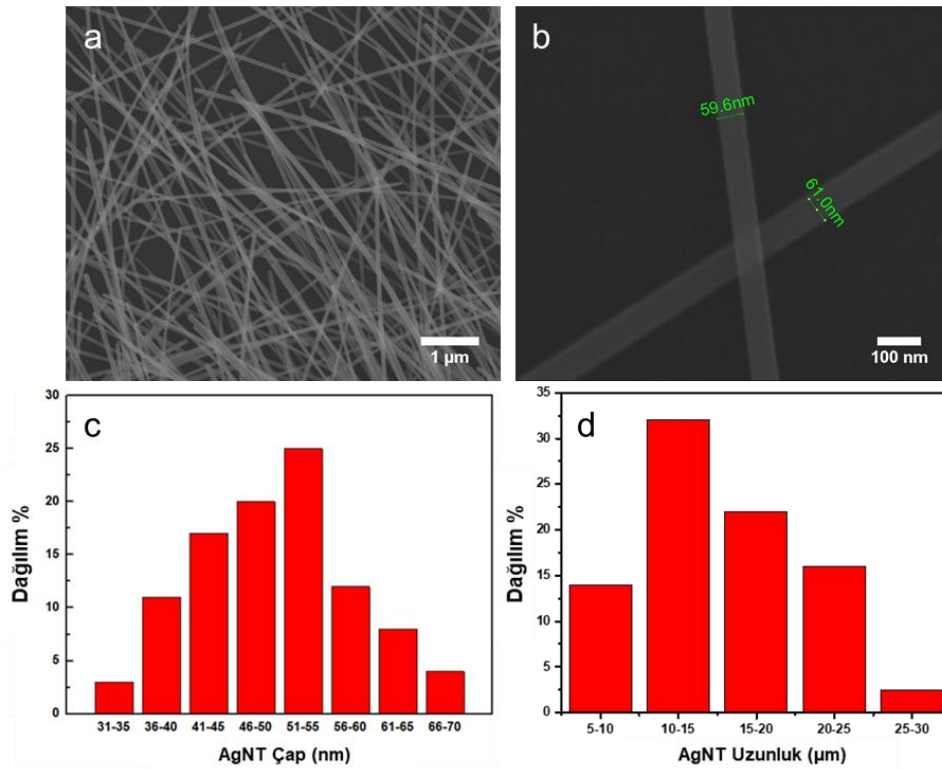
Çizelge 4.1. Numune adı, kompozisyon derişimi ve üretim verimi değerleri.

Numune Adı	Kompozisyon	Fiber Üretim Verimi
PCL	%20 (w/v) PCL	%90
PCL-AgNT	%2 (w/w) AgNT	%85

Tezin bu bölümünden sonra numune adı olarak Çizelge 4.1.'de belirtilen adlandırmalar kullanılmıştır.

4.2. Gümüş Nanotellerin Karakterizasyon Bulguları

Sentez sonrası AgNT'lere ait SEM analizi görüntüleri ve çap boy dağılımları Şekil 4.11.'de verilmiştir.



Şekil 4.11. AgNT SEM görüntüleri ve çap- boy yüzde dağılımları. (a) 40000 büyütme, (b) 300000 büyütme, (c, d) AgNT çap - boy % dağılımı.

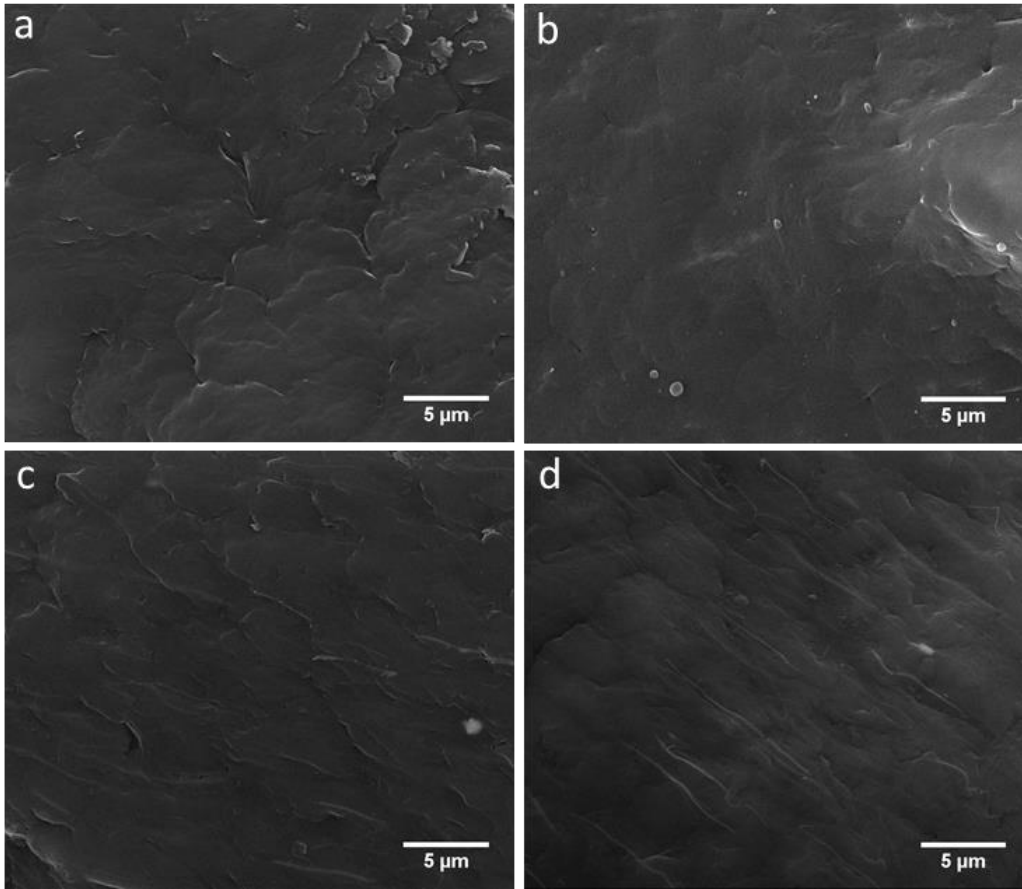
Literatüre buluna AgNT sentez yöntemleri içerisinde poliöl yöntemi ile sentez, maliyet ve zaman açısından en verimli yöntemdir [59]. Bu nedenle tez kapsamında hazırlanan AgNT'lerin sentezi içinde poliöl yöntemi kullanılmıştır. Sentez sonunda elde edilen AgNT'lerin literatürdeki morfolojilere benzer olduğu bulgusuna varılmıştır. Şekil 4.11.c, d çap ve boy dağılımlarını göstermektedir.

Bu dağılım 100 adet AgNT yapısı için çap ve boy ölçümleri alınarak çıkarılmıştır. AgNT'lerin çoğunlukla 51-55 nm çap değerlerinde ve uzunluğun 10-15 µm değerlerinde bulunduğu saptanmıştır.

4.3. İskelet Kas İskelelerinin Karakterizasyon Sonuçları

4.3.1. Morfolojik Özellikler

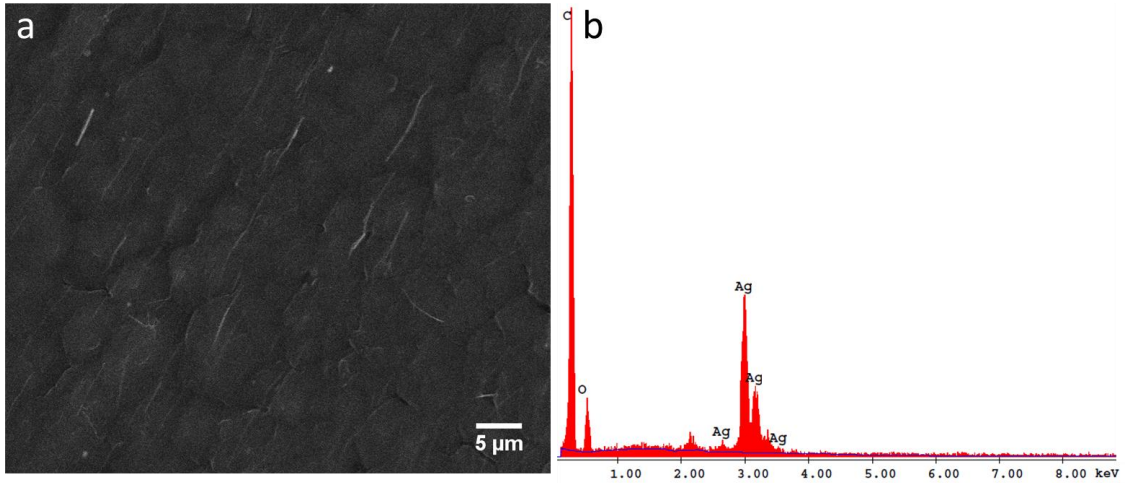
PCL fiber ve AgNT katkılı PCL fiberlerin yüzeylerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.12.'de sunulmuştur.



Şekil 4.12. Fiber yüzeylerinin SEM görüntüleri (a) PCL fiber (b) %0.5 (w/w) AgNT-PCL fiber yüzeyi. (c) %1 (w/w) AgNT-PCL fiber yüzeyi. (d) %2 (w/w) AgNT-PCL fiber yüzeyi. Tüm görüntüler x10.000 büyütme ile alınmıştır.

Soğuk çöktürme banyosunda 80 kDa PCL ile hazırlanan fiberlerin yüzey morfolojileri, daha düşük molekül ağırlıklı PCL (10 kDa, 60 kDa) ile hazırlananlara göre farklılık göstermiştir. 80 kDa PCL ile hazırlanan fiberlerin tüm kompozisyonları benzer polimer morfolojisine sahiptir, içerdikleri AgNT miktarının artması ile fiber yüzeylerinde AgNT'ler belirgin hale gelmiştir. %0.5

(w/w) AgNT-PCL fiber, %1 (w/w) AgNT-PCL fiber yüzeylerinde Ag varlığı EDX analizlerinde saptanamamıştır. %1 (w/w) AgNT-PCL fibere ait SEM görüntüsünde polimer yüzeyi altına gömük AgNT'ler görülmektedir. %2 (w/w) AgNT-PCL fiber yüzeyinde çoğunlukla birbirine paralel olarak yönlenmiş AgNT görüntüleri elde edilmiştir. %2 (w/w) AgNT-PCL fiber ile tez çalışmasına devam edilmiştir ve tez içerisinde bu kompozisyon PCL-AgNT olarak adlandırılacaktır. PCL-AgNT fibere ait SEM görüntüsü, EDX analiz sonuçları Şekil 4.13.'de sunulmuştur. Şekil 4.13.a incelendiğinde PCL fiber yüzeyinde paralel yönlenmiş AgNT'ler görülmektedir. AgNT karakterizasyonu sonuçlarında elde edilen boy değeri ile fiber yüzeyindeki AgNT'lerin edilen boy değerleri birbirini desteklemektedir.

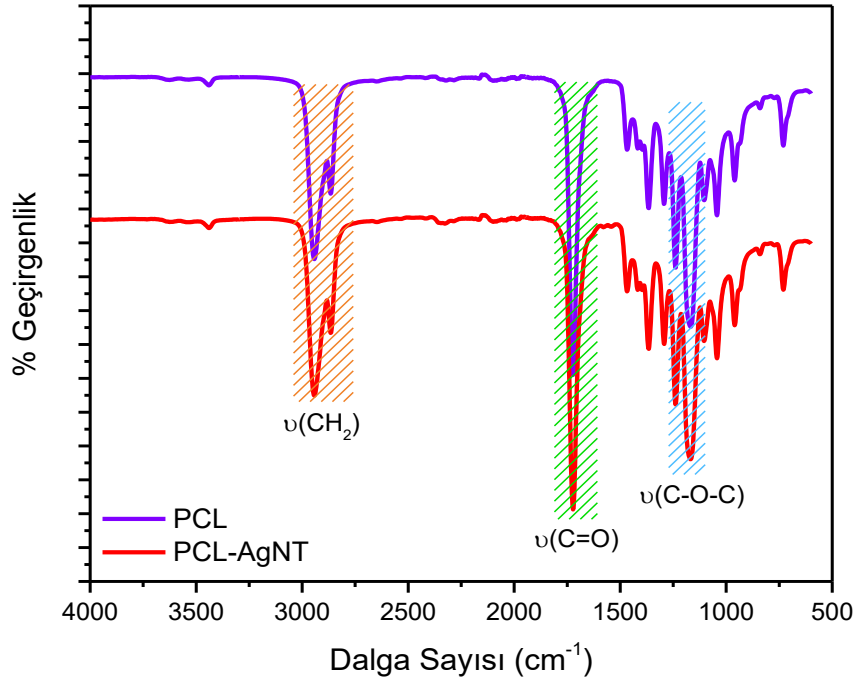


Şekil 4.13. %2 (w/w) AgNT-PCL fiber yüzeyi (a) SEM görüntüsü (x5000 büyütme) (b) EDX analizi sonucu.

AgNT varlığının belirlendiği yüzeyden alınan EDX analiz sonucu da gümüş varlığını göstermektedir (Şekil 4.13.b). AgNT'ler arasında belirgin bir ağ oluşumu gözlenmemiştir.

4.3.2. Kimyasal Özellikler

FTIR analizi ile PCL ve PCL-AgNT örneklerinin kimyasal yapıları analiz edilmiştir. PCL ve PCL-AgNT filmlere ait FTIR spektrumları Şekil 4.14.'de verilmiştir. FTIR spektrumlarından elde edilen IR bandları ve karşılık gelen gerilme, titreşim türleri Çizelge 4.2.'de özetlenmiştir. PCL ve PCL-AgNT filmlere ait FTIR spektrumları incelendiğinde, PCL'in kimyasal yapısını koruduğu ve karakteristik fonksiyonel gruplarına ait gerilmelerin bulunduğu görülmektedir.



Şekil 4.14. PCL ve PCL-AgNT filmlere ait FTIR Spektrumları.

Çizelge 4.2. PCL ve PCL-AgNT numunelerin FTIR spektrumlarından elde edilen bant konumları ve literatürdeki karşılıkları.

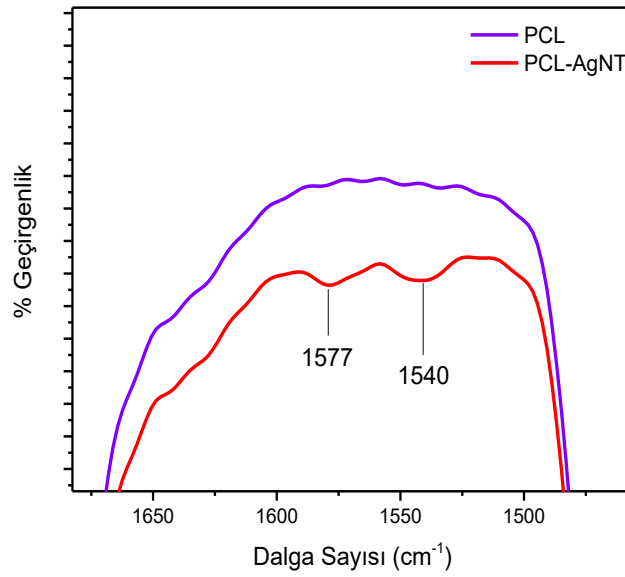
Numune	Bant (cm ⁻¹)	Literatürdeki Bant (cm ⁻¹)	Titreşim Türü
PCL	2943	2949 [75]	ν _{asm. ger.} (CH ₂)
	2865	2865 [75]	ν _{sim. ger.} (CH ₂)
	1722	1727 [75]	ν _{ger.} (C=O)
	1467,1396,1365	1473,1397,1361 [76]	ν _{ger.} (CH ₂)
	1294	1293 [75]	ν _{ger.} (C-C)
	1240	1240 [75]	ν _{asm. ger.} (C-O-C)
	1168	1170 [75]	ν _{sim. ger.} (C-O-C)
	730	730 [76]	ν _{ger.} (C-C)
AgNT	2943	2974 [77]	ν _{asm. ger.} (CH ₂)
	1577,1540	1630 [77]	ν _{ger.} (C=O)

ger: Gerilme frekansı, asm: asimetrik, sim; simetrik

PCL filmine ait FTIR spektrumunda (Şekil 4.14.), 2943 ve 2949 cm⁻¹ dalga boyunda CH₂ simetrik ve asimetrik gerilimleri, 1722 cm⁻¹ karbonil (C=O) güçlü

bant gerilimleri kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. 1294 cm^{-1} , 1168 cm^{-1} ve 1240 cm^{-1} konumlarındaki titreşim bantları PCL ana zincirindeki C-C ve C-O-C ester gurubu karbonil gerilmesine aittir. 1294 cm^{-1} 'deki güçlü bant ile PCL kristalinite derecesi hakkında da bilgi vermektedir.

PCL-AgNT filme ait FTIR spektrumu incelendiğinde, PVP'ye ait ana zincir karakteristik gerilimi olan CH_2 asimetrik gerilimi 2943 cm^{-1} 'de PCL polimeri ile aynı bantta üst üste gelmiştir. PVP kaynaklı 1577 ve 1540 cm^{-1} 'de C=O gerilimi görülmektedir (Şekil 4.15.).

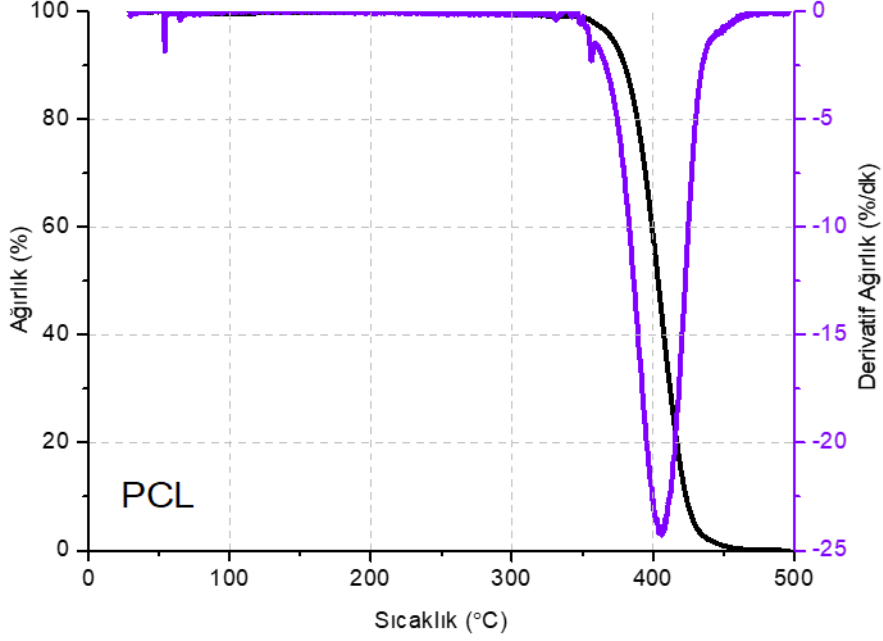


Şekil 4.15. PCL-AgNT, PVP kaynaklı C=O gerilimine ait FTIR spektrumları.

PCL ve PCL-AgNT filmlere ait ayırt edici bantlar Çizelge 4.2.'de literatürde mevcut olan referansları ile birlikte verilmiştir.

4.3.3. Termal Özellikler

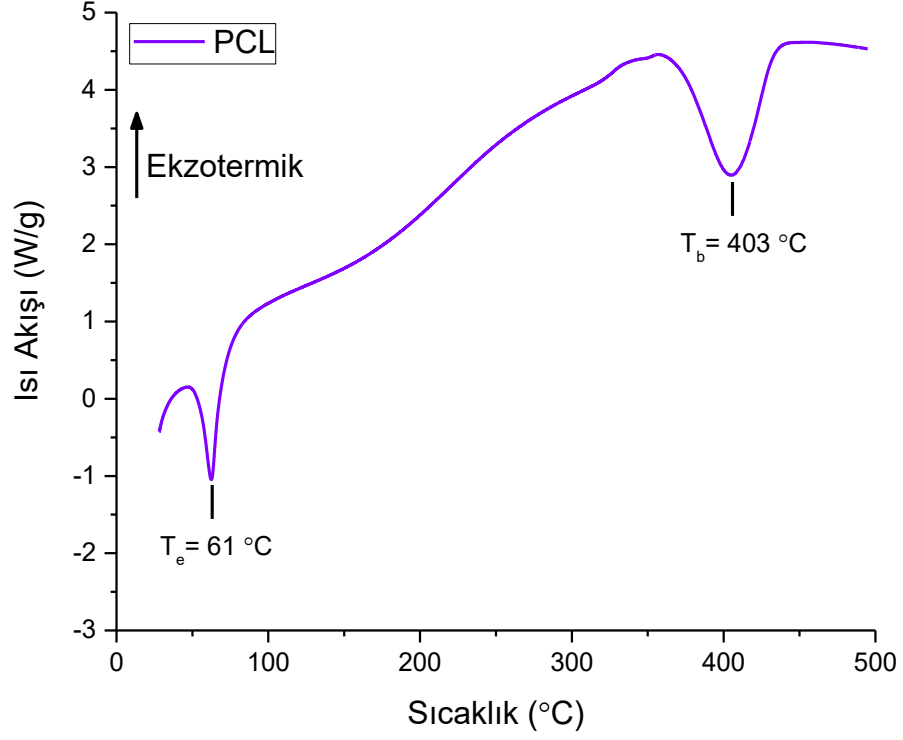
PCL ve PCL-AgNT filmlerin termal bozunma davranışları TGA ile incelenmiştir. AgNT'lerin yapıya katılmasının PCL ısıl kararlılığına etkileri incelenmiştir. PCL filmlere ait TGA termogramı Şekil 4.16.'da verilmiştir.



Şekil 4.16. PCL filmine ait TGA termogramı.

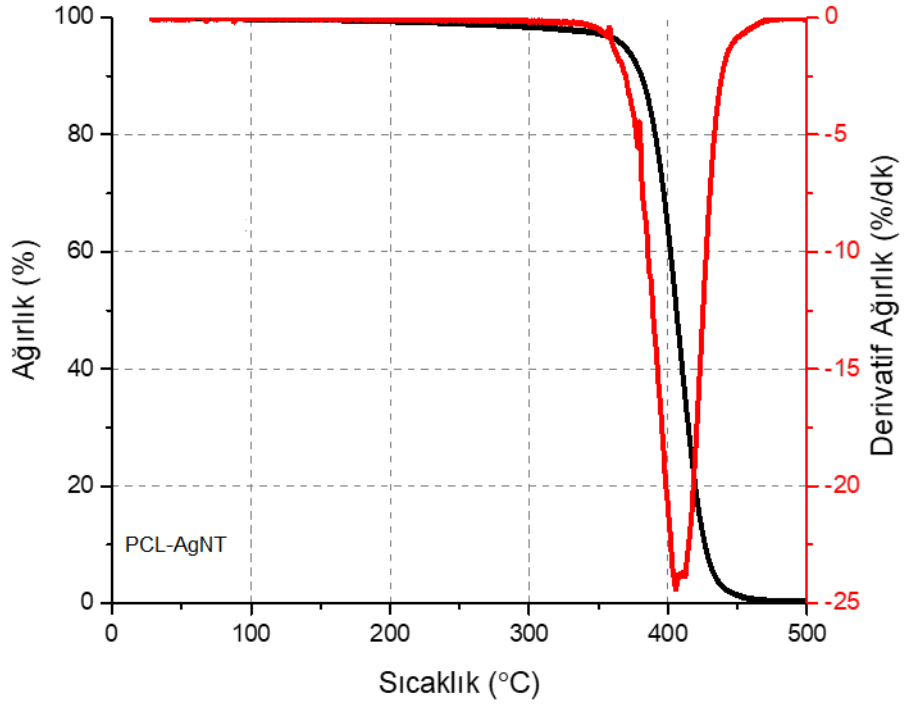
PCL'e ait TGA termogramı ısıl bozunmanın tek basamakta gerçekleştiğini göstermektedir. Isıl bozunma 348 °C değerinde başlayıp, 463 °C civarında sonlanmıştır. 500 °C'de PCL filmin tamamı bozunmuştur.

TGA verileri eş zaman ısı akışı verilerinin toplanmasıyla elde edilen DSC termogramı Şekil 4.17.'de verilmiştir. PCL filmine ait DSC termogramı incelendiğinde, PCL yapısındaki kristal bölgelerin birbiri üzerinden aktığı sıcaklık olan erime sıcaklığı 61 °C olarak gözlenmiştir. Isı akışının 404 °C olarak gösterdiği bozunma sıcaklığı TGA verilerini doğrular niteliktedir [78].

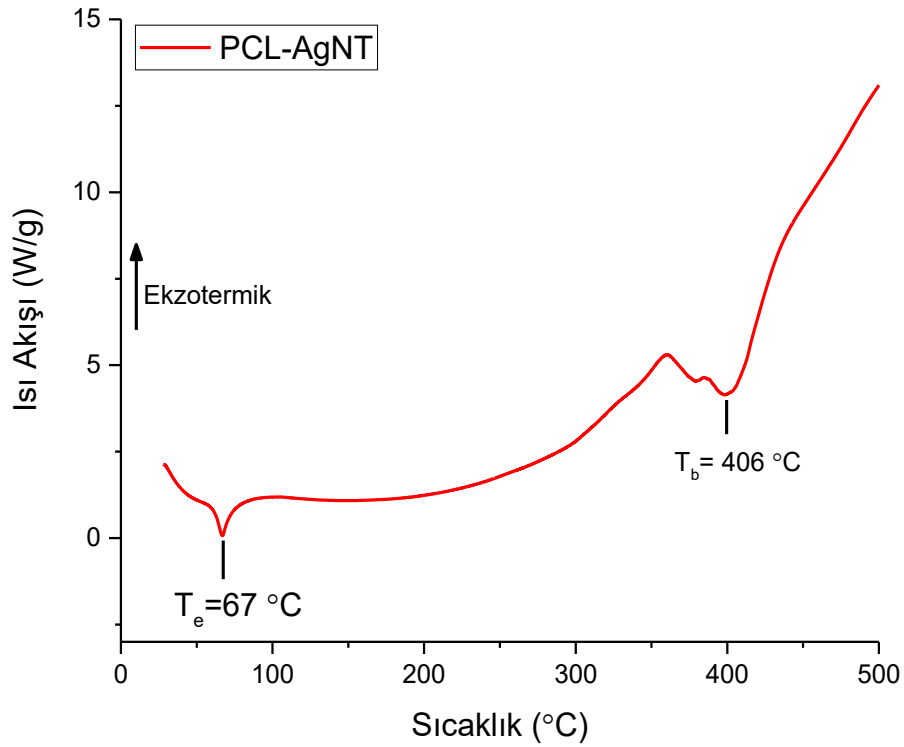


Şekil 4.17. PCL filmine ait DSC termogramı.

PCL-AgNT kompozit filme ait TGA termogramı Şekil 4.18.'de verilmiştir. Termogram incelendiğinde ısıl bozunma tek basamakta gerçekleştiği görülmüştür. Isıl bozunma 340 °C değerinde başlayıp, 470 °C civarında sona ermiştir. 500 °C'ye ulaşıldığında PCL-AgNT kompozit filmin kütlece %99.67'sinin bozunduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.18. PCL-AgNT filmine ait TGA termogramı.



Şekil 4.19. PCL-AgNT filmine ait DSC termogramı.

PCL-AgNT filmine ait DSC termogramı Şekil 4.19.'da verilmiştir. PCL-AgNT filminde erime sıcaklığı 67°C , bozunma sıcaklığı 406°C olarak kaydedilmiştir.

PCL ve PCL-AgNT filmlerine ait termogramlar incelendiğinde erime ve bozunma sıcaklıkları Çizelge 4.3.'de karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.3. DSC termogramlarından elde edilen ısıl geçişler.

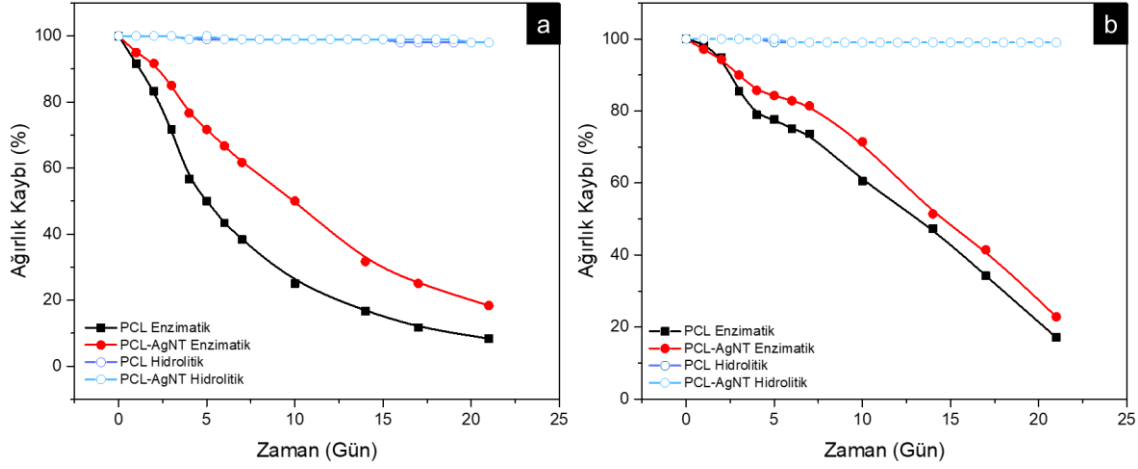
Numune	Erime Sıcaklığı (T_e)	Bozunma Sıcaklığı (T_b)
PCL	61 °C	403 °C
PCL-AgNT	67 °C	406 °C

Tüm numuneler, uygulanan koşullar altında benzer bozunma davranışı sergilemişlerdir. PCL ve PCL-AgNT numunelere ait TGA termogramlarında her iki polimer malzemenin de 25 °C ve 37 °C'de ağırlık kaybına uğramadıkları görülmüştür. Malzemelerin oda ve vücut sıcaklığında ısıl bozunmaya uğramamaları biyomedikal kullanımlarını desteklemektedir. PCL-AgNT filminde erime sıcaklığındaki bu artış AgNT'de bulunan PVP'nin daha yüksek erime viskozitesine (150°C) sahip olmasına bağlanabilir. Başka bir bakış açısıyla bu durum PCL'in kristalliğinin AgNT varlığında daha da arttığı anlamına gelir. Bu da PCL zincirlerinin segmental hareketini kısıtlayan inorganik AgNT varlığıyla açıklanabilir [79]. Ayrıca kül kalıntı ağırlığı, PCL film analizinde ölçüm sınırının altında iken, PCL-AgNT filmde %0.33 değerinde elde edilmiştir. Bu da inorganik gümüş kalıntısının varlığına işaret etmektedir.

4.3.4. Biyobozunma Davranışları

In vitro biyobozunma çalışmaları ile film ve fiber formda hazırlanan numunelerin zamana bağlı ağırlık kayıpları ve morfolojik değişiklikleri incelendi. Enzimatik ve hidrolitik ortamlarda PCL ve PCL-AgNT film ve fiberlerde meydana gelen ağırlık kayıpları Şekil 4.20.'de verilmiştir. PBS ortamında 21 günlük inkübasyondan sonra PCL ve PCL-AgNT film ve fiberlerin ağırlıklarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Diğer yandan enzimatik bozunmanın 7. gününde PCL fiberlerin %73.6'sı PCL film numunelerin %38.3'ü ve PCL-AgNT fiberlerin %81.4'ü PCL-AgNT film numunelerin %61.7'si bozunmadan kalmıştır. Bozunmanın 14. gününde PCL fiberlerin %47.4'ü PCL film numunelerin %16.7'si ve PCL-AgNT fiberlerin %51.4'ü PCL-AgNT film numunelerin %31.7'si bozunmadan kalmıştır. 21 günlük inkübasyon sonrasında PCL fiberlerin yaklaşık %17'si, PCL-AgNT

fiberlerin %23'ü, PCL film numunelerin %8'i ve PCL-AgNT film numunelerin %18'i bozunmadan kalmıştır.



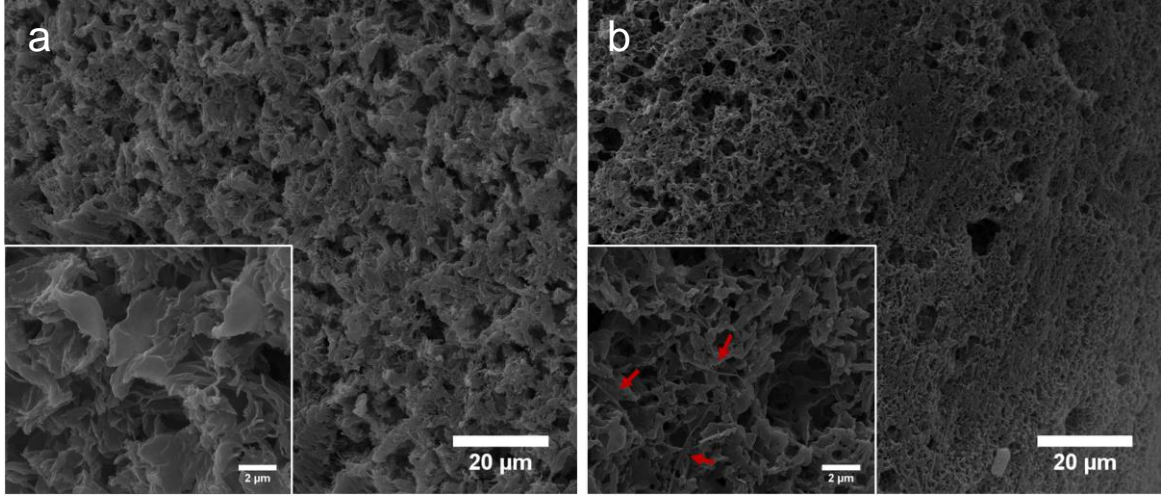
Şekil 4.20. Film ve Fiber numunelerin, PBS ve PBS-Lipaz çözeltisi ortamlarındaki bozunma profilleri. (a) Film numuneler, (b) Fiber numuneler.

PCL hidrofobik kristalin bir polimerdir ve hem in vitro hem de in vivo koşullarda enzim yokluğunda çok yavaş bozunma profili göstermektedir. Birçok çalışmada PCL hidrolizinin lipaz ile katalize edilebileceği gösterilmiştir [80,81]. Bu nedenle, numunelerin enzimatik bozunması, lipaz içeren PBS ortamında gerçekleştirilmiştir. Enzimatik degradasyonda, lipazın polimerleri parçalama özelliğine bağlı olarak, PCL ve PCL-AgNT matrisleri için daha hızlı degradasyon ve daha yüksek ağırlık kaybı değeri gözlenmiştir.

Şekil 4.20. incelendiğinde, enzimatik ortamda PCL ve PCL-AgNT numuneleri benzer bozunma profilleri oluşturmuşlardır. Fiber numunelerin film numunelere göre daha yavaş bir bozunma davranışı sergilediği görülmüştür. Fiberler numunelerini film numunelere göre daha yüksek yüzey alana sahip olmasına rağmen daha yavaş bozunma profili göstermiş olmasının sebebi, termoplastik PCL polimerinin ıslak eğirme işlemi sonunda, -18 °C'deki kötü çözücü içerisinde sıkı istiflenerek çökmesi ile daha kristalin bir yapı kazanmış olması olabilir. Ayrıca PCL makromoleküler yapısına AgNT'lerin dahil edilmesinin bozunma süresi uzaması üzerinde etkisi olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.20.b.). Bunun nedeni, AgNT katkılı fiberlerin yalnız PCL fiberlere göre daha yüksek kristaliniteye sahip olması olabilir. Bu durum nano boyutlu dolgu ilavelerinde oldukça sık karşılaşılan bir durumdur [82]. Ek olarak, malzemelerin termal

incelemelerinde PCL-AgNT numuneleri erime sıcaklığı değerinin, PCL numunelerinden daha yüksek değerlerde bulunduğu gösterilmiştir. Bu sonuç da PCL-AgNT örneklerinin kristalizasyonunun daha yüksek olduğunu destekler niteliktedir (Çizelge 4.3.).

Morfolojik değişiklikleri gösteren bozulmuş fiberlerin SEM görüntüleri Şekil 4.21.'de sunulmuştur.



Şekil 4.21. 21 günlük PBS içerisinde lipaz varlığında bozunmadan sonraki SEM görüntüleri. (a) PCL ve (b) PCL-AgNT. Her iki görüntü de x5000 ve x20000 yakınlasmalar ile alınmiştir.

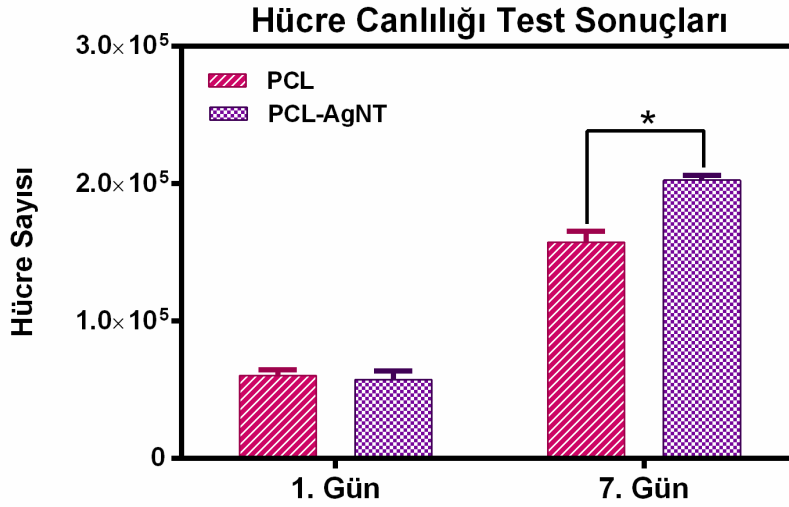
PCL ve PCL-AgNT fiberlerin, 21 günlük enzimatik ortamda bozunmasından sonra SEM görüntüleri incelenmiştir. Buna göre PCL fiber yüzeyinin bozunma sonrası pürüzlü hale geldiği görülmektedir (Şekil 4.21.a). PCL-AgNT fiber yüzeylerinde ise daha fazla yüzey pürüzlülüğü meydana geldiği yer yer geniş gözeneklerin oluştuğu görülmüştür. Ek olarak bozunma sonrası AgNT'lerin yoğun bir şekilde yüzeyde bir araya geldikleri görülmüştür (Şekil 4.21.b).

4.3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçlar ve Değerlendirme

PCL ve PCL-AgNT kompozitten oluşan fiberler üzerinde, farklı elektriksel uyarım değerleri altında ve uyarım yok iken, C2C12 fare myoblast iskelet kası hücrelerinin çoğalma performansları ve morfolojileri incelenmiştir.

4.3.5.1. Alamar Mavisi Boyama ile Hücre Canlılığı Tayini Sonuçları

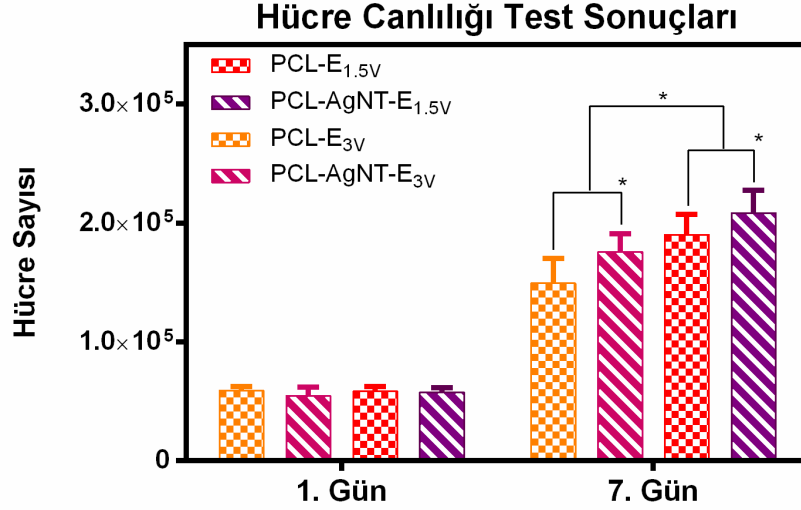
Elektriksel uyarım altında ve elektriksel uyarım uygulanmaz iken, tek yönlü hizalanmış PCL ve PCL-AgNT fiberlerin yüzeylerindeki canlı hücre sayısının belirlenmesi amacıyla, hücre kültürü çalışmasının 1. ve 7. günlerinde kantitatif sonuç veren Alamar mavisi hücre canlılığı testi uygulanmıştır. Şekil 4.22.'de elektriksel uyarım olmaksızın C2C12 hücreleri ekilmiş, PCL ve PCL-AgNT fiber iskelelere uygulanan Alamar mavisi hücre canlılığı testi ile 1. ve 7. günler için alınan sonuçlar gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Elektriksel uyarım olmaksızın, fiber iskeleler yüzeyindeki canlı hücre sayısının, Alamar mavisi hücre canlılığı testi ile belirlenmesi (*P < 0.05).

Elektriksel uyarım bulunmadan gerçekleştirilen deneylerde, 1. gün sonunda PCL ve PCL-AgNT fiberler üzerine başlangıçta ekilen 100.000 hücrenin yaklaşık %50'si canlılığını korumuş ve çoğalmaya devam etmişlerdir (Şekil 4.22.). 7. günün sonunda PCL-AgNT kompozit fiberler yüzeyinde PCL fiberler yüzeyindekilere göre istatistiksel anlamlı farklılık gösterecek kadar fazla sayıda hücre çoğalmıştır.

Şekil 4.23.'de elektriksel uyarımın gerçekleştirildiği C2C12 hücreleri ekilmiş, PCL ve PCL-AgNT fiber iskelelere uygulanan alamar mavisi hücre canlılığı testi 1. ve 7. gün için alınan sonuçlar verilmiştir.



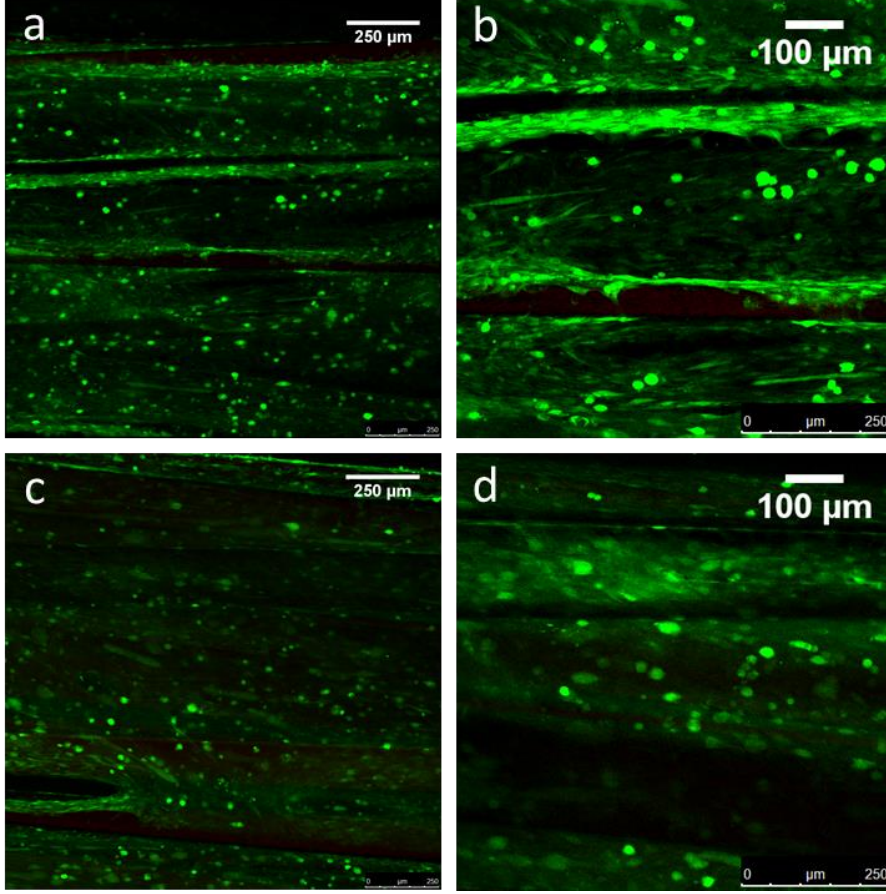
Şekil 4.23. Elektriksel uyarım altında, fiber iskeleler yüzeyindeki canlı hücre sayısının, Alamar mavisi hücre canlılığı testi ile belirlenmesi (*P < 0.05).

İki farklı gerilim değeri altında gerçekleştirilen, elektriksel uyarım çalışmalarında 1. gün sonunda PCL ve PCL-AgNT fiberler üzerine ekilen yaklaşık 100.000 hücrenin yaklaşık %50'si canlılığını korumuş ve çoğalmaya devam etmişlerdir (Şekil 4.23.). 7. günün sonunda, her iki uyarım gerilimi değeri için PCL-AgNT kompozit fiber iskeleler yüzeyinde daha fazla sayıda hücre çoğalmış ve canlılığını sürdürmüştür.

PCL ve PCL-AgNT iskele gruplarına farklı gerilim değerlerinde elektriksel uyarımın uygulanmasının hücre canlılığına etkisi incelenmiştir. Elektriksel uyarım gerilim değerleri 1.5 V ile 3 V değerleri kıyaslandığında, 1.5 V uyarımın verildiği her iki fiber iskele grubunda da istatistiksel olarak anlamlı fark oluşacak değerlerde daha fazla hücrenin çoğaldığını gözlenmiştir.

4.3.5.2. Canlı-Ölü Boyama, Konfokal Mikroskop Görüntüleri

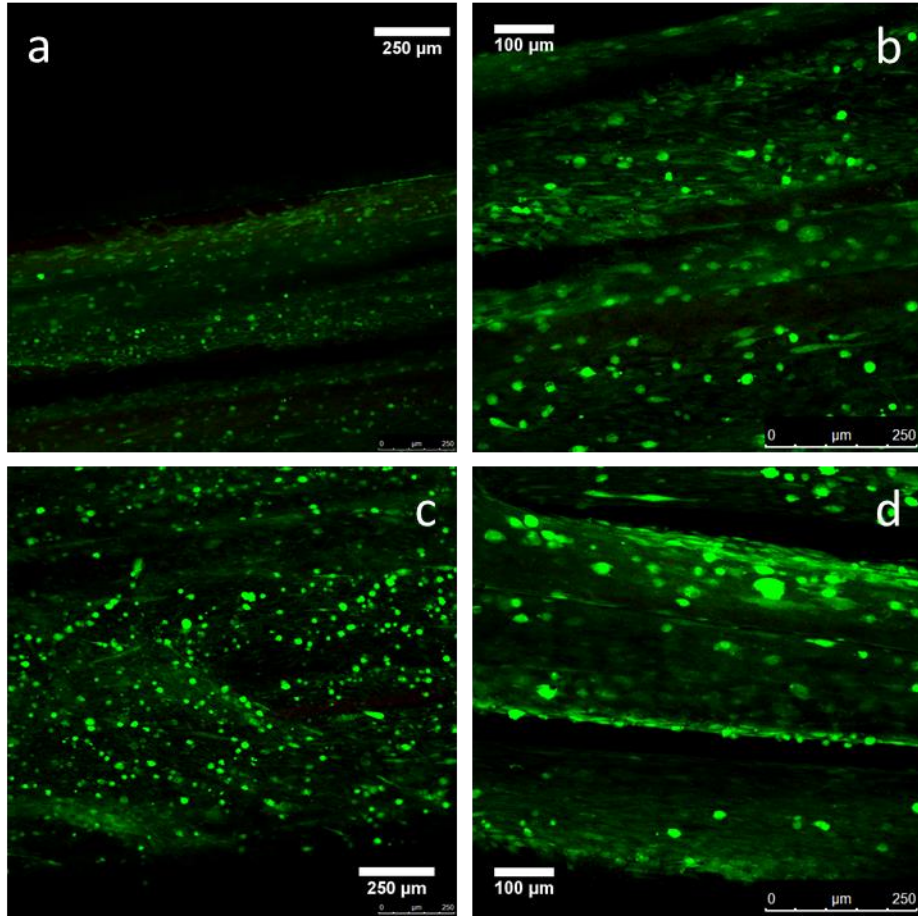
Şekil 4.24.'de herhangi elektriksel uyarım gerçekleştirilmemiş, PCL ve PCL-AgNT fiber iskelelerden hücre kültürünün 7. gününde alınan konfokal mikroskop görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.24 Elektriksel uyarım olmadan PCL ve PCL-AgNT fiberlerden alınan konfokal mikroskop görüntüleri. (a) PCL 5x büyütme (b), PCL 10x büyütme, (c) PCL-AgNT 5x büyütme ve (d) PCL-AgNT 10x büyütme. (7. Gün, canlı hücreler yeşil renk ile belirlenmektedir.)

Hücre ekimi sonrası elektriksel uyarımın gerçekleştirilmediği, tek yönlü hizalanmış PCL ve PCL-AgNT kompozit fiberler 7. gün sonunda canlı-ölü boyaması yapılarak C2C12 fare myoblast hücrelerindeki canlılık ve farklılaşma incelenmiştir (Şekil 4.24.). Buna göre PCL ve PCL-AgNT gruplarının her ikisinde de hücrelerin canlılıklarını korudukları ve çoğaldıkları gözlenmiştir. Bu sonuç Alamar mavisi sonuçları ile benzer niteliktedir.

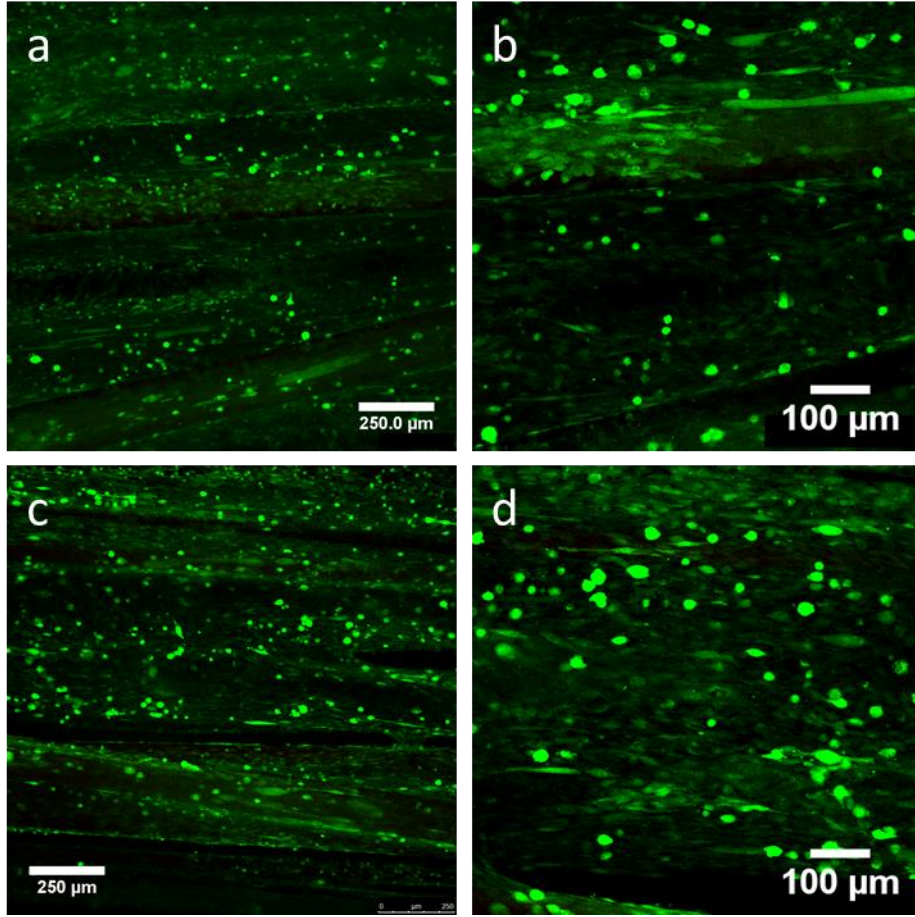
Tek yönlü hizalanmış PCL ve PCL-AgNT fiber iskelelere, hücre kültürünün son 4 gününde, günlük 5 dakika süreyle 3V gerilim, 1 Hz frekans, 1 ms sinyal genişliği parametrelerinde elektriksel uyarım uygulanmıştır. 7. gün sonunda iskelelerden, canlı-ölü boyama yapılarak alınan konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 4.25.'de sunulmuştur.



Şekil 4.25. Elektriksel uyarımın; 3V gerilim, 1 Hz frekans ve 1 ms sinyal genişliği değerlerinde uygulanmasıyla PCL ve PCL-AgNT fiberlerden alınan konfokal mikroskop görüntüleri. (a) PCL 5x büyütme, (b) PCL 10x büyütme, (c) PCL-AgNT 5x büyütme ve (d) PCL-AgNT 10x büyütme. (7. Gün, canlı hücreler yeşil renk ile belirlenmektedir.)

Konfokal mikroskop görüntüleri incelendiğinde, PCL ve PCL-AgNT gruplarının her ikisinde de hücrelerin canlılıklarını korudukları ve çoğaldıkları gözlenmiştir. 3V gerilimin uygulandığı her iki grup kendi içerisinde karşılaştırılacak olursa, PCL-AgNT kompozit fiberlerden oluşan iskele yüzeyinde daha fazla hücre çoğaldığı görüntülerde görülmektedir (Şekil 4.25.a-d). Bu sonuç Alamar mavisi sonuçlarını destekler niteliktedir.

Şekil 4.26.'de 1.5 V gerilim değerinde elektriksel uyarım gerçekleştirilmiş, PCL ve PCL-AgNT fiber iskele gruplarından alınan konfokal mikroskop görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.26. Elektriksel uyarımın; 1.5 V gerilim, 1 Hz frekans ve 1 ms sinyal genişliği değerlerinde uygulanmasıyla PCL ve PCL-AgNT fiberlerden alınan konfokal mikroskop görüntüleri. (a) PCL 5x büyütme, (b) PCL 10x büyütme, (c) PCL-AgNT 5x büyütme ve (d) PCL-AgNT 10x büyütme. (7. Gün, canlı hücreler yeşil renk ile belirlenmektedir.)

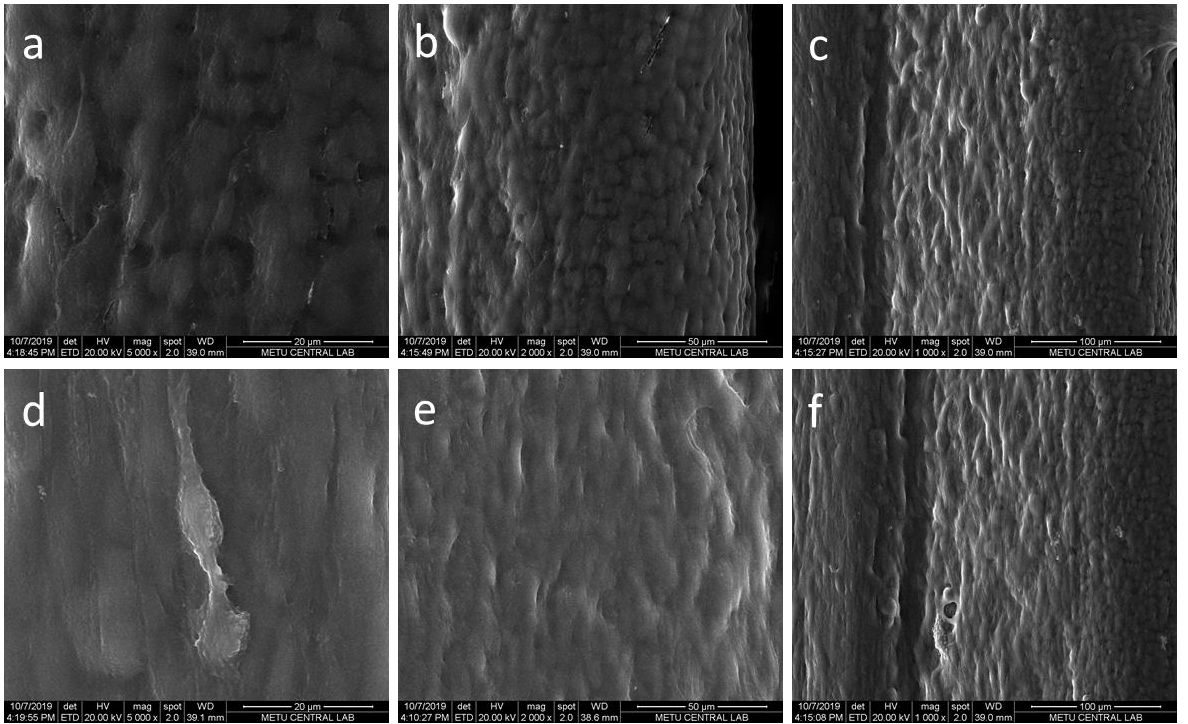
1.5V elektriksel uyarım gerçekleştirilen, birbirine hizalı PCL ve PCL-AgNT kompozit fiberlere, 7. gün sonunda canlı-ölü boyaması yapılarak hücrelerdeki farklılaşma ve canlılık incelenmiştir (Şekil 4.26.). Buna göre PCL ve PCL-AgNT gruplarının her ikisinde de hücrelerin canlılıklarını korudukları ve çoğaldıkları gözlenmiştir. 1.5V gerilimin uygulandığı her iki grup kendi içerisinde karşılaştırıldığında, PCL-AgNT kompozit fiberlerden oluşan iskele yüzeyinde çok daha fazla hücre çoğaldığı görüntülerde görülmektedir (Şekil 4.26.a-d). Bu sonuç Alamar mavisi sonuçlarını destekler niteliktedir.

Alamar mavisi hücre canlılığı testi sonuçları göz önünde bulundurularak, canlı-ölü boyaması ile fiber iskelelerin yüzeylerinden alınan konfokal mikroskop görüntüleri karşılaştırılmıştır. Buna göre elektriksel uyarımın uygulanıp

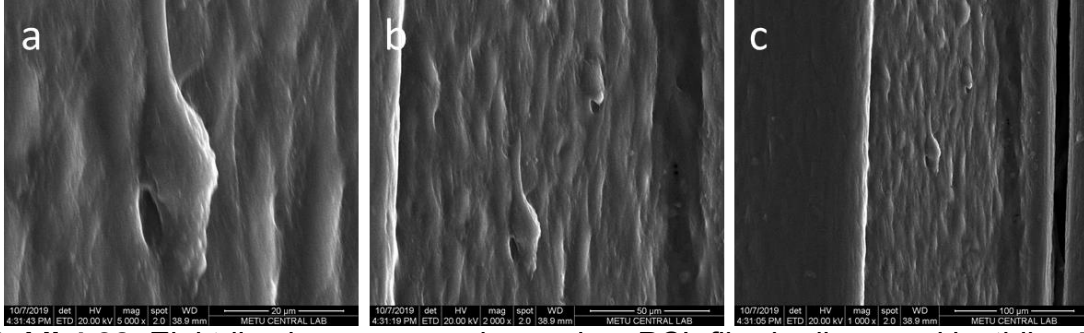
uygulanmaması durumu fark etmeksizin PCL-AgNT kompozit fiberlerde, PCL fiberlere göre daha fazla hücre çoğaldığı gözlenmiştir. 1.5 V ve 3 V gerilim değerlerinde elektriksel uyarımın gerçekleştirildiği gruplar birbirleri arasında karşılaştırıldığında, 1.5 V gerilim değerinde elektriksel uyarımın hücrelerin çoğalmasında ve farklılaşmasında daha etkili rol oynadığı gözlenmiştir.

4.3.5.3. Hücre Morfolojilerin SEM ile İncelenmesi

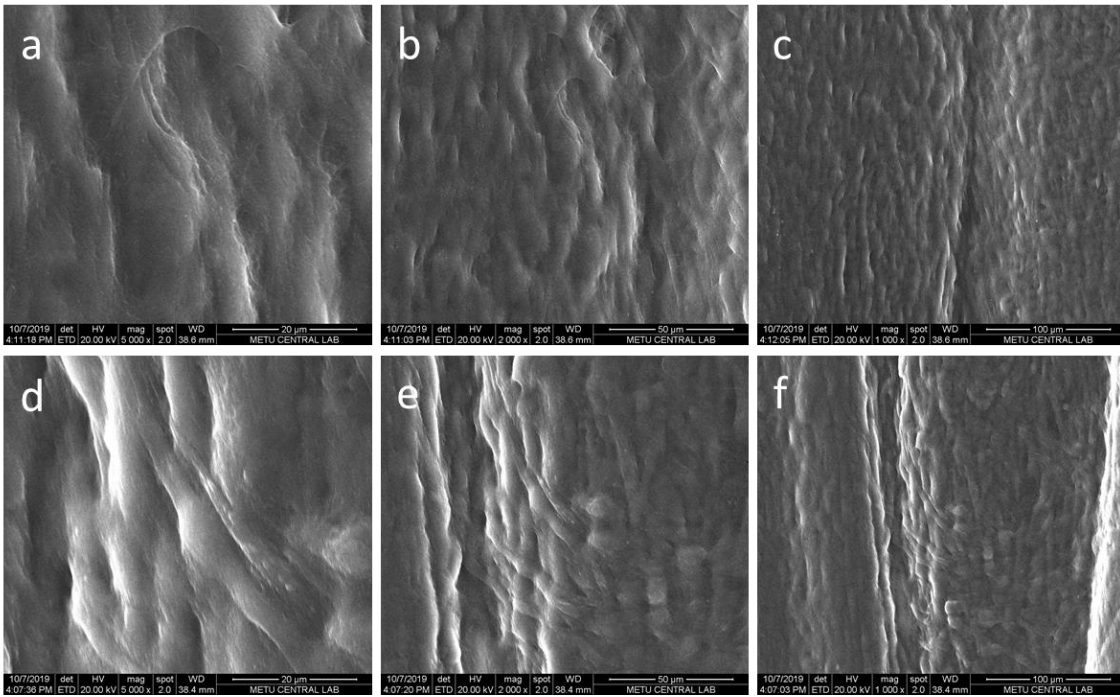
Şekil 4.27-32'de PCL ve PCL-AgNT kompozit fiberlerin, herhangi bir yüzey modifikasyonu olmaksızın, C2C12 fare myoblast hücreleri ile etkileşimleri SEM görüntüleri üzerinden incelenmiştir.



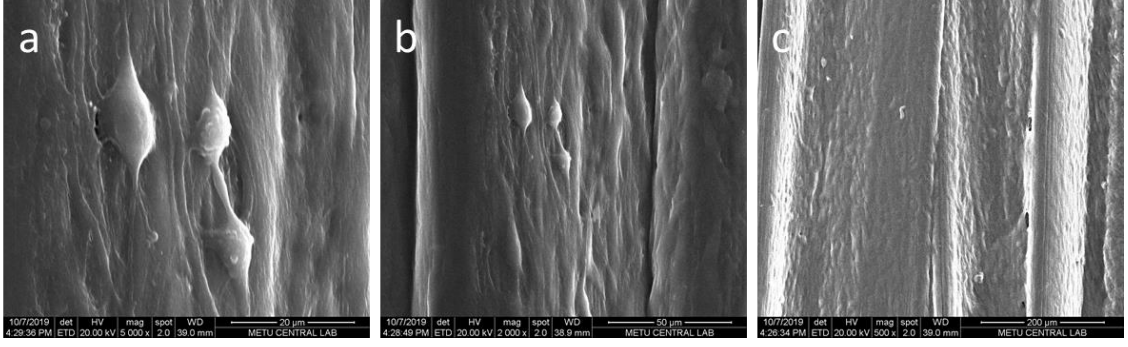
Şekil 4.27. Elektriksel uyarım uygulanmadan, PCL-AgNT kompozit fiberler ile gerçekleştirilen 7 günlük hücre kültürü çalışması sonunda fiber yüzeyleri SEM görüntüleri. (a) 5000x büyütme, (b) 2000x büyütme, (c) 1000x büyütme. Aynı fiberlerin farklı bölgesinden alınmış görüntüler; (d) 5000x büyütme, (e) 2000x büyütme ve (f) 1000x büyütme.



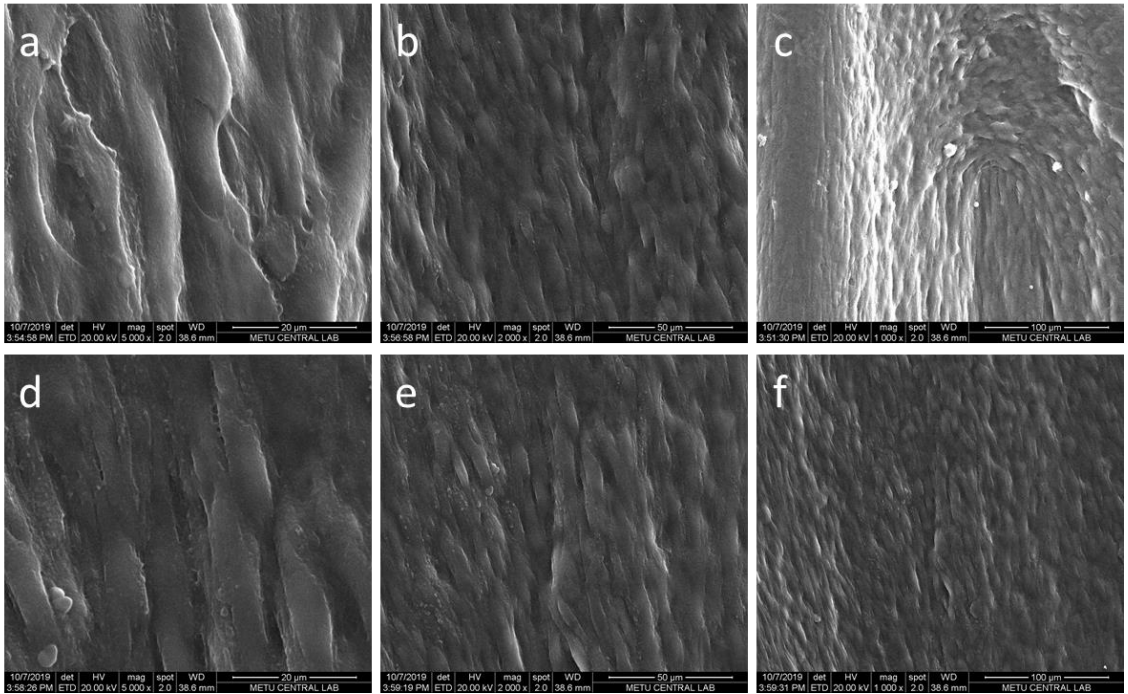
Şekil 4.28. Elektriksel uyarım uygulanmadan, PCL fiberler ile gerçekleştirilen 7 günlük hücre kültürü çalışması sonunda fiber yüzeyleri SEM görüntüleri. (a) 5000x büyütme, (b) 2000x büyütme ve (c) 1000x büyütme.



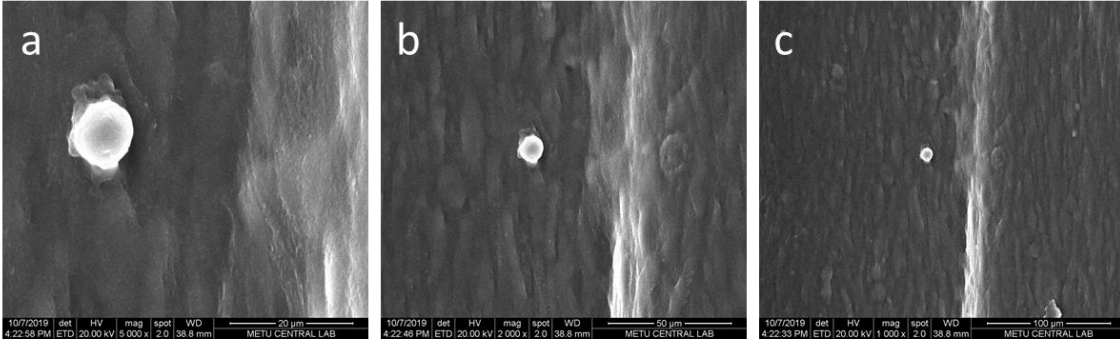
Şekil 4.29. Hücre kültürü çalışmaları sonunda, 3V elektriksel uyarım uygulanmış PCL-AgNT kompozit fiber yüzeyleri SEM görüntüleri. (a) 5000x büyütme, (b) 2000x büyütme, (c) 1000x büyütme. Aynı fiberlerin farklı bölgesinden alınmış görüntüler; (d) 5000x büyütme, (e) 2000x büyütme ve (f) 1000x büyütme.



Şekil 4.30. Hücre kültürü çalışmaları sonunda, 3V elektriksel uyarım gerçekleştirilmiş, PCL fiber yüzeyleri SEM görüntüleri. (a) 5000x büyütme, (b) 2000x büyütme ve (c) 1000x büyütme.



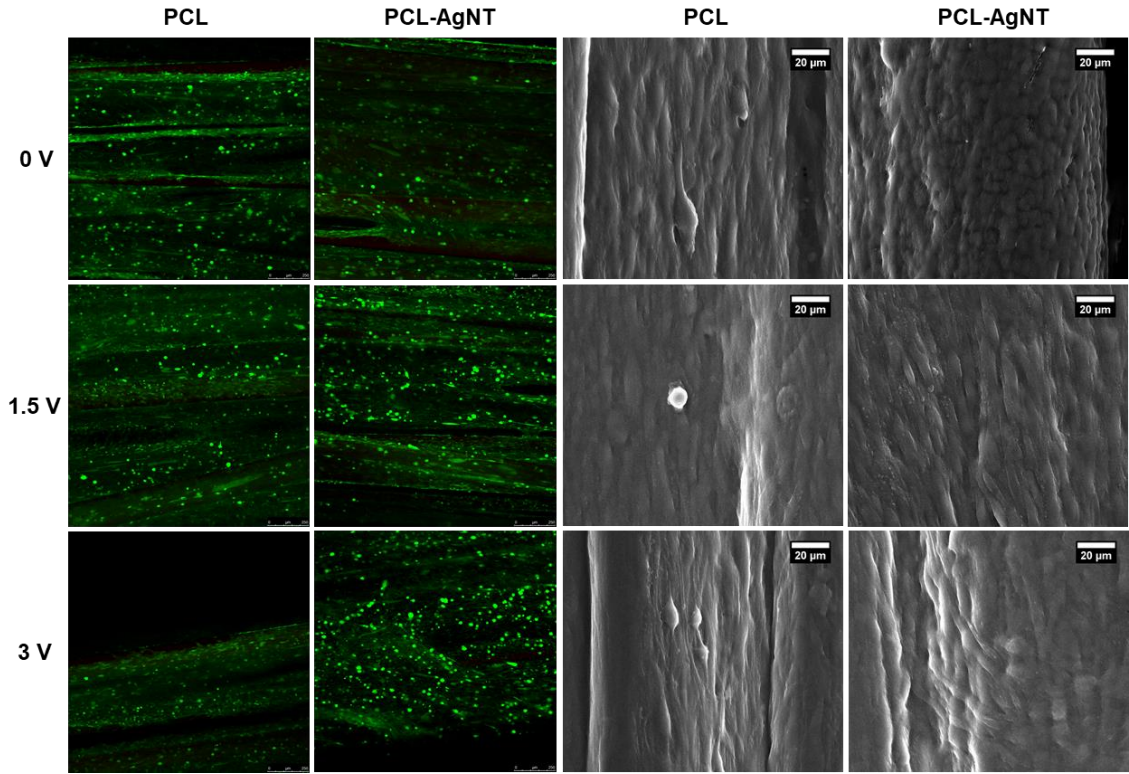
Şekil 4.31. Hücre kültürü çalışmaları sonunda, 1.5 V elektriksel uyarım uygulanmış PCL-AgNT kompozit fiber yüzeyleri SEM görüntüleri. (a) 5000x büyütme, (b) 2000x büyütme, (c) 1000x büyütme. Aynı fiberlerin farklı bölgesinden alınmış görüntüler; (d) 5000x büyütme, (e) 2000x büyütme ve (f) 1000x büyütme.



Şekil 4.32. Hücre kültürü çalışmaları sonunda, 1.5 V elektriksel uyarım gerçekleştirilmiş, PCL fiber yüzeyleri SEM görüntüleri. (a) 5000x büyütme, (b) 2000x büyütme ve (c) 1000x büyütme.

SEM görüntüleri ile hücrelerin, PCL ve PCL-AgNT fiber yüzeylerindeki yayılımları incelenmiştir. 7 günlük hücre kültürü çalışmalarının sonunda genel olarak tüm fiber yüzeylerinin C2C12 hücreleri ile kaplandığı görülmektedir (Şekil 4.27-32.). İskeleler yüzeyinde myotüp benzeri yapıların fiber boyunca ve birbirlerine paralel hizalanma sağlayarak geliştikleri gözlenmiştir. Elektriksel uyarımın uygulanmadığı fiberler yüzeyinde, elektriksel uyarımın 1.5 V ve 3 V değerlerinde uygulandığı yüzeylere göre daha az myotüp yapısına benzer hücre uzamasının meydana geldiği görülmektedir (Şekil 4.29-32.). Şekil 4.27 – 28, Şekil 4.29 – 30 ve Şekil 4.31 – 32'deki PCL ve PCL-AgNT fiber yüzeyleri birbirleri ile karşılaştırıldığında, elektriksel uyarım uygulaması fark etmeksizin PCL-AgNT kompozit fiberlerin yüzeyinde daha fazla hücresel uzama olduğu görülmüştür. 3 V (Şekil 4.29.) ve 1.5 V (Şekil 4.31.) gerilim değerlerine elektriksel uyarımın gerçekleştirildiği PCL-AgNT kompozit fiber grupları birbirleri arasında karşılaştırılmıştır. Buna göre, 3 V değerinde uygulanan uyarımda daha kısa ve yer yer farklı yönlerde hücresel uzamanın olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.29.) 1.5 V gerilim değerinde uyarım verildiğinde ise PCL-AgNT kompozit fiberlerde sık ve birbirine paralel hizalanmış myotüp benzeri yapıların olduğu görülmüştür (Şekil 4.31.).

Şekil 4.33.'de PCL ve PCL-AgNT fiber iskelelerinden 0 V, 1.5 V ve 3V elektriksel uyarım parametreleri için hücre çalışmalarının 7. gününde alınmış konfokal ve SEM görüntüleri karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.



Şekil 4.33. PCL ve PCL-AgNT fiber iskeleler yüzeyinden, hücre çalışmalarının 7. gününde alınmış konfokal ve SEM görüntüleri. (Tüm SEM görüntüleri x2000 büyütme ile alınmıştır.)

İskelet kası doku mühendisliğinde, doğal kas dokusu yapısının taklit edilmesinde biyo-fiziksel ipuçları kullanılmaktadır. İskele topografyası, anizotropi gibi biyo-fiziksel ipuçları hücresel hizalanma ve farklılaşmada önemli düzenleyicilerdir. İskelet kası dokusu oldukça hizalı ve hiyerarşik olarak organize bir dokudur. Etkili kas kasılması, birbirine paralel hizalanmış çok çekirdekli myotüp demetlerinde bulunan aktin ve myosin glokoprotein filamentlerin eş zamanlı olarak büzüşmesiyle oluşur. Birbirine paralel olmayan, rasgele yönlendirilmiş myoblast gelişimiyle etkili kasılma oluşturulamamaktadır. Myoblast hizalanması, myotüp oluşumu ve olgunlaşmasında önemli ilk adımdır. Kas liflerini çevreleyen doğal ECM, temas rehberliği ipuçları sağlayan oldukça hizalanmış ve lifli mimariye sahip bir yapıdır.

Literatürde myoblast hizalanmasının sağlanması amacıyla desenlenmiş yüzeyler, elektro-eğirilmiş fiberler ve hizalanmış gözenekler gibi farklı stratejiler uygulanmıştır. Bu çalışmalara örnek olarak; Huang ve ark. poli(dimetiloksan) (PDMS) ve poli(2-hidroksietil metakrilat) (pHEMA) nın mikro-desenlemesi ile

birbirine paralel mikro oluklardan oluşan polimer membranları üretmişler ve daha sonra desenlemenin myoblast hücre sel organizasyona ve çoğalmasına etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmayla desenlenmiş her iki filmde de mikro olukların yönü boyunca hücre hizalanma ve çoğalma gerçekleştirmiş, hizalanmış myoblast oluşturulmasında uzamsal ipuçlarının önemini göstermişlerdir [83]. Aviss ve ark. elastomer PLGA'nın elektro-eğirilmesiyle yüksek oranda hizalanmış fiberler elde etmişlerdir. C2C12 hücre hattıyla yaptıkları çalışmayla, fiberlerdeki hizalanma myoblast uzaması ve hizalanması için temas rehberliği sağladığını göstermişlerdir [35]. Benzer şekilde Chen ve ark. hücreler için topografik ve elektriksel ipuçları sağlayabilen elektriksel olarak iletken özellikte nanofiberler geliştirmişlerdir. Bunun için PCL ve PCL-PANI karışımından elektro-eğirme tekniği ile yüksek oranda birbirine hizalanmış ve hizalanmamış fiberler oluşturdu lar. Sonuç olarak, hizalanmış nanofiberlerde myoblast yönelmesinin ve myotüp oluşumunun desteklendiği gösterilmiştir. Ek olarak elektriksel iletkenliğe sahip hizalı fiberlerde, iletkenliğe sahip olmayan hizalı fiberlere göre daha fazla oranda hücre çoğalması ve myotüp olgunlaşmasının gerçekleştiğini göstermişlerdir [40].

Literatürde ıslak eğirme tekniği ile hazırlanan fiberlerin myoblast çoğalmasına ve myotüp farklılaşmasına etkisini gösterir az sayıda çalışma bulunmamaktadır. Gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında, ıslak eğirme tekniği ile hazırladığımız PCL ve PCL-AgNT mikro-fiberler ile myoblast çoğalmasını ve myotüp farklılaşmasını desteklemek için yeterli topografik ve elektriksel ipuçları sağlandığını gösterdik. PCL-AgNT elektriksel iletkenliği, AgNT'lerin birbirleri arasında ağ oluşturamaması veya sınırlı uzunluklarda bölgesel ağ oluşturması sebebi ile ölçülebilir değerlerde sağlanamamıştır. Ancak bu duruma rağmen, hücre çalışmalarında PCL-AgNT kompozit fiberlerin, PCL fiberlere göre myoblast çoğalması ve myotüp oluşumuna daha fazla olumlu etkisinin olduğu gösterilmiştir. Browe ve ark. elektro eğirme tekniği ile fiber formda, saf PCL ve farklı elektriksel iletkenlik değerlerine sahip PPy-PCL kopolimer üzerinde C2C12 myoblast hücrelerinin tutunma, çoğalma ve farklılaşma özelliklerini incelemişlerdir. Malzemedeki elektriksel iletkenlik değerinin hücrelere etkisini incelemek amacıyla hazırladıkları farklı PPy derişimindeki, PPy-PCL fiberlerde, hücre çalışmalarında anahtar etkisi bulunan yüzey sertliği değerini

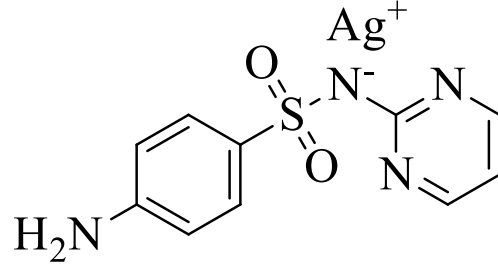
sabit tutmuşlardır. Bu çalışmaya göre PPy-PCL kopolimeri ile hazırlanan iskelelerde, saf PCL iskelelere göre myoblastların tutunma, çoğalma ve farklılaşması önemli ölçüde artmıştır. Ancak ölçülebilir elektriksel iletkenlik değerine sahip PPy-PCL ile belirgin bir elektriksel iletkenlik değerine sahip olmayan PPy-PCL iskeleleri arasında, hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşmasında önemli ölçüde fark gözlememişlerdir.

Malzemelere topografik ve elektriksel ipuçlarının kazandırılmasının yanı sıra hücre kültürü esnasında belirli aralıklarla elektriksel uyarım da verilmiş ve bu uyarımın myoblast çoğalması ve myotüp benzeri yapıya farklılaşmasında önemli etkiye sahip olduğu görülmüştür. Islak eğirme tekniği ile fiber üretimi, oldukça kolay optimize ve modifiye edilebilir olmasının yanında, elektro eğirme tekniği ile üretilen fiberlere göre daha yüksek termal, mekanik dayanıma ve üretim verimliliğine sahiptir.

Islak eğirme tekniğinin bir diğer üstün avantajı malzeme içerisine yüksek oranda yüklemenin sağlanabilmesidir. Ayrıca kolay değiştirilecek parametreler ile fiber sertliği, yüzey morfolojisi değiştirilebilmektedir. Bu özellikler ile ileri çalışmalarda hücre çoğalması veya farklılaşmasını destekleyici moleküllerin fiber yapısına katılabilmesini mümkün kılmaktadır.

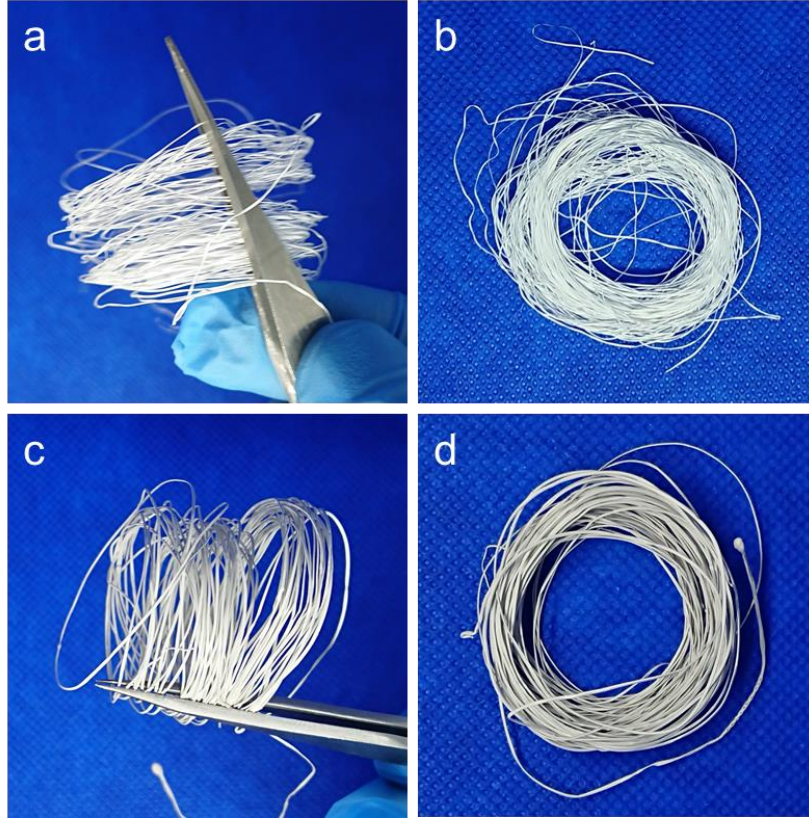
4.4. Sülfatiazol - AgNT Yüklü Fiberlere ait Karakterizasyon Sonuçları

Sülfonamidler ilk sentetik antibakteriyel ajanlar arasındadır ve bakteriyel enfeksiyonların etkin ve başarılı bir şekilde tedavi edilmesinde uzun yıllardan beri kullanılmaktadır [84]. Ticari olarak bulunan sülfonamidler sülfadiazin, sülfatiazol ve sülfametoksazoldür. İlaçların metal kompleksleri olarak uygulandıklarında gelişmiş farmakolojik aktivitelere sahip olabileceği iyi bilinmektedir [85]. Bu geçiş metalleri arasında gümüş iyonu (Ag^+) antibakteriyel özellikleri ile öne çıkar. Sonuç olarak, klinik olarak ilgili antibakteriyel ilaçların gümüş komplekslerinin hazırlanması, antibakteriyel etkiyi arttırmak için sıkça uygulanan bir yöntemdir. Gümüş sülfadiazin (Şekil 4.34.) yapısında hem sülfonamid hem de gümüş iyonu içeren ticari bir örnektir [86].



Şekil 4.34. Gümüş sülfadiyazın kimyasal yapısı.

Antibakteriyel etken maddenin gümüş iyonu kompleksi oluşturarak antibakteriyel etkinliğinin artırılması bilgisi ve mevcut ticari üründen yola çıkarak, bu tez çalışmasında da sülfonamid türevi olan sülfatiazol, ST etken maddenin gümüş nanoteller ile kompleks oluşturarak, antibakteriyel etkinliğin yüksek olduğu fiber formülasyon geliştirilmesi hipotezi kurulmuştur. Sülfonamidler arasında sülfatiazolün seçilmesinin sebebi ise asetonda tamamen çözünebilir olmasıdır. Antibakteriyel özellikte fiberlerin hazırlanmasında 80 kDa molekül ağırlığa sahip PCL yapısına ağırlıkça %10 oranda ST eklenerek PCL-ST fiberler elde edilmiştir. ST-AgNT kompleksini içeren PCL-ST-AgNT fiberleri ağırlıkça %2 AgNT ve %10 ST içermektedir. AgNT varlığının, fiberlerin antibakteriyel özelliklerine etkisini incelemek için ağırlıkça %2 AgNT içeren PCL-AgNT fiberlerde yapılan çalışmalarla eklenmiştir. Ek olarak film formülasyonları da hazırlanarak fiberlerin antibakteriyel etkinlikteki durumu incelenmiştir. Bu kapsamda DIED ile hazırlanan PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiberlere ait görüntüler Şekil 4.35.'de sunulmuştur.



Şekil 4.35. PCL-ST ve PCL-ST-AgNT kompozit fiberlerin yatay ve dikey görüntüleri. (a, b) PCL-ST, (c, d) PCL-ST-AgNT.

Şekil 4.35.'den de görülebileceği gibi DIED ile homojen, tek parça ve oldukça yüksek hacimde PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiberler elde edilmiştir. Çizelge 4.4.'de fiber kompozisyonu ve DIED ile üretim verimine ait değerler sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Numune adı, kompozisyon derişimi ve üretim verimi değerleri.

Örnek Adı	Kompozisyon	Üretim Verimi
PCL-ST	%10 (w/w) ST	%85
PCL-ST-AgNT	%10 ST (w/w), %2 (w/w) AgNT	%70

Bu kapsamda hazırlanan formülasyonlara ait karakterizasyon bulguları ve yapı özellik ilişkisi içerisinde tartışılarak sunulmuştur.

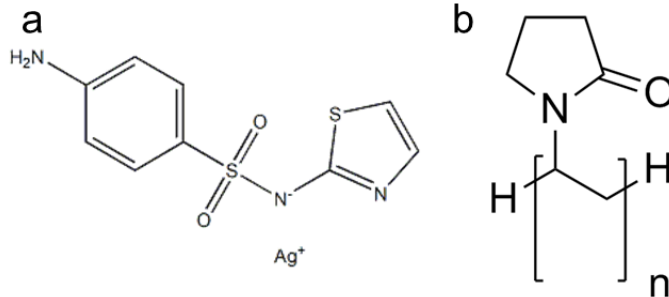
4.4.1. Sülfatiazol - AgNT Kompleksinin Kimyasal ve Morfolojik Özellikleri

Etanol içerisinde dağılık halde bulunan AgNT'lerin üzerine, aseton içerisinde tamamen çözülmüş ST damlatılarak eklenmiştir. Zamanla gözle görülür bir şekilde etanol ile AgNT-ST faz ayrımı oluşturmuş ve tekrar karıştırılsa dahi homojen bir şekilde etanol içerisinde AgNT'ler dağılmamıştır. AgNT ve ST eklenmiş AgNT'lerin etanol içerisindeki görüntüleri Şekil 4.36.'da sunulmuştur.

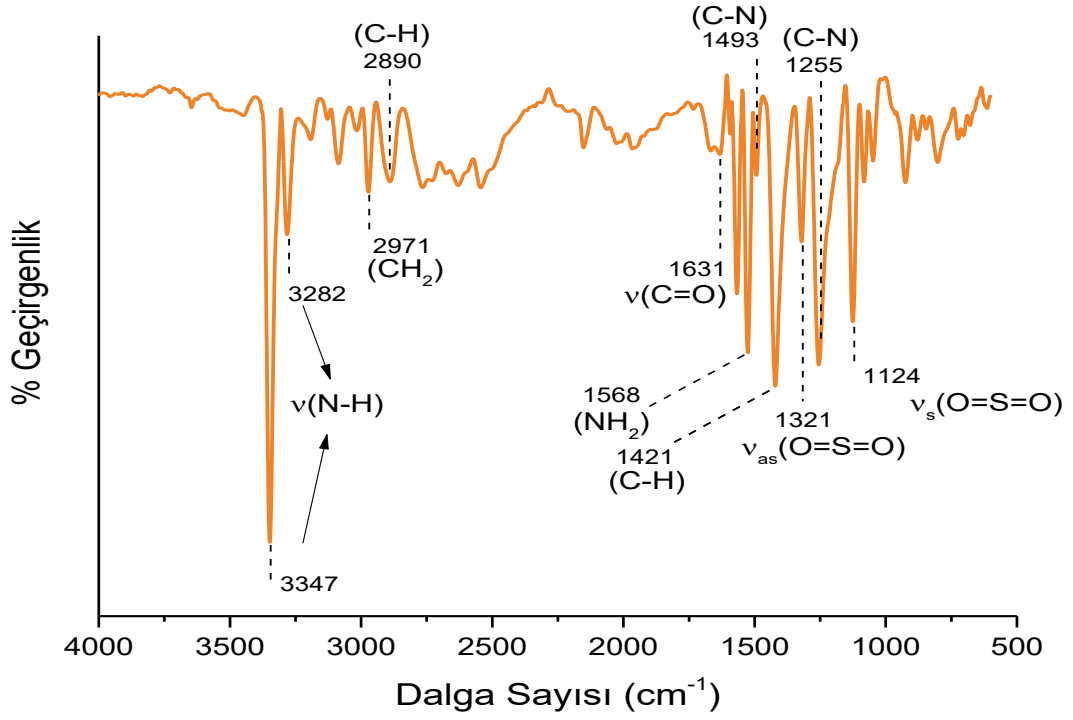


Şekil 4.36. ST-AgNT kompleksi (a) Etanol içerisinde dağılık halde bulunan AgNT dispersiyonu ve (b) ST karıştırıldıktan sonra etanol ile oluşan faz ayrımı görüntüleri.

FTIR analizi ile AgNT-ST karışımından elde edilen yapının kimyasal analizi gerçekleştirilmiştir. AgNT-ST yapısına ve AgNT yapısında bulunan PVP polimerine ait kimyasal yapı gösterimleri ve FTIR spektrumu sırasıyla Şekil 4.38 ve Şekil 4.37.'de verilmiştir.



Şekil 4.37. (a) Gümüş ST ve (b) AgNT yapısında bulunan PVP kimyasal yapısı gösterimi.

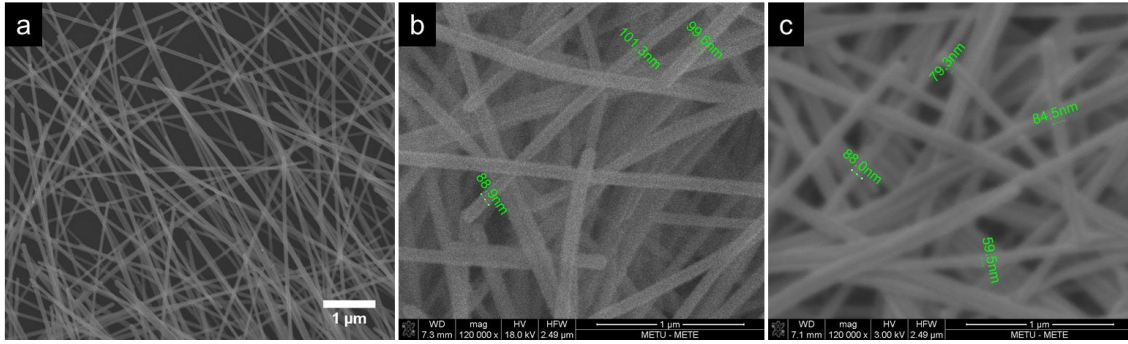


Şekil 4.38. AgNT-ST yapısına ait FTIR spektrumu.

Çizelge 4.5. AgNT-ST numunesinin FTIR spektrumundan elde edilen konumlar ve literatürdeki karşılıkları.

Numune	Konum	Konum (literatür)	Titreşim Türü
ST	3347	3354 [64]	v(N-H)
	3282	3321 [64]	v(N-H)
	1568	1626 [64]	(NH ₂)
	1493	1497 [64]	(C-N)
	1321	1323 [64]	v _{as} (O=S=O)
	1124	1140 [64]	v _{sim} (O=S=O)
PVP	2971	2923 [87]	(CH ₂)
	2890	2885 [87]	(C-H)
	1631	1650 [87]	v(C=O))
	1421	1460 [87]	(C-H)
	1255	1285 [87]	(C-N)

Şekil 4.39'da AgNT ve ST-AgNT SEM görüntüleri verilmiştir.

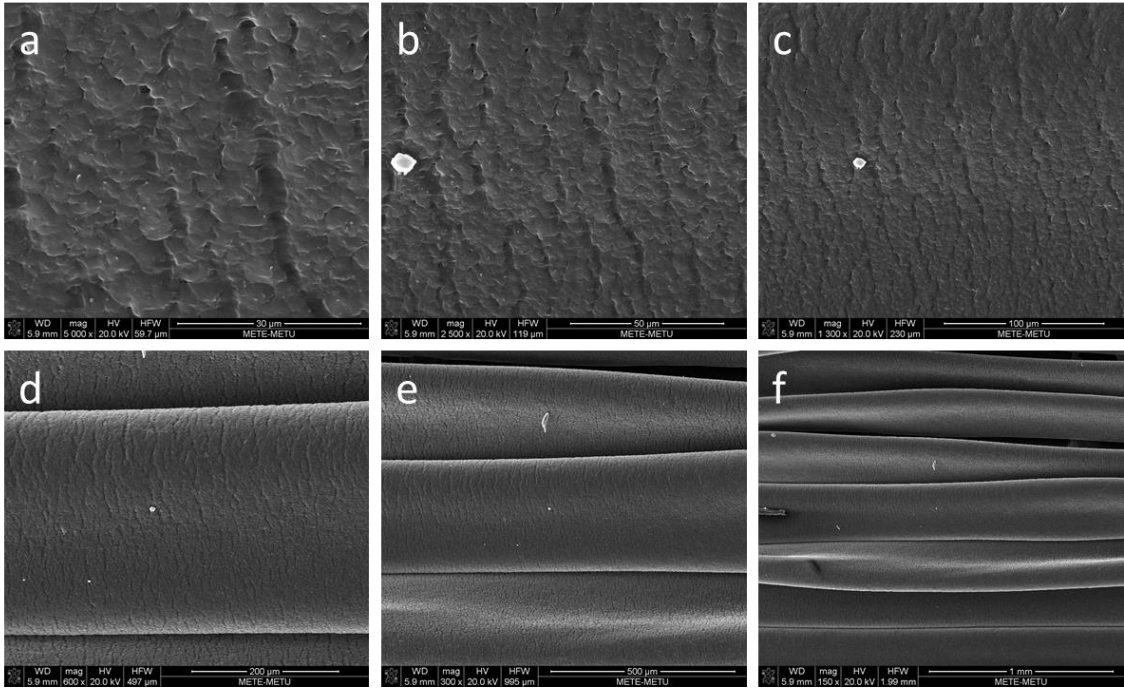


Şekil 4.39. (a) AgNT'lerden (x 40000 büyütme) ve (b), (c) AgNT-ST karışımından alınan SEM görüntüleri (x120000 büyütme).

Bölüm 4.2'de gerçekleştirilen AgNT karakterizasyonları sonucu AgNT'lerin çap değerlerinin çoğunluklar 51-55 nm değerinde olduğu ve 66-70 nm değerinden daha büyük çap değerine sahip AgNT bulunmadığı görülmüştür. Şekil 4.39.'da AgNT-ST karışımından alınan SEM görüntüsünde ise 85-100 nm aralığında çaplara sahip AgNT'lerin bulunduğu gözlenmiştir. AgNT'ler homojen bir şekilde bütünlüklerini koruyarak ST ile kaplandığı düşünülmektedir. Bu durum antibakteriyel özellikleri artırmanın yanı sıra gümüş nanoteller için büyük problem olan doğal korozyonu geciktirici özellik gösterebilir ve tellerin kullanım ömrünü elektronik çalışmalarda arttırabilir. İletkenlik değerleri ve yüzey kimyası üzerine ileri çalışmalar yapılma potansiyeli mevcuttur.

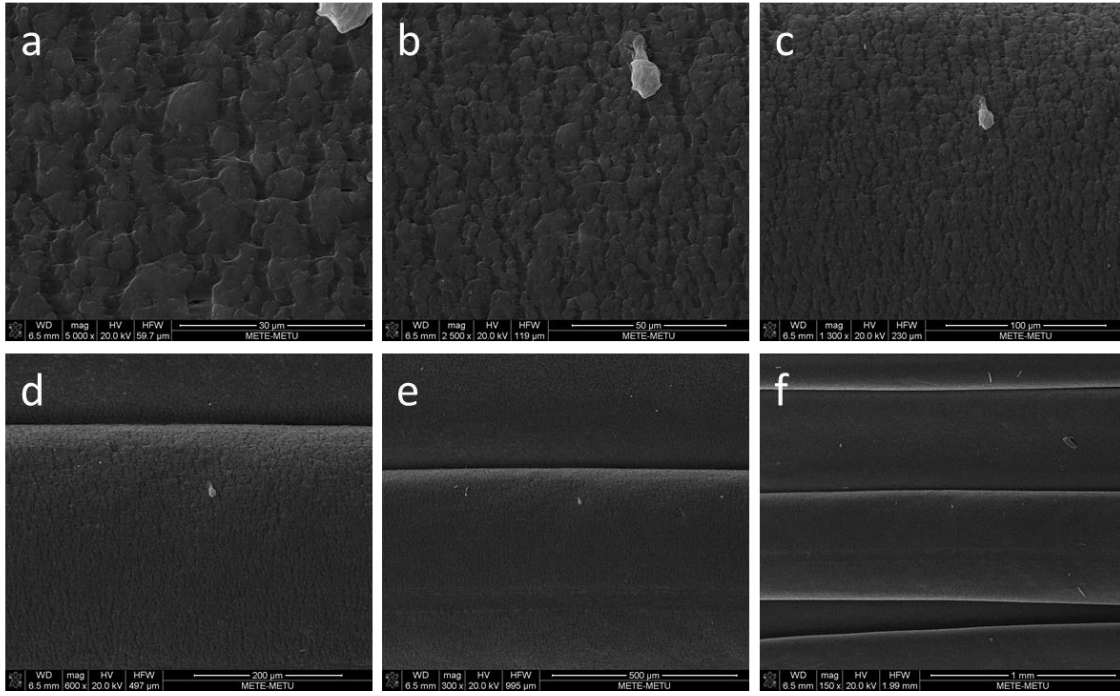
4.4.2. Sülfatiazol - AgNT Yüklü Fiberlerin Morfolojik Özellikleri

Şekil 4.40. ve Şekil 4.41.'de sırasıyla PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiberlere ait SEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.40. PCL-ST fiberlerin SEM görüntüleri. Tek fiber için, (a) 5000x büyütme, (b) 2500x büyütme, (c) 1300x büyütme. Fiberler demeti için, (d) 600x büyütme, (e) 300x büyütme ve (f) 150x büyütme.

PCL-ST fiberlerine ait SEM görüntüleri incelendiğinde, yüzeyinin Şekil 4.4.'de SEM görüntüsü verilen PCL yüzeyine benzer morfolojide olduğu görülmektedir. SEM görüntülerinde büyütme azaldıkça Şekil 4.40. (d) – (f), PCL-ST fiberlerin homojen, çatlaksız ve bütünlük içinde üretildiği görülmektedir. Bu durum PCL ve ilaç etken maddenin ortak çözücü sorunun bulunmadığını göstermektedir. İlaç etken maddelerin çözünme sorunun olması polimerler ile işlenebilirliklerini azaltmaktadır. PCL-ST fiberlere ait SEM görüntüleri üzerinden (Şekil 4.41.), fiberlerin ortalama çapları $285 \pm 24 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. Ortalama fiber çapları Çizelge 4.5.'de belirlenmiştir. Şekil 4.40. ve Şekil 4.41.'de verilen SEM görüntüleri karşılaştırıldığında, PCL-ST-AgNT fiber yüzeylerinin PCL-ST fiber yüzeylerine göre daha pürüzlü bir yapıda olduğu görülmektedir.



Şekil 4.41. PCL-ST-AgNT fiberlerin SEM görüntüleri. Tek fiber için, (a) 5000x büyütme, (b) 2500x büyütme, (c) 1300x büyütme. Fiber demeti için, (d) 600x büyütme, (e) 300x büyütme ve (f) 150x büyütme.

PCL-ST-AgNT fiberlere ait SEM görüntülerinde, ortalama çap değeri 520 ± 40 μm ölçülmüştür (Çizelge 4.6.). PCL-ST-AgNT fiberleri, PCL-ST fiberlerine göre daha kalındır.

Çizelge 4.6. PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiber çap değerleri istatistiksel analizi

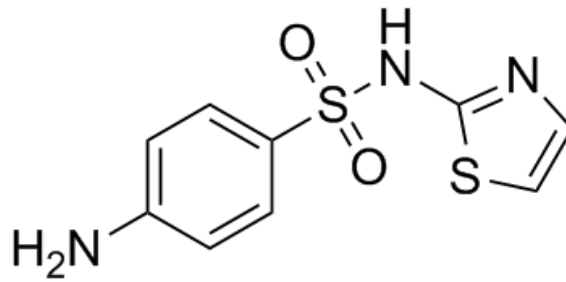
Numune	Fiber Çapı (μm)
PCL-ST	285 ± 25
PCL-ST-AgNT	520 ± 40

Veriler ortalama \pm standart sapma ile ifade edildi. (n=20)

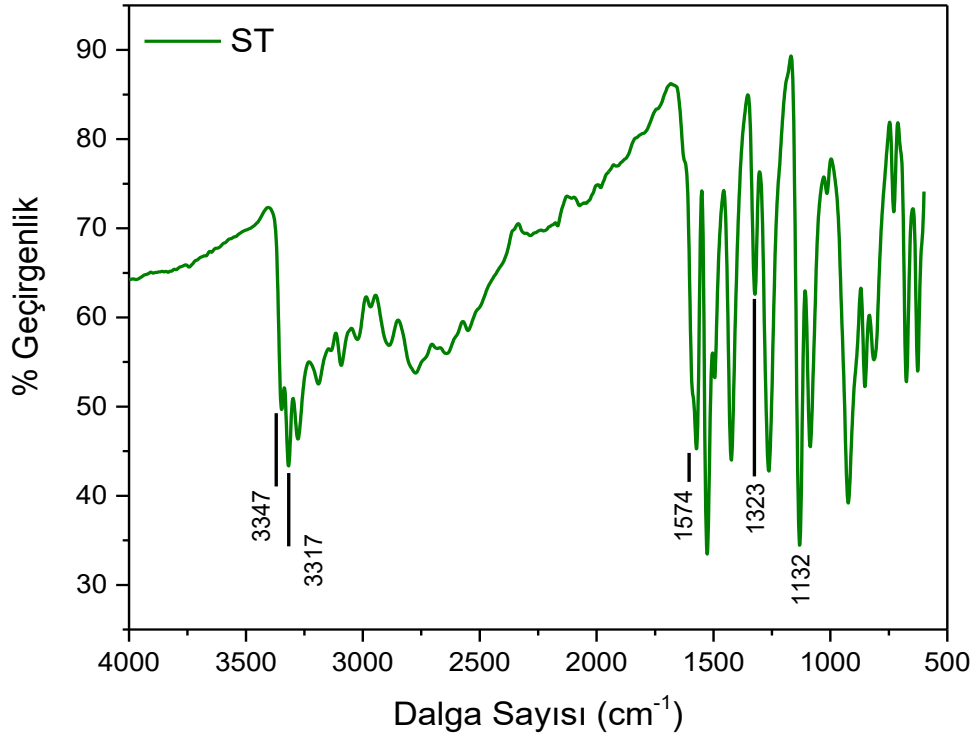
PCL-ST-AgNT fiberin yüzeyinde PCL-ST'ye göre daha pürüzlü olduğu ve çap değerinin yaklaşık iki kat fazla olduğu görülmektedir. Polimer çözeltisindeki katkı maddelerinin varlığı, faz değişimi işleminin hem termodinamik hem de kinetiğini etkileyerek fiberlerin morfolojisini değiştirmiştir [88].

4.4.3. Sülfatiazol - AgNT Yüklü Filmlerin Kimyasal Özellikleri

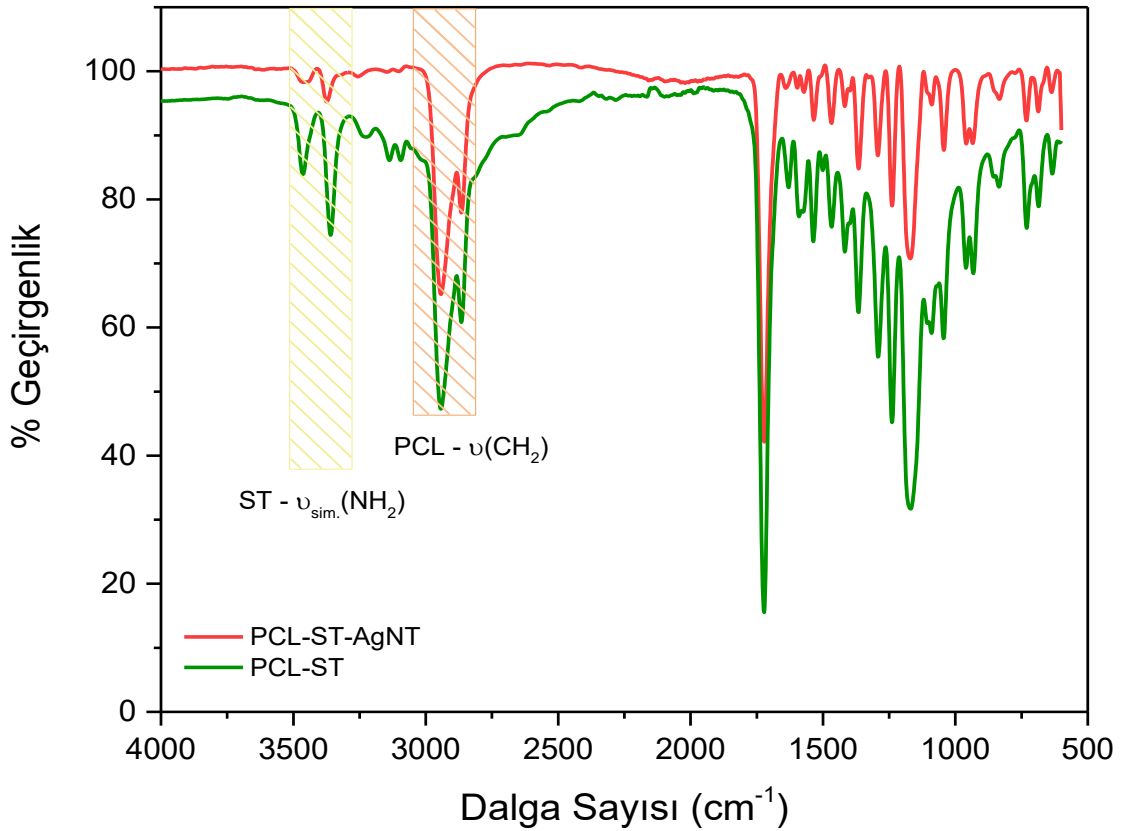
Kimyasal karakterizasyonlara öncelikle kimyasal yapısı Şekil 4.42.'de verilen sülfonamid grubu antibakteriyel ilaç sülfatiazolün analizi ile başlanmıştır. Şekil 4.43'de sülfatiazole ait FTIR spektrumu verilmiştir. ST ye ait IR bandları kimyasal yapıyı doğrulamaktadır. PCL-ST ve PCL-ST-AgNT kompozit filmlere FTIR spektrumları da Şekil 4.44.'da verilmiştir. ST'nin FTIR spektrumunda 3347 ve 3317 cm^{-1} NH_2 gerilme modları görünürken, PCL-ST ve PCL-ST-AgNT filmlerinde bu bantlar sırasıyla 3463, 3359 cm^{-1} ve 3448, 3372 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Amino grubu, (H-N-H), açısız deformasyonu ST için 1574 cm^{-1} 'de PCL-ST için 1631'de ve PCL-ST-AgNT için 1640 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. ST FTIR spektrumunda gözlenen, sülfonil grubunun temel titreşim modu olan, $\nu_{\text{sim. ger.}}$ ($\text{O}=\text{S}=\text{O}$) ve $\nu_{\text{asm. ger.}}$ ($\text{O}=\text{S}=\text{O}$) sırasıyla 1132 ve 1323 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. ST'de gözlenen sülfonil grubu temel titreşim bantlarından 1132 cm^{-1} konumundaki $\nu_{\text{sim. ger.}}$ ($\text{O}=\text{S}=\text{O}$) bandı PCL-ST ve PCL-ST-AgNT için PCL'e ait 1170 cm^{-1} 'de bulunan $\nu_{\text{sim. ger.}}$ (C-O-C) bandı ile üst üste gelmiştir. Diğer 1323 cm^{-1} 'de bulunan $\nu_{\text{asm. ger.}}$ ($\text{O}=\text{S}=\text{O}$) gerilim bandı PCL-ST ve PCL-ST-AgNT için sırasıyla 1363 ve 1365 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. PCL'e ait karakteristik gerilmeler olan 2942 ve 2864 cm^{-1} , $\nu_{\text{sim.}} \& \nu_{\text{asm.}}$ (CH_2), 1722 cm^{-1} $\nu_{\text{ger.}}$ ($\text{C}=\text{O}$), 1170 cm^{-1} $\nu_{\text{sim. ger.}}$ (C-O-C) ve kristalin faz gerilimi $\nu_{\text{ger.}}$ (C-C) belirgin bir şekilde PCL-ST ve PCL-ST-AgNT örnekleri spektrumlarında gözlenmiştir.



Şekil 4.42. ST molekül yapısı gösterimi.



Şekil 4.43. ST ilaç etken maddesine ait FTIR spektrumu.



Şekil 4.44. PCL-ST ve PCL-ST-AgNT numunelere ait FTIR spektrumu.

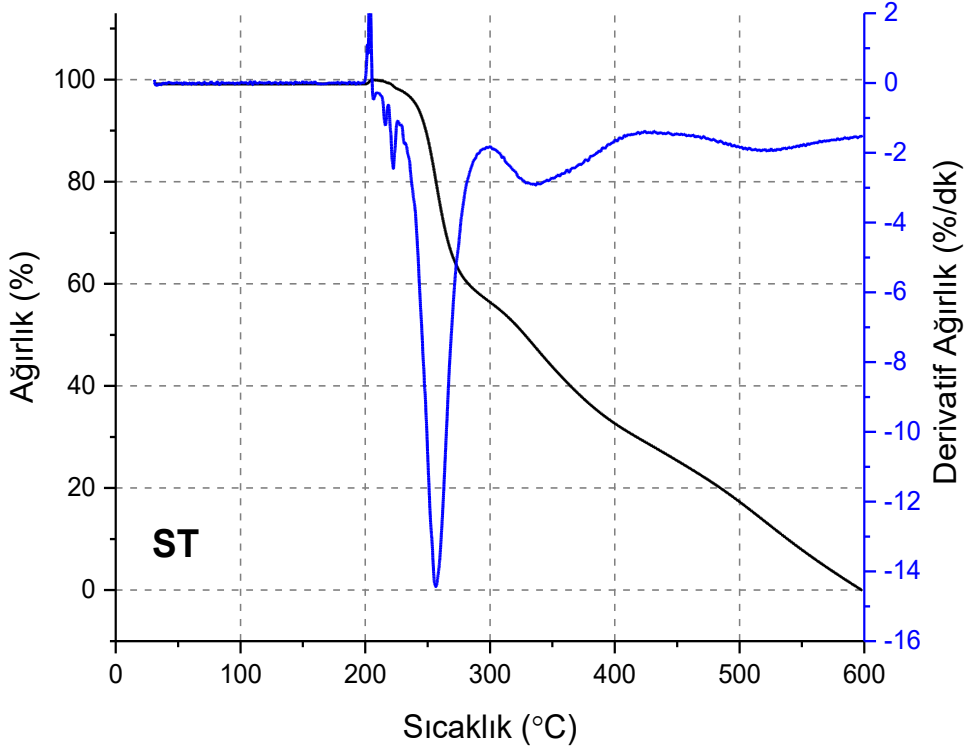
PCL-ST ve PCL-ST-AgNT filmlere ait ayırt edici bantlar Çizelge 4.6.'de literatürde mevcut olan referansları ile birlikte verilmiştir.

Çizelge 4.7. ST, PCL-ST ve PCL-ST-AgNT numunelerin FTIR spektrumlarından elde edilen bant konumları ve literatürdeki karşılıkları

Numune	Bant (cm ⁻¹)	Literatürdeki Bant (cm ⁻¹)	Titreşim Türü	
ST	3347	3354 [64]	ν _{asm. ger.} (NH ₂)	
	3317	3321 [64]	ν _{sim. ger.} (NH ₂)	
	1574	1626 [64]	ν _{ger.} (H-N-H)	
	1323	1323 [64]	ν _{asm. ger.} (O=S=O)	
	1132	1140 [64]	ν _{sim. ger.} (O=S=O)	
PCL-ST	3463	3409 [64]	ν _{asm. ger.} (NH ₂)	
	3359	3339 [64]	ν _{sim. ger.} (NH ₂)	
	2942,2864	2949, 2865 [75]	ν _{sim.} & ν _{asm.} (CH ₂)	
	1722	1727 [75]	ν _{ger.} (C=O)	
	1631	1636 [64]	ν _{ger.} (H-N-H)	
	1363	1323 [64]	ν _{asm. ger.} (O=S=O)	
	1290	1293 [75]	ν _{ger.} (C-C)	
	1170	1170 [75]	ν _{sim. ger.} (C-O-C)	
	PCL-ST-AgNT	3448,3372	3409,3339 [64]	ν _{asm.} & ν _{sim.} (NH ₂)
		2942,2865	2949, 2865 [75]	ν _{sim.} & ν _{asm.} (CH ₂)
1722		1727 [75]	ν _{ger.} (C=O)	
1640		1636 [64]	ν _{ger.} (H-N-H)	
1567,1533		1630 [77]	ν _{ger.} (C=O)	
1365		1323 [64]	ν _{asm. ger.} (O=S=O)	
1294		1293 [75]	ν _{ger.} (C-C)	
1170		1170 [75]	ν _{sim. ger.} (C-O-C)	

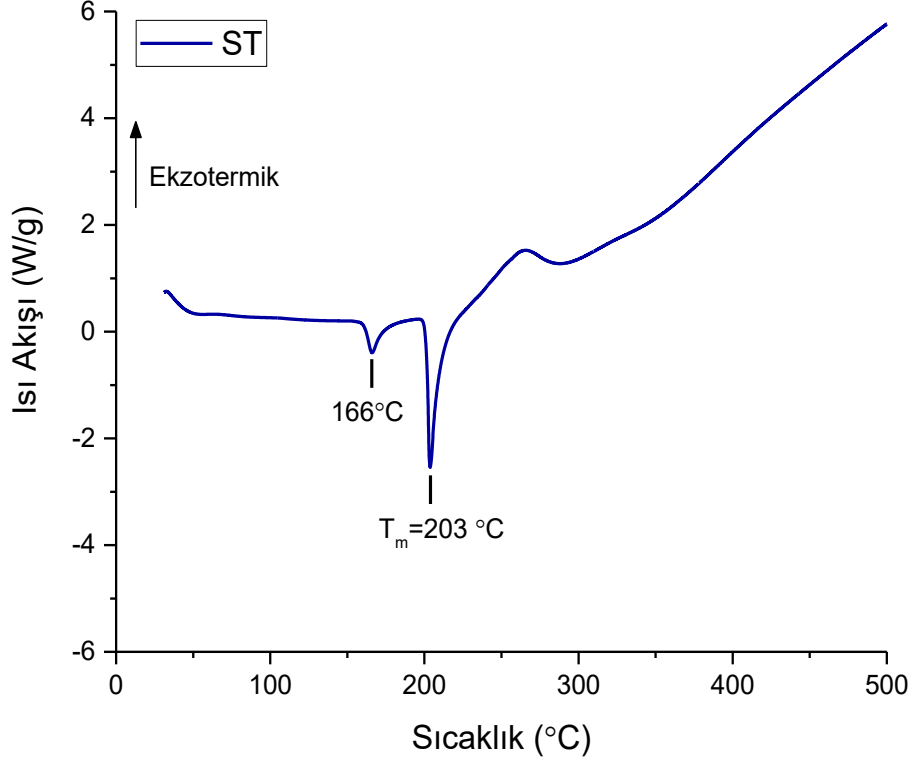
4.4.4. Sülfatiazol - AgNT Yüklü Filmlerin Termal Özellikleri

Etken maddesi toz ST'ye ait TGA termogramı Şekil 4.45.'de verilmiştir. TGA termogramı incelendiğinde 2 basamaklı termal bozunma profili gözlenmiştir. Isıl bozunmanın birinci basamağında ST bozunması, yaklaşık 230 °C başlayıp 290 °C'da sona ermiştir. Isıl bozunmanın ikinci basamağı yaklaşık 305 °C başlayıp 396 °C'de sona ermiştir. 500 °C'de ST tozun kütlece %82.7'si bozunmuştur.



Şekil 4.45. ST ilaç etken maddesine ait TGA termogramı.

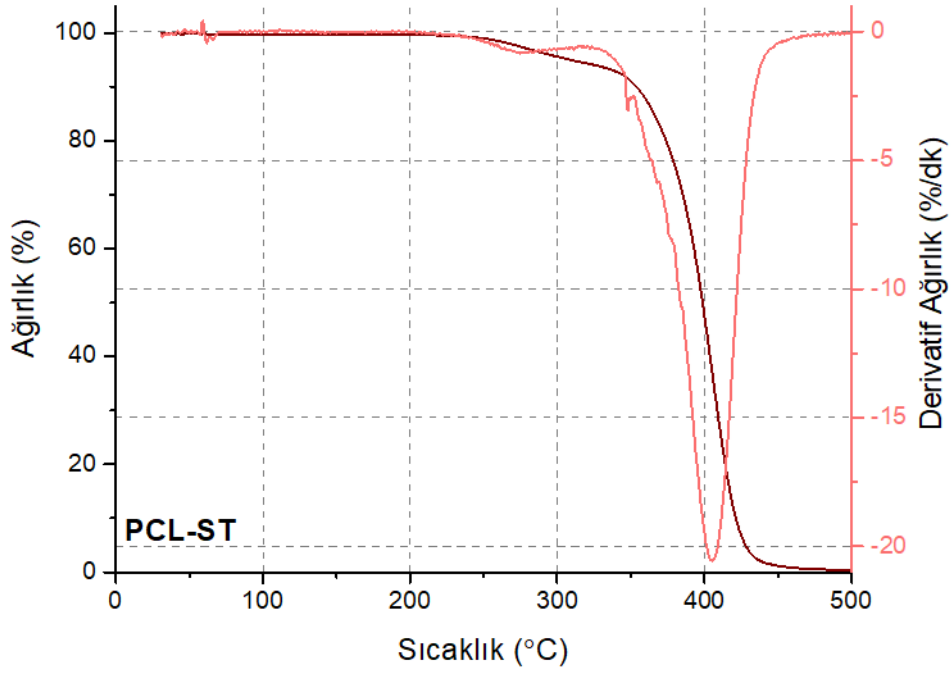
TGA verileri ile eş zaman ısı akışı verilerinin toplanmasıyla elde edilen DSC grafiği Şekil 4.46.'de verilmiştir. ST'ye ait DSC termogramı incelendiğinde, 166 °C de katı-katı polimorfizm geçişi, 203 °C'de ise erime sıcaklığı gözlenmiştir [89].



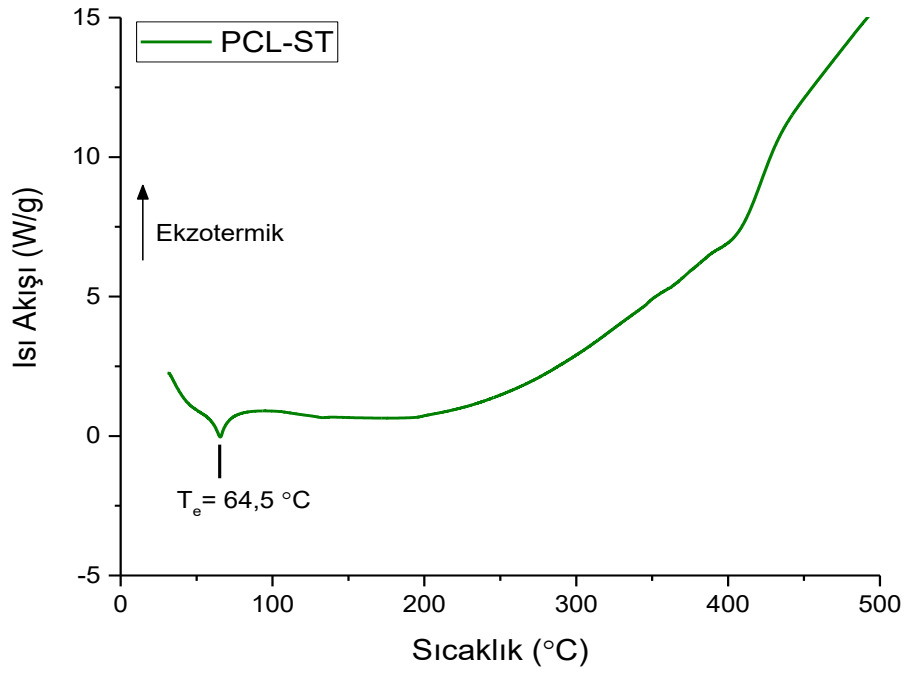
Şekil 4.46. ST ilaç etken maddesine ait DSC termogramı.

PCL-ST filmine ait TGA termogramı Şekil 4.47.'de verilmiştir. TGA termogramı incelendiğinde 2 basamaklı bozunma profili gözlenmiştir. Isıl bozunmanın birinci basamağında ST bozunması, 247 - 293 °C arasında gerçekleşmiştir. Isıl bozunmanın ikinci basamağında PCL'e ait bozunma 336 °C'de başlayıp 442 °C'de sona ermiştir. 500 °C'de PCL-ST filmin kütlece % 99.6'sı bozunmuştur.

TGA verileri ile eş zaman ısı akışı verilerinin toplanmasıyla elde edilen DSC grafiği Şekil 4.48.'de verilmiştir. PCL-ST filmine ait DSC termogramı incelendiğinde erime sıcaklığı 64.5 °C olarak gözlenmiştir. PCL filmi için erime noktası değeri Şekil 4.17.'de verilen DSC termogramı üzerinden 61 °C olarak tespit edilmiştir. PCL-ST ve PCL filmler arasında 3.5 °C sıcaklık farkı görülmektedir. Bu durum, ilacın polimer yapısına katılmasının, erime noktasını arttırdığına işaret etmektedir.

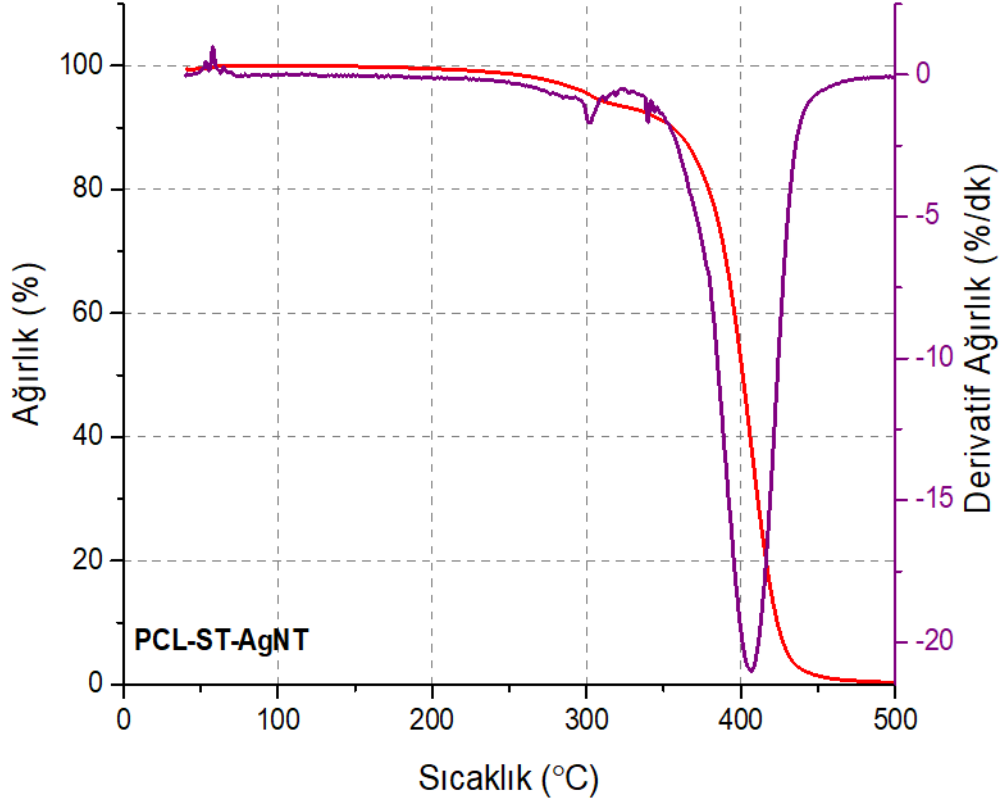


Şekil 4.47. PCL-ST filmine ait TGA termogramı.



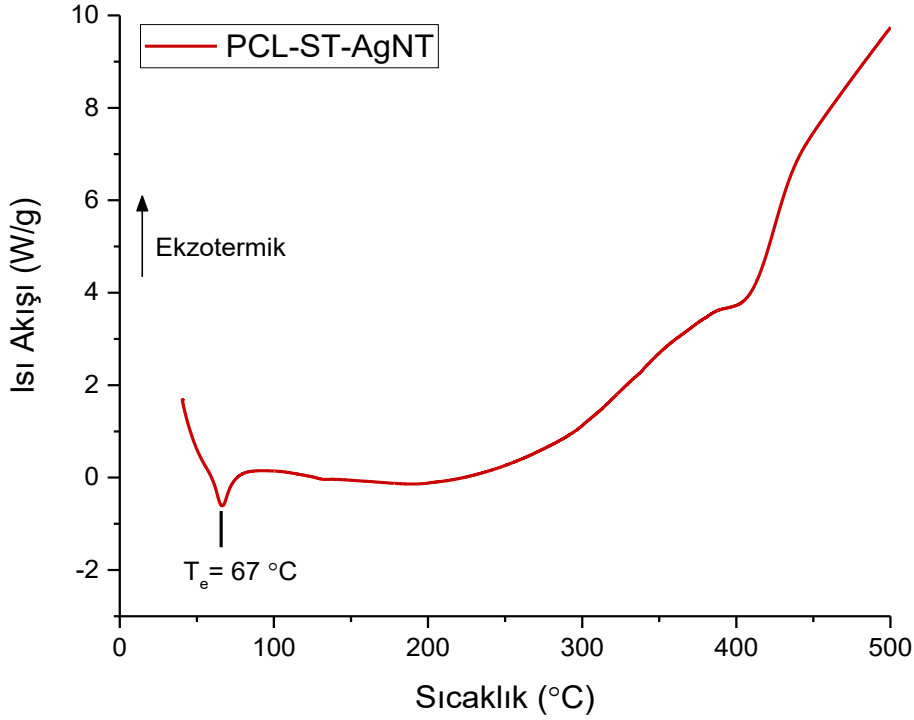
Şekil 4.48. PCL-ST filmine ait DSC termogramı.

PCL-ST-AgNT filmine ait TGA termogramı Şekil 4.49.'de verilmiştir. TGA termogramı incelendiğinde 2 basamaklı bozunma profili gözlenmiştir. Isıl bozunmanın birinci basamağında ST bozunması, yaklaşık 297 °C'de başlayıp 308 °C'de sona erdiği gözlenmiştir. Isıl bozunmanın ikinci basamağında PCL'e ait bozunma 346 °C'de başlayıp 443 °C'de sona ermiştir. 500 °C'de PCL-ST-AgNT filmin kütlece % 99.7'si bozunmuştur.



Şekil 4.49. PCL-ST-AgNT filmine ait TGA termogramı.

TGA verileri ile eş zaman ısı akışı verilerinin toplanmasıyla elde edilen DSC grafiği Şekil 4.50.'de verilmiştir. PCL-ST-AgNT filmine ait DSC termogramı incelendiğinde erime sıcaklığı 67 °C olarak gözlenmiştir.

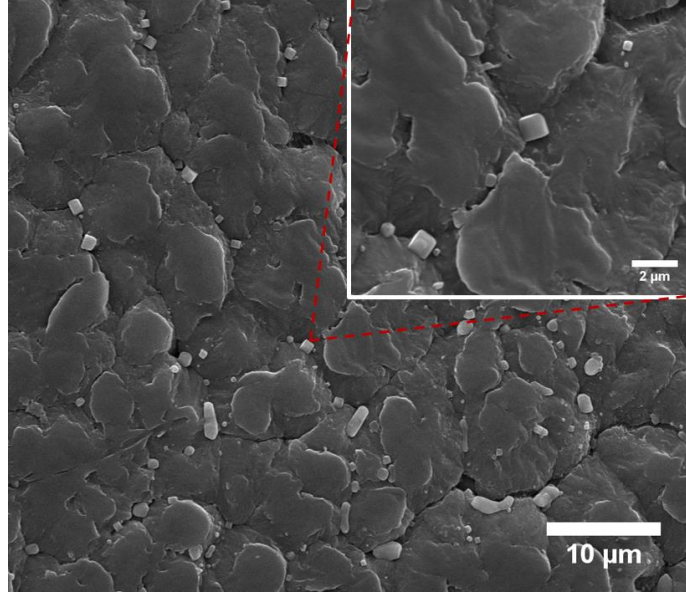


Şekil 4.50. PCL-ST-AgNT filmine ait DSC termogramı.

Bir önceki bölümde incelenen PCL için erime sıcaklığı 61 °C (Şekil 4.17.), PCL-ST için 64 °C ve PCL-ST-AgNT için 67 °C olarak saptanmıştır. AgNT içeriğine sahip kompozisyonların PCL'e göre daha yüksek erime sıcaklığına sahip olduğu, tezin iskelet kası iskelesi karakterizasyon çalışmalarında da gözlenmiştir.

Ağırlıkça %10 derişimde ST içeren PCL-ST ve PCL-ST-AgNT numunelerine ait DSC termogramları incelendiğinde, PCL'e ait endotermik erime geçişi gözlenirken, ST'ye ait erime piki saptanamamıştır. Bunun polimer içerisindeki ST miktarının düşük miktarda olmasından ve soğutma sistemi mevcut olmayan termal analiz cihazından kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürde Zue ve ark. PCL-Jelatin hibrit fiberler içerisinde farklı derişimlerde metronidazol antibiyotik ilaç etken maddesi katmış ve DSC ile termal özelliklerini incelemişlerdir. Bu çalışmaya göre metronidazol miktarının polimere göre ağırlıkça %20 ve altında kaldığı değerlerde ilaç etken maddeye ait erime piki gözlenmemiştir. Ancak %30 ve üstündeki metronidazol miktarına sahip örneklerde ilaın kristal yapısını gösteren erime pikini gözlemlenmiştir [90].

DIED ile PCL-ST fiber üretiminden yaklaşık 1 ay sonrasında, morfolojik değişimlerin incelenmesi amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.51)

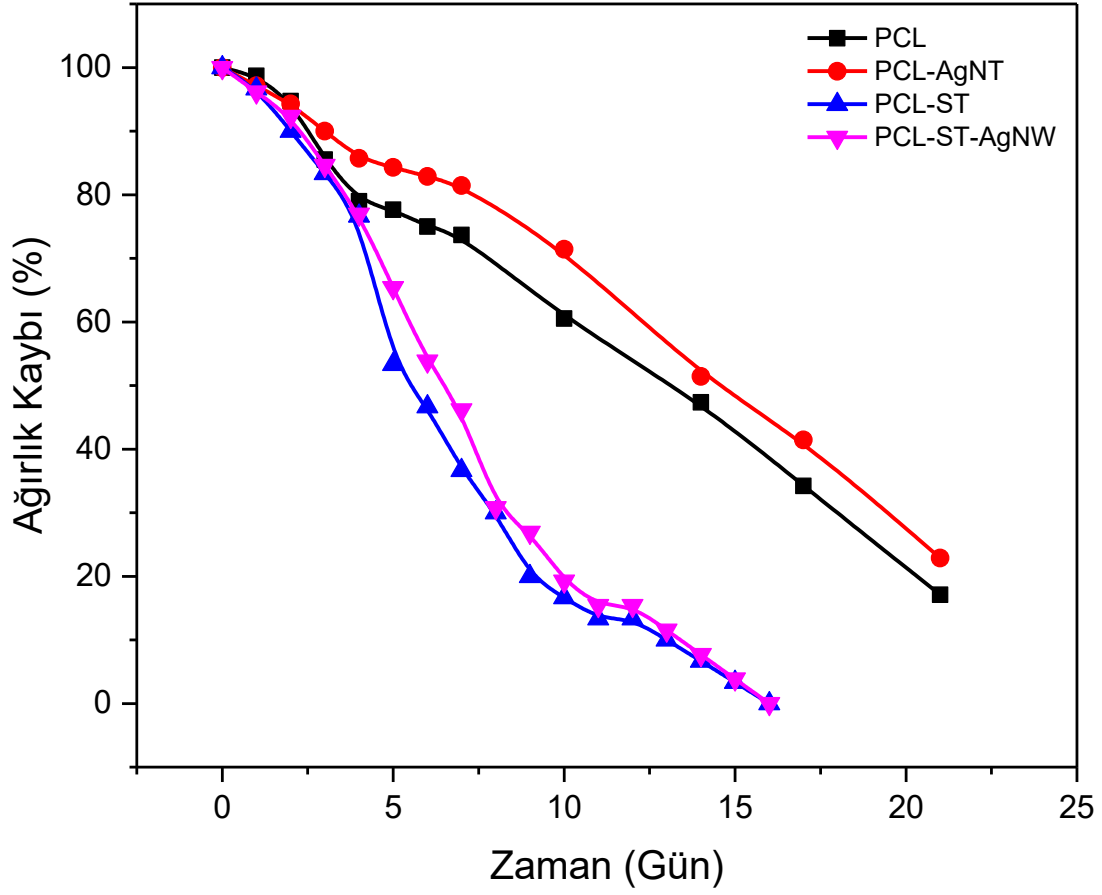


Şekil 4.51. PCL-ST fiber yüzeyinden alınan SEM görüntüsü. (x5000 ve şekil içi x40000 büyütme)

DIED ile PCL-ST fiber üretiminden 1 ay sonra alınan SEM görüntüsü incelendiğinde yüzeyde kübik kristal formda ve genel olarak iyice kurumuş polimer ara yüzeyleri arasında dağılmış yapılar görülmektedir. Bu sonuç ST'nin DSC termogramında erime piki görülememiş olsa da ST'nin polimer yapısına katılması ve ıslak eğirme işlemi sonrasında kübik kristal yapısını koruduğunu göstermiştir.

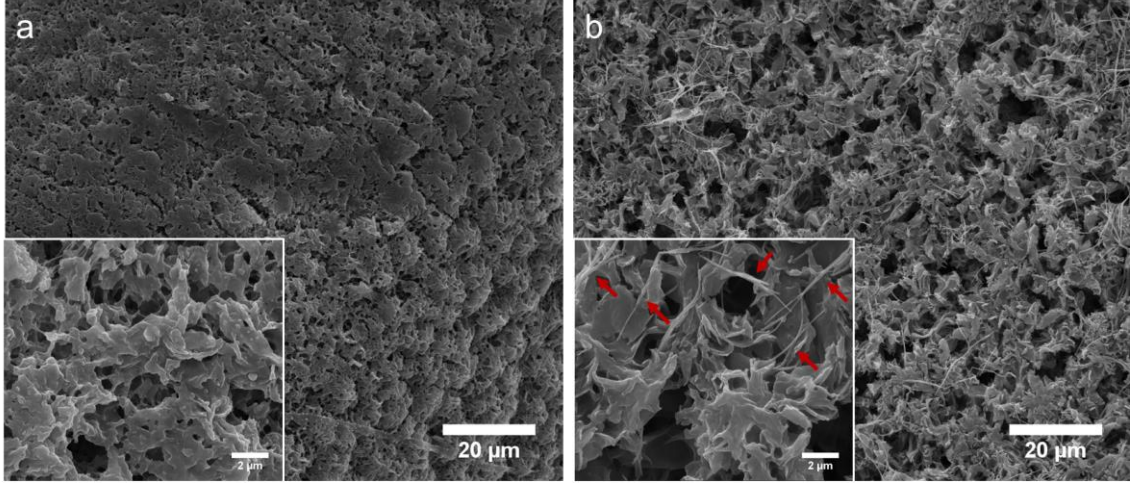
4.4.5. Sülfatiazol - AgNT Yüklü Fiberlerin Biyobozunma Davranışları

Fiberlerde, ilaç etken maddesi ST'nin yapıya eklenmesiyle in vitro bozunma çalışmalarında meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. Enzimatik ortamda zamana bağlı olarak PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiberlerin de meydana gelen ağırlık kayıpları Şekil 4.52.'de sunulmuştur. Enzimatik ortamda 21 günlük inkübasyon sonrasında PCL fiberlerin yaklaşık %17'si, PCL-AgNT fiberlerin ise yaklaşık %23'ü bozunmadan kalırken, PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiberlerinde 16. günden sonra tartım alınamamıştır.



Şekil 4.52. Fiber numunelerin lipaz varlığında PBS çözeltisi ortamlarındaki biyobozunma profilleri.

Biyobozunma morfolojilerini incelemek amacı ile Şekil 4.53.'de 16 günlük enzimatik bozunma periyodu sonrasında PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiberlere ait SEM görüntüleri sunulmuştur.



Şekil 4.53. Fiberlerin, 16 gün PBS içerisinde lipaz varlığında bozunmaları sonrasındaki SEM görüntüleri. (a) PCL-ST ve (b) PCL-ST-AgNT (Görüntüler x2500 ve görüntü içi x20000 büyütme ile alınmıştır.)

PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiberlerin, 21 günlük enzimatik ortamda bozunmasının ardından SEM görüntüleri incelenmiştir. Buna göre PCL-ST fiber yüzeyinin yüzey erozyonu tipi biyobozuma sonrası oldukça pürüzlü hale geldiği görülmektedir (Şekil 4.53.a). Yüzey erozyonu tipi biyobozuma ilaç taşıyıcı sistemler için istenen bir özelliktir ve polimer matriksinden ilaç salımı polimerin bozunma hızı ile kontrol edilir. PCL-ST-AgNT fiber yüzeyleri PCL-ST ile karşılaştırıldığında, yüzeyde aşınmanın daha fazla olduğu görülmektedir. Şekil 4.53.b'de AgNT'lerin yüzeyde çok belirgin olduğu, polimer matriksinden ayrılmadığı ve fiberlerde yer yer geniş gözeneklerin açıldığı görülmektedir.

4.4.6. Sülfatiazol - AgNT Yüklü Fiber ve Filmlerin Antibakteriyel Etkinlikleri

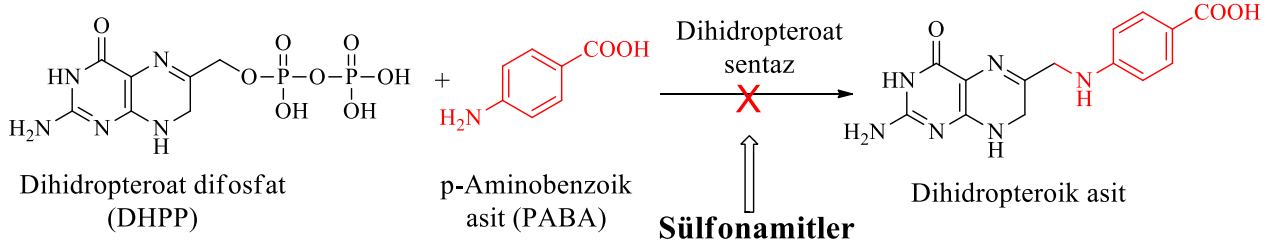
4.4.6.1 Disk Difüzyon Testi Sonuçları

PCL-AgNT, PCL-ST ve PCL-ST-AgNT kompozit film ve fiberlerin antibakteriyel etkinlikleri disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir. 4 farklı bakteri türü için malzemelerin oluşturdukları inhibisyon zonları incelenerek malzemelerin antibakteriyel etkinlikleri belirlenmiştir. Oluşan inhibisyon zonlarına ait çap değerleri hassas bir şekilde ölçülerek not edilmiştir. Çizelge 4.7.'de malzemenin antibakteriyel aktivitesi, bakteri türüne göre oluşan inhibisyonu zon çapı üzerinden belirtilmiştir.

Çizelge 4.8. Disk difüzyon testi sonucunda malzemelerin belirli bakteri türleri üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları.

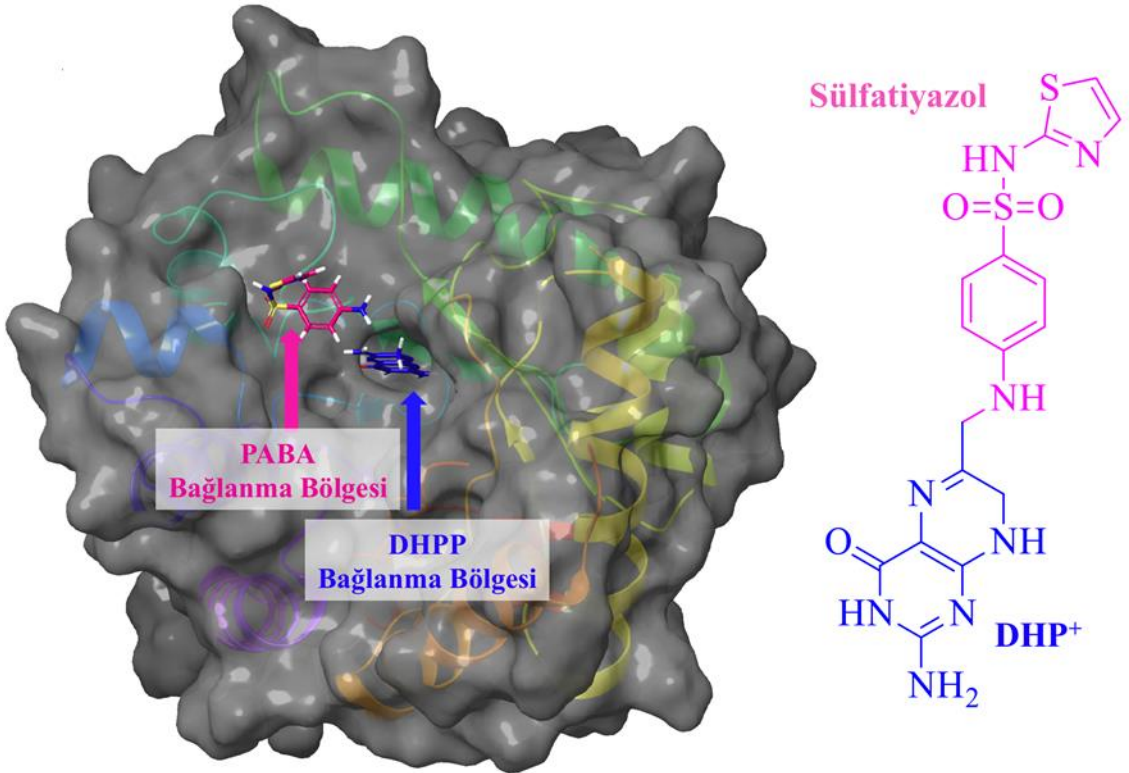
Örnek Adı	<i>E. coli</i> ATCC 25922 (mm)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (mm)	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (mm)	<i>MRSA</i> ATCC 43300 (mm)
(B1) PCL Film	-	-	-	-
(B2) PCL Fiber	-	-	-	-
(B3) PCL-AgNT Film	-	-	-	-
(B4) PCL-AgNT Fiber	-	-	-	-
(B5) Kontrol ST	2.90	2.20	2.90	3.00
(B6) Kontrol AgNT	-	-	-	-
(B7) PCL-ST Film	1.10	-	1.10	1.30
(B8) PCL-ST Fiber	-	-	-	-
(B9) PCL-ST-AgNT Film	1.10	1.10	1.20	1.60
(B10) PCL-ST- AgNT Fiber	1.80	1.00	1.80	1.85

Disk difüzyon testler kontrolü olarak fiber ve filmler için kullanılan konsantrasyonda 6 mm çapındaki steril kağıt disklere emdirilmiş sülfonamid grubu etken madde sülfatiazol tüm bakteri türlerinde antibakteriyel etki göstermiştir. Sülfonamidler bakteriyel folik asit sentezi inhibitörü olarak etmektedir [84]. Şekil 4.54. sülfonamidlerin antibakteriyel etki mekanizmasını göstermektedir. Bu reaksiyonda dihidropteroat sentaz (DHPS), dihidropteroik asit oluşturmak için p-aminobenzoik asit (PABA) ile dihidropteroat difosfat (DHPP) arasındaki reaksiyonu katalize eden bir enzimdir. Bu reaksiyon bakteriyel folat sentez yolunda önemli bir adımdır (Şekil 4.54.) [91].



Şekil 4.54. Sülfonamidlerin antibakteriyel aktivite mekanizmasının şematik gösterimi.

Sülfonamidler, PABA'nın kimyasal yapısını taklit ederek DHPS'yi hedefler ve enzimin PABA bağlayıcı kısmına bağlanır (Şekil 4.55.). Bu folat biyosentezinin sülfonamidler tarafından kesilmesi, folik asit metabolizmasını inhibe eder, böylece bakteriyel büyüme önemli ölçüde baskılanır [92].

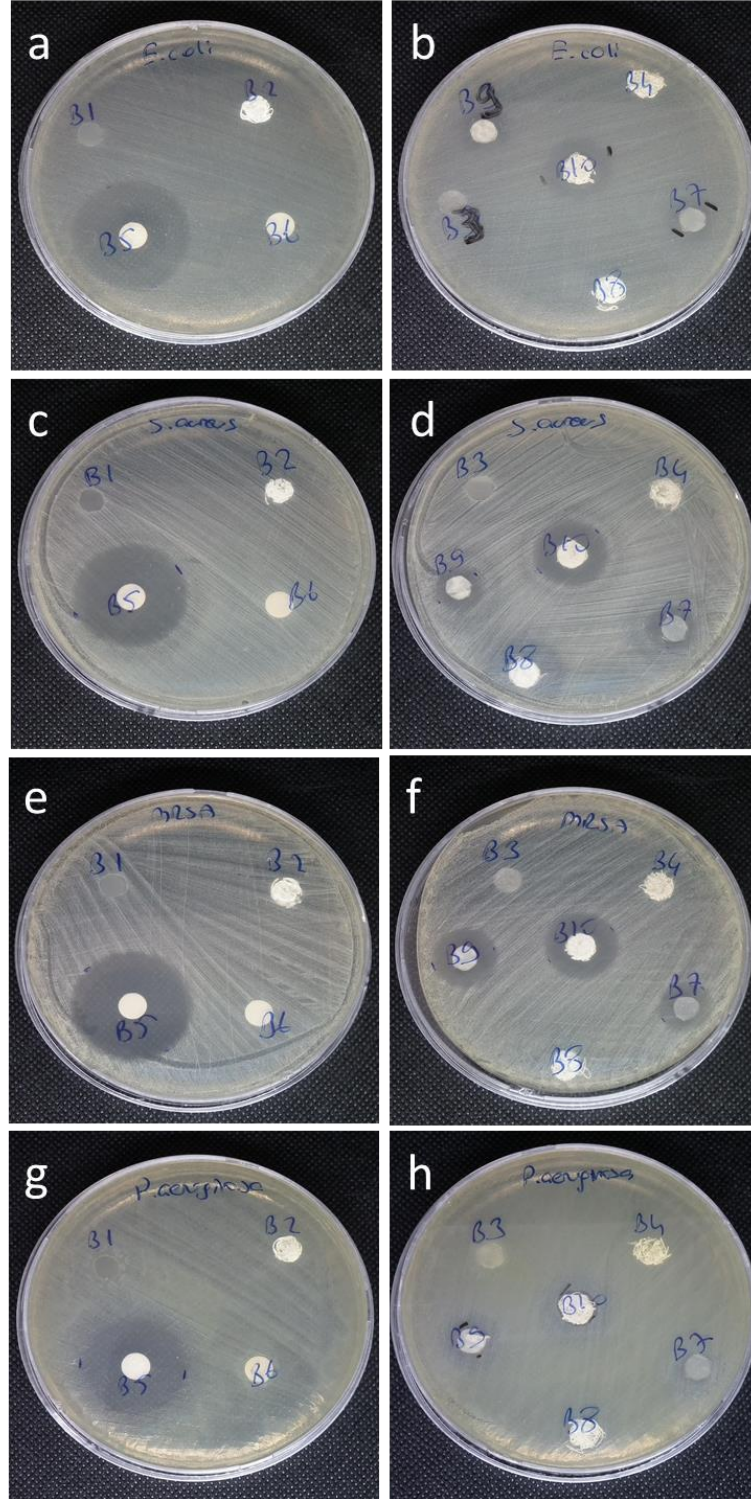


Şekil 4.55. Sülfatiazolün antibakteriyel aktivite mekanizması.

Disk difüzyon testlerinde beklediği üzere PCL film ve fiberlerde inhibisyon zonu açılması olmamıştır. Ağırlıkça %2 AgNT içeren komposit film ve fiberlerde 4 bakteri türü için zon açılması, antibakteriyel etkinlik gözlenmemiştir. AgNT'in PCL yapısına gömülü olması, düşük konsantrasyona bulunması ve PCL'in bozuması ile yüzeyden temas ile Ag⁺ salımı ile antibakteriyel etkinlik gösterecek

olması ile bu durum açıklanabilmektedir. Pazos-Ortiz ve ark. PCL içerisine gömülü farklı dozlarda Ag nano partiküllerin antibakteriyel aktivitesini incelemişlerdir. Buna göre kompozit fiberlerin antimikrobiyal aktivitesinin doza bağlı olarak değiştiğini göstermişlerdir [93]. PCL-ST filmlerin inhibisyon zon açılma çapları *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 ve *Metisiline* dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 için sırasıyla 1.1 mm, 1.1 mm, ve 1.3 mm olarak ölçülmüştür. PCL-ST fiberinde ise zon çalması gözlenmemiştir. Antibakteriyel aktivite açısından en etkin sonuç PCL-ST-AgNT film ve fiber örnekler üzerinden elde edilmiştir. Bu sonuç tezin hipotezini doğrulamakta ve PCL içerisinde AgNT varlığında sülfatiazolun antibakteriyel etkinliğinin arttığını göstermektedir. PCL-ST-AgNT filmlerin zon açılma çapları *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213 ve *Metisiline* dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 için sırasıyla 1.1 mm, 1.1 mm, 1.2 mm, 1.6 mm olarak ve fiberler için 1.80 mm, 1 mm, 1.80 mm, 1.85 mm olarak ölçülmüştür. Bu bakteri türlerinde PCL-ST-AgNT fiberler ile elde edilen inhibisyon zon açılmaları film örneklerine göre fazladır. PCL-ST-AgNT fiberlerdeki bu durum fiberlerin yüzey alanının filmlere göre daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır.

Şekil 4.56.'da disk difüzyon testinde numunelerin farklı bakteri türlerinde oluşturduğu inhibisyon zonları gösterilmiştir.

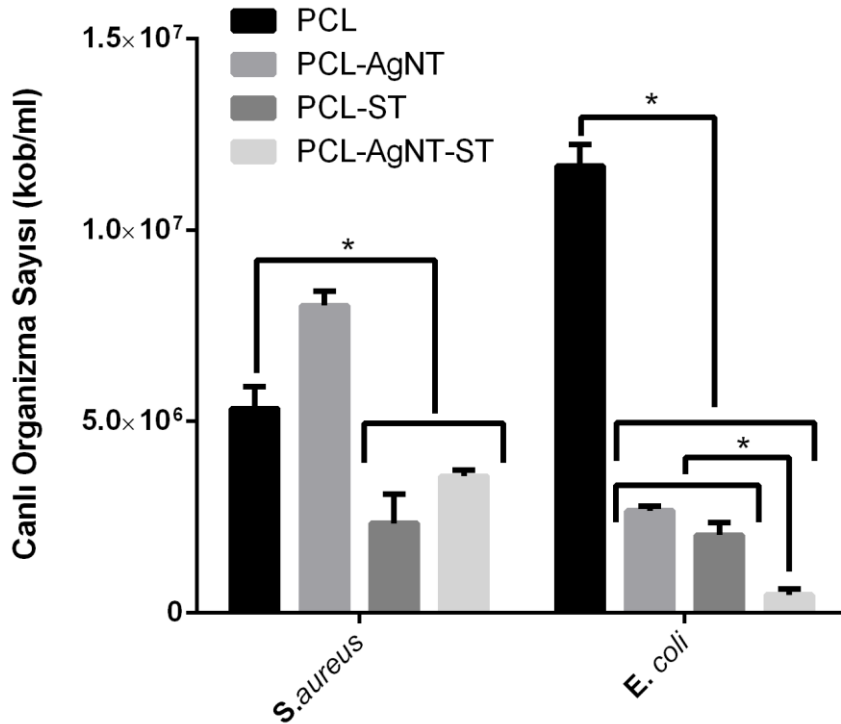


Şekil 4.56. Disk Difüzyon testi sonucu örneklere ait inhibisyon zonları. (a,b) *E. coli* ATCC 25922, (c,d) *S. aureus* ATCC 29213, (e,f) MRSA ATCC 43300, (g,h) *P. aeruginosa* ATCC 27853

Sadece AgNT veya ST içerikli fiberlerin doğrudan antibakteriyel bir etkisi olmadığı görülmüştür. Ancak B10 numunesinin, PCL'in ST-AgNT kompleksi ile katkılanması ile antibakteriyel etkinlik belirgin bir ölçüde artmıştır. Bu durum PCL gibi geç biyobozunmaya uğrayan termoplastik bir polimer varlığında ve düşük katkı oranlı kompozit sistemler için önemli bir bulgudur.

4.4.6.2. Bakteriyel Tutunma Testi Sonuçları

Bu kısımda PCL-AgNT, PCL-ST, PCL-AgNT-ST ve kontrol grubu olarak PCL fiberler disk difüzyon testi incelemelerine ileri çalışma olarak bakteriyel tutunma testi ile bakteri-yüzey etkileşim sonuçları değerlendirilmiştir. Tutunma deneyi süresince bakteri üremesinin engellenmesi amacıyla çalışmalar PBS ortamında yürütülmüştür. Tutunma süresi 4 saat olarak belirlenmiştir. 4 saat medikal cihaz enfeksiyonlarında bakteri temasını belirleyici dönem olarak kabul edilmektedir [94]. Şekil 4.57.'de 4 saat sonunda fiber yüzeylerine tutunan *S. aureus* ve *E. coli* canlı bakteri sayıları verilmiştir.



Şekil 4.57. Fiber gruplarının yüzeylerine tutunan canlı bakteri sayıları (*P<0.05).

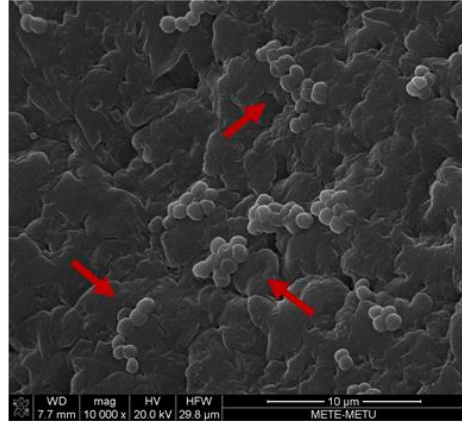
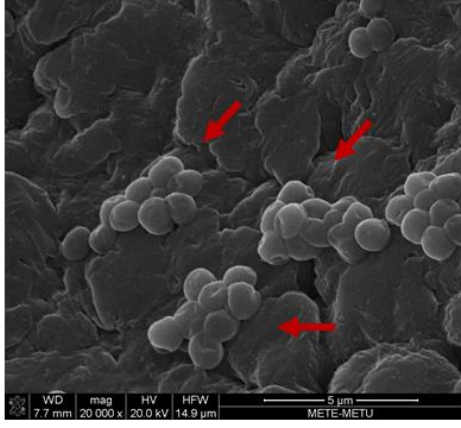
Gram negatif bakteri grubu *S.aureus* ile yapılan çalışmalarda ise en fazla bakteri tutunması PCL-AgNT yüzeyinde gözlenmiştir ve bu kompozisyonun *S. aureus* tutunmasını engelleyici bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. PCL-ST ve

PCL-ST-AgNT fiber yüzeylerinde, kontrol grubu PCL yüzeyinde tutunan bakteri sayısına göre anlamlı fark oluşturacak kadar az sayıda bakteri tutunmuştur (Şekil 4.57.).

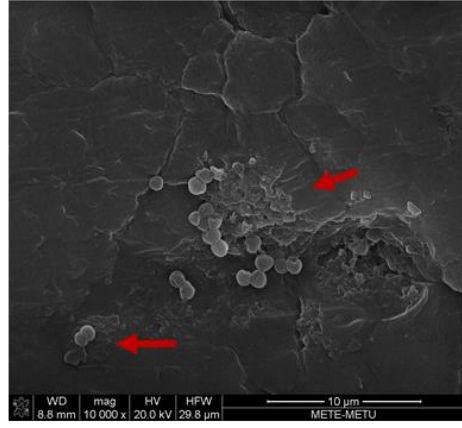
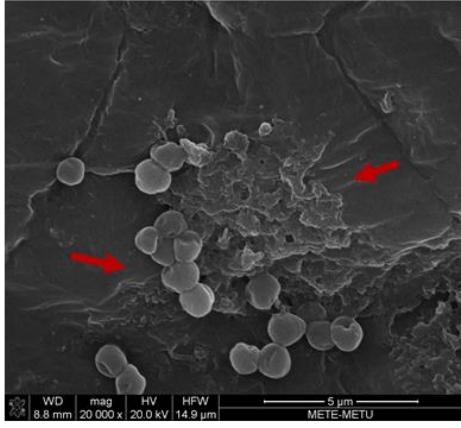
Gram pozitif bakteri grubu *E. coli* ile gerçekleştirilen tutunma deneyinde, PCL-ST-AgNT fiber yüzeylerinde diğer tüm yüzeylere göre anlamlı fark oluşturacak kadar az bakterinin tutunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.57.). Bu sonuç AgNT-ST kompleksinin etken maddenin antibakteriyel etkinliğini arttırdığını göstermektedir. PCL içerisinde %10 gibi düşük miktarda AgNT-ST katılanmasının fiberler yüzeylerinde Gram pozitif *E. coli* tutunmasını azalttığını göstermektedir. PCL-AgNT, PCL-ST fiberleri yüzeyinde de kontrol gurubu PCL yüzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturacak kadar az sayıda bakteri tutunduğu görülmüştür. Her iki bakteri türü ile ilgili elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında PCI-AgNT, PCI-ST ve PCI-ST-AgNT fiberlerinin gram negatif bakterileri üzerinde daha etkili sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Fiber yüzeylerinde 4 saat sonunda gerçekleşen bakteri tutunmaları SEM ile incelenmiştir. *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerinin PCL, PCL-AgNT, PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiber yüzeylerine tutunma sonuçları sırasıyla Şekil 4.58. ve Şekil 4.59.'da verilmiştir.

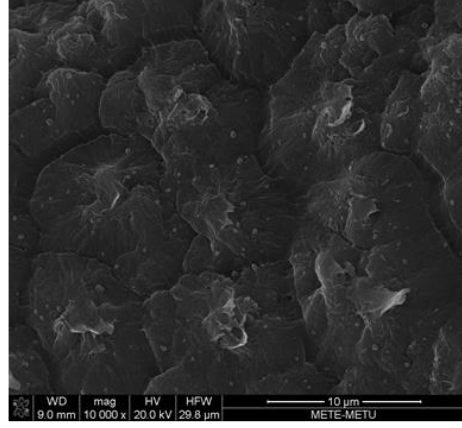
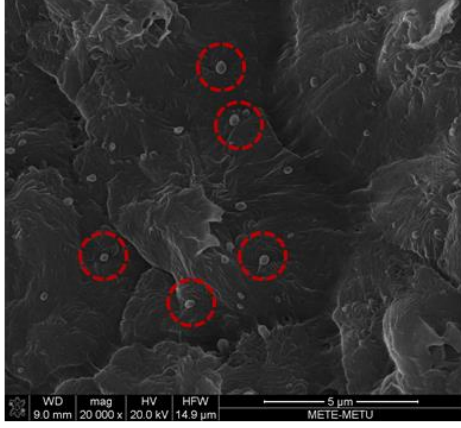
PCL



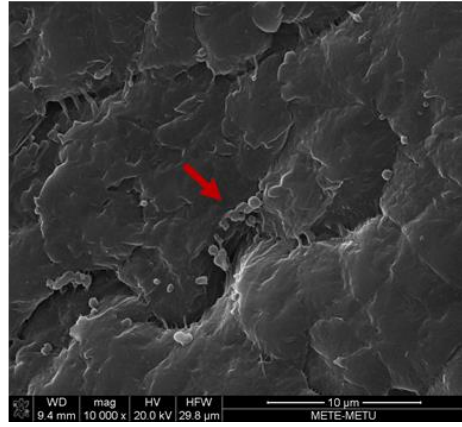
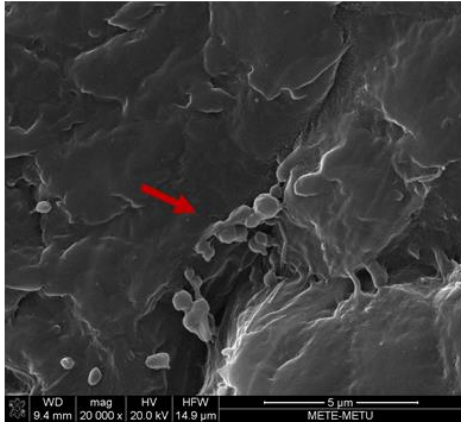
PCL-AgNT



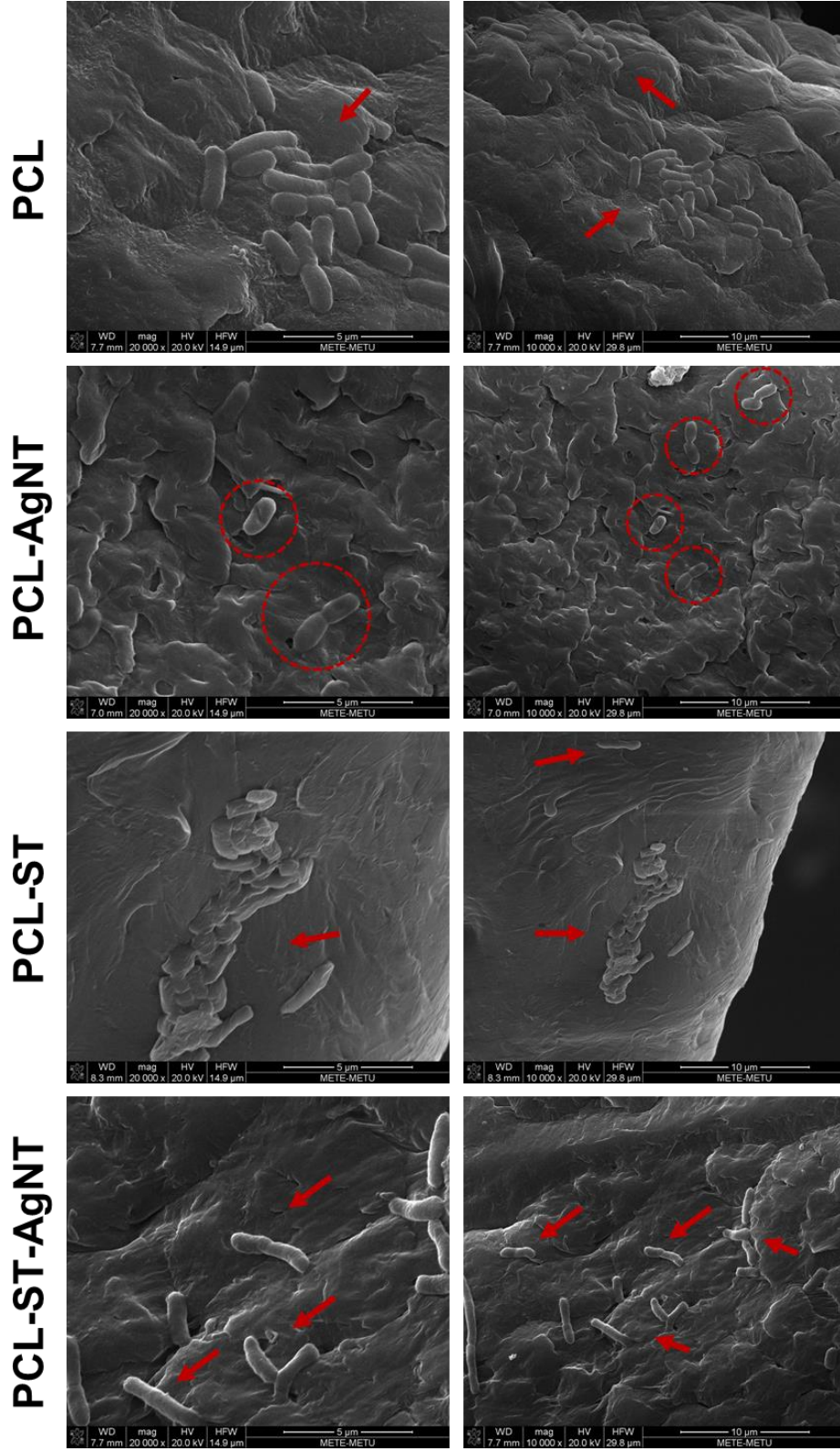
PCL-ST



PCL-ST-AgNT



Şekil 4.58. PCL, PCL-AgNT, PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiber yüzeylerinde *S. aureus* tutunması SEM görüntüleri (Büyütme 20000x ve 10000x).



Şekil 4.59. PCL, PCL-AgNT, PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiber yüzeylerinde *E. coli* tutunması SEM görüntüleri (Büyütme 20000x ve 10000x).

S. aureus bakteri grubu ile yürütülen tutunma çalışmalarıyla elde edilen SEM görüntüleri incelendiğinde PCL, PCL-AgNT ve PCL-ST-AgNT fiberlerin yüzeylerine tutunan tüm bakterilerin kümelenme eğiliminde olduğu görülmüştür. Ancak PCL-ST fiber yüzeylerinde daha çok tekil bakterilerin bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.58.). *E. coli* bakteri grubu ile yapılan deneylerde ise kontrol gurubu PCL fiber yüzeyinde bakterilerin kümелendiği, PCL-AgNT ve PCL-ST-AgNT fiber yüzeylerinde bakterilerin bir araya gelemeyerek tekil oluşumlar oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.59.). PCL-ST fiber yüzeylerinde ise tutunma sonrası bakterilerin ölerek yapısal bütünlüklerini kaybettikleri gözlenmiştir. Sonuç olarak PCL yapısına AgNT-ST katılmasıyla elde edilen kompozisyonlar özellikle Gram pozitif *E. coli* bakteri türünün tutunmasını azaltmıştır.

5. TOPLU SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında ıslak eğirme prensibi ile çalışan, yüksek verim ile fiber üretimi imkanı sunan, bilgisayar desteği ile dönme parametreleri hassas olarak ayarlanabilir, taşınabilir bir DIED sistemi başarı ile geliştirilmiştir. Geliştirilen DIED ile tek parça bütünlükte, homojen kalınlıkta, yapışmadan düzenli olarak toplanabilir fiberler üretilmiştir. DIED sistemi kolay optimize edilebilmesi ile farklı stratejiler için farklı üretim imkanları da sunmaktadır.

DIED sistemi geliştirilmesinde denenen fan motorları karakteristik yapıları gereği dakikada 500 dönüş hızının altına inememiş ve düşük tork gücü sağlamışlardır. Benzer şekilde alternatif ve direkt akım motorları ile düşük dönüş hızlarına ulaşılabilsede yetersiz tork gücü sağlamaları dolayısıyla kullanışsız olmuşlardır. Bunların yerine yazılım geliştirilmesine ihtiyaç duyan adım motor hem dakikada 1 turdan 60 tur gibi geniş bir dönüş yelpazesi sunmuş hem de ihtiyaç duyulanın ötesinde tork gücü sağlamıştır.

Geliştirilen adım motorlu döngüsel sistem, gelecek çalışmalarda yazılıma yapılacak eklentiler ile pompa sistemlerine adapte edilerek tamamen otomatik üretim optimizasyonlarının geliştirilmesine imkan sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında DIED sistemi ile hacimsel iskelet kası hasarlarına yönelik doku destek iskeleleri başarı ile üretilmiştir. AgNT'ler PCL'e katılarak ve yüksek verimde, tek parça, homojen kalınlıkta PCL-AgNT bazlı fiberlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim AgNT ve PCL kimyasal yapılarına zarar vermediği ve PCL-AgNT fiberlerin FTIR karakterizasyon bulguları ile gösterilmiştir.

PCL ve PCL-AgNT yapıların erime sıcaklıkları sırası ile 61 °C ve 67 °C, bozunma sıcaklıkları ile 403 °C ve 406 °C olarak ölçülmüştür. TGA verilerine göre kül kalıntı ağırlığı, PCL için ölçüm sınırının altında iken, PCL-AgNT'de %0.33 değerinde olması inorganik gümüş kalıntının varlığını göstermiştir.

Lipaz enzimi ile katalizlenen biyobozunma çalışmaları PCL ve PCL-AgNT fiberlerin sırası ile 7. günde ağırlıkça yaklaşık %26, %19, 14. günde ağırlıkça

yaklaşık %52, %49 ve 21 günde ağırlıkça yaklaşık %83, %77 bozunmaya uğradıklarını göstermiştir.

C2C12 fare myoblast hücre hattı ile PCL ve PCL-AgNT fiberler üzerinde hücre kültürü gerçekleştirilmiş, farklı gruplarda elektriksel uyarımın varlığının hücre çoğalması ve gelişimine etkisi incelenmiştir. Fiberlerin yüzeyin hücre çalışmaları için ek hiçbir yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmemiştir.

Yapılan hücre kültürü çalışması neticesinde PCL-AgNT fiberler üzerinde, PCL üzerindeki göre daha fazla hücre çoğalmıştır. Literatürde iletken özellikteki katkılar içeren fiberler yüzeylerinde herhangi bir elektriksel uyarım sağlanmadan daha fazla hücrenin çoğaldığı ve verimli farklılaşmanın sağlandığına dair yayınlar mevcuttur.

Gümüş nanoteller yüksek derece iletkenliğe sahip nano parçacıklardır ve elektriksel iletkenlik gümüş nanotellerin malzeme içerisinde-yüzeyinde tellerin dağılımıyla oluşan ağ ile sağlanmaktadır. PCL-AgNT fiber kompozisyonlarında elektriksel iletkenliğin ölçümü için gerekli olan ağ tam olarak oluşturulmamıştır. Ancak elektriksel uyarım ile gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları sonuçları PCL-AgNT fiberlerin elektriksel açıdan hücrelerin indüklenmesinde aktif olduklarını ve elektriksel uyarım noktaları yarattıklarını destekler niteliktedir. Elektriksel uyarımın uygulandığı gruplara PCL-AgNT fiberler yüzeyinde PCL yüzeyindeki göre daha fazla hücre istatistiksel olarak anlamlı fark yaratacak derecede çoğalmış ve farklılaşmıştır.

Sabit frekans ve dalga genişliği değerlerinde 1.5 V ve 3 V değerlerinde 2 farklı uyarım parametresi atım dalga ile sağlanmıştır. 1.5 V elektriksel uyarımın hücre çoğalmasına ve farklılaşmasına olumlu etkisi olduğu, 3V elektriksel uyarım sağlanan ve elektriksel uyarımın uygulanmadığı gruplar ile karşılaştırarak gözlenmiştir.

DIED ile antibakteriyel fiber formülasyonlarının geliştirilmesi için antibakteriyel ilaç etken maddesi ST ve AgNT arasında etkileşim yaratılmıştır. Yüksek verimde ve fiziksel bütünlükte ile PCL-ST ve PCL-ST-AgNT fiber formülasyonları DIED ile üretilmiştir. ST'nin kimyasal özelliklerinin PCL-ST ve PCL-ST-AgNT yapılarında korunduğu gösterilmiştir.

PCL, PCL-AgNT, PCL-ST ve PCL-ST-AgNT numuneleri için gram pozitif ve gram negatif 4 farklı bakteri türü için disk difüzyon testi uygulanmış, en etkin sonuç PCL-ST-AgNT film ve fiber örnekler üzerinden alınmıştır. Bu sonuç tezin hipotezini doğrulamakta ve PCL içerisinde AgNT varlığında sülfatiazolun antibakteriyel etkinliğinin arttığını göstermektedir.

Antibakteriyel çalışmalarda disk difüzyon testine ek olarak fiber yüzeylerinde erken aşama bakteriyel tutunma testi gerçekleştirilmiş, PCL-ST ve PCL-ST-AgNT formülasyonlarında PCL ve PCL-AgNT'ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturacak derecede az sayıda bakteri tutunduğu tespit edilmiştir.

Tez çalışması sonrası yapılacak ileri çalışmalar ile DIED sistemine yapılacak modifikasyonlarla, sisteme ek bir fiber toplama, örme sistemi, sıcaklık kontrol – ölçüm sistemi ve şırınga pompası düzeneği mevcut işlemci üzerine adapte edilerek daha fonksiyonel bir sistem elde edilebilir.

İskelet kas hücreleri üzerine gerçekleştirilen etkinlik çalışmaları ve antibakteriyel özellikleri incelenen PCL-AgNT, PCL-ST-AgNT malzemelerin yapısında bulunan gümüş nanotellerin boy değerleri sentez esnasında değiştirilerek, kısa nano çubuklar ve farklı boy değerlerindeki AgNT'lerin aynı çalışmalara olumlu veya olumsuz etkileri incelenebilir.

Sonuç olarak PCL-AgNT kompozit fiberler ve antibakteriyel formları iskelet kası doku destek malzemeleri adayı olarak başarılı ve umut vaat edici özellikler sunmuştur.

6. KAYNAKLAR

- [1] Jana S, Levengood SKL, Zhang M, Anisotropic Materials for Skeletal-Muscle-Tissue Engineering, *Advanced Materials*, 28 (2016) 10588-10612.
- [2] Kumari A, Yadav SK, Yadav SC, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75 (2010) 1-18.
- [3] Woodruff MA, Hutmacher DW, The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century, *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 35 (2010) 1217-1256.
- [4] Yin H, Price F, Rudnicki MA, Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche, *Physiological Reviews*, 93 (2013) 23-67.
- [5] Huard J, Li Y, Fu FH, Muscle Injuries and Repair: Current Trends in Research, *JBJS*, 84 (2002) 822-832.
- [6] Skeletal Muscle Development and Regeneration, *Stem Cells and Development*, 16 (2007) 857-868.
- [7] Takagaki Y, Yamagishi H, Matsuoka R, Chapter four - Factors Involved in Signal Transduction During Vertebrate Myogenesis, in: Jeon KW (Ed.) *International Review of Cell and Molecular Biology*, Academic Press 2012, pp. 187-272.
- [8] Cosgrove BD, Sacco A, Gilbert PM, Blau HM, A home away from home: Challenges and opportunities in engineering in vitro muscle satellite cell niches, *Differentiation*, 78 (2009) 185-194.
- [9] Grasman JM, Zayas MJ, Page RL, Pins GD, Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries, *Acta Biomaterialia*, 25 (2015) 2-15.
- [10] Choi Y-J, Jun Y-J, Kim DY, et al., A 3D cell printed muscle construct with tissue-derived bioink for the treatment of volumetric muscle loss, *Biomaterials*, 206 (2019) 160-169.
- [11] Grogan BF, Hsu JR, Volumetric muscle loss, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 19 (2011) S35-S37.
- [12] Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G, Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells, *The Journal of Clinical Investigation*, 120 (2010) 11-19.
- [13] Kwee BJ, Mooney DJ, Biomaterials for skeletal muscle tissue engineering, *Current Opinion in Biotechnology*, 47 (2017) 16-22.
- [14] Obregón R, Ramón-Azcón J, Ahadian S, 19 - Nanofiber composites in blood vessel tissue engineering, in: Ramalingam M, Ramakrishna S (Eds.) *Nanofiber Composites for Biomedical Applications*, Woodhead Publishing 2017, pp. 483-506.
- [15] Aviss KJ, Gough JE, Downes S, ALIGNED ELECTROSPUN POLYMER FIBRES FOR SKELETAL MUSCLE REGENERATION, *Eur Cells Mater*, 19 (2010) 193-204.
- [16] Engler AJ, Griffin MA, Sen S, Bönnemann CG, Sweeney HL, Discher DE, Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments, *J Cell Biol*, 166 (2004) 877-887.

- [17] Ross JJ, Duxson MJ, Harris AJ, Neural determination of muscle fibre numbers in embryonic rat lumbrical muscles, *Development*, 100 (1987) 395.
- [18] A Novel Bioreactor for Stimulating Skeletal Muscle In Vitro, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16 (2010) 711-718.
- [19] Wolf MT, Dearth CL, Sonnenberg SB, Lobo EG, Badylak SF, Naturally derived and synthetic scaffolds for skeletal muscle reconstruction, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84 (2015) 208-221.
- [20] Kurita K, Controlled functionalization of the polysaccharide chitin, *Progress in Polymer Science*, 26 (2001) 1921-1971.
- [21] Broderick EP, O'Halloran DM, Rochev YA, Griffin M, Collighan RJ, Pandit AS, Enzymatic stabilization of gelatin-based scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 72B (2005) 37-42.
- [22] Gomes M, Azevedo H, Malafaya P, et al., Chapter 6 - Natural Polymers in tissue engineering applications, in: Blitterswijk Cv, Thomsen P, Lindahl A, et al. (Eds.) *Tissue Engineering*, Academic Press, Burlington, 2008, pp. 145-192.
- [23] Göpferich A, Langer R, Modeling of polymer erosion in three dimensions: Rotationally symmetric devices, *AIChE Journal*, 41 (1995) 2292-2299.
- [24] Hakkarainen M, Albertsson A-C, Degradation Products of Aliphatic and Aliphatic–Aromatic Polyesters, in: Albertsson A-C, Hakkarainen M (Eds.) *Chromatography for Sustainable Polymeric Materials: Renewable, Degradable and Recyclable*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008, pp. 85-116.
- [25] Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review, *Tissue Engineering*, 12 (2006) 1197-1211.
- [26] Dahlin RL, Kasper FK, Mikos AG, Polymeric nanofibers in tissue engineering, *Tissue Eng Part B Rev*, 17 (2011) 349-364.
- [27] Asmatulu R, Highly Hydrophilic Electrospun Polyacrylonitrile/ Polyvinylpyrrolidone Nanofibers Incorporated with Gentamicin as Filter Medium for Dam Water and Wastewater Treatment, 2016.
- [28] Bhardwaj N, Kundu SC, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances*, 28 (2010) 325-347.
- [29] Shang L, Yu Y, Liu Y, Chen Z, Kong T, Zhao Y, Spinning and Applications of Bioinspired Fiber Systems, *ACS Nano*, 13 (2019) 2749-2772.
- [30] Puppi D, Chiellini F, Wet-spinning of biomedical polymers: from single-fibre production to additive manufacturing of three-dimensional scaffolds, *Polymer International*, 66 (2017) 1690-1696.
- [31] Enea D, Henson F, Kew S, et al., Extruded collagen fibres for tissue engineering applications: effect of crosslinking method on mechanical and biological properties, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22 (2011) 1569.
- [32] Tuzlakoglu K, Alves CM, Mano JF, Reis RL, Production and Characterization of Chitosan Fibers and 3-D Fiber Mesh Scaffolds for Tissue Engineering Applications, *Macromolecular Bioscience*, 4 (2004) 811-819.

- [33] Gao H, Gu Y, Ping Q, The implantable 5-fluorouracil-loaded poly(L-lactic acid) fibers prepared by wet-spinning from suspension, *Journal of Controlled Release*, 118 (2007) 325-332.
- [34] Choi JS, Lee SJ, Christ GJ, Atala A, Yoo JJ, The influence of electrospun aligned poly(ϵ -caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes, *Biomaterials*, 29 (2008) 2899-2906.
- [35] Aviss KJ, Gough JE, Downes S, Aligned electrospun polymer fibres for skeletal muscle regeneration, *European Cells and Materials*, 19 (2010) 193-204.
- [36] Shin YC, Lee JH, Jin L, et al., Stimulated myoblast differentiation on graphene oxide-impregnated PLGA-collagen hybrid fibre matrices, *Journal of Nanobiotechnology*, 13 (2015).
- [37] Chaudhuri B, Bhadra D, Moroni L, Pramanik K, Myoblast differentiation of human mesenchymal stem cells on graphene oxide and electrospun graphene oxide-polymer composite fibrous meshes: Importance of graphene oxide conductivity and dielectric constant on their biocompatibility, *Biofabrication*, 7 (2015).
- [38] Guex AG, Birrer DL, Fortunato G, Tevaearai HT, Giraud MN, Anisotropically oriented electrospun matrices with an imprinted periodic micropattern: A new scaffold for engineered muscle constructs, *Biomedical Materials (Bristol)*, 8 (2013).
- [39] Williamson MR, Adams EF, Coombes AGA, Gravity spun polycaprolactone fibres for soft tissue engineering: Interaction with fibroblasts and myoblasts in cell culture, *Biomaterials*, 27 (2006) 1019-1026.
- [40] Chen M-C, Sun Y-C, Chen Y-H, Electrically conductive nanofibers with highly oriented structures and their potential application in skeletal muscle tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 9 (2013) 5562-5572.
- [41] Ku SH, Lee SH, Park CB, Synergic effects of nanofiber alignment and electroactivity on myoblast differentiation, *Biomaterials*, 33 (2012) 6098-6104.
- [42] Manchineella S, Thirivikraman G, Khanum KK, Ramamurthy PC, Basu B, Govindaraju T, Pigmented Silk Nanofibrous Composite for Skeletal Muscle Tissue Engineering, *Advanced Healthcare Materials*, 5 (2016) 1222-1232.
- [43] Sirivisoot S, Harrison BS, Skeletal myotube formation enhanced by electrospun polyurethane carbon nanotube scaffolds, *Int J Nanomedicine*, 6 (2011) 2483-2497.
- [44] Patel A, Vendrell-Gonzalez S, Haas G, et al., Regulation of Myogenic Activity by Substrate and Electrical Stimulation In Vitro, *Biores Open Access*, 8 (2019) 129-138.
- [45] Contardi M, Alfaro-Pulido A, Picone P, et al., Low molecular weight ϵ -caprolactone-p-coumaric acid copolymers as potential biomaterials for skin regeneration applications, *PLOS ONE*, 14 (2019) e0214956.
- [46] Luciani A, Coccoli V, Orsi S, Ambrosio L, Netti PA, PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles, *Biomaterials*, 29 (2008) 4800-4807.

- [47] Lee KH, Kim HY, Khil MS, Ra YM, Lee DR, Characterization of nano-structured poly(ϵ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning, *Polymer*, 44 (2003) 1287-1294.
- [48] Shalumon KT, Anulekha KH, Girish CM, Prasanth R, Nair SV, Jayakumar R, Single step electrospinning of chitosan/poly(caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture, *Carbohydrate Polymers*, 80 (2010) 413-419.
- [49] Ciardelli G, Chiono V, Vozzi G, et al., Blends of Poly-(ϵ -caprolactone) and Polysaccharides in Tissue Engineering Applications, *Biomacromolecules*, 6 (2005) 1961-1976.
- [50] Sobral JM, Caridade SG, Sousa RA, Mano JF, Reis RL, Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency, *Acta Biomaterialia*, 7 (2011) 1009-1018.
- [51] Coulembier O, Degée P, Hedrick JL, Dubois P, From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: Especially poly(β -malic acid) derivatives, *Progress in Polymer Science*, 31 (2006) 723-747.
- [52] Ouhadi T, Stevens C, Teyssié P, Study of poly- ϵ -caprolactone bulk degradation, *Journal of Applied Polymer Science*, 20 (1976) 2963-2970.
- [53] Bartnikowski M, Dargaville TR, Ivanovski S, Hutmacher DW, Degradation mechanisms of polycaprolactone in the context of chemistry, geometry and environment, *Progress in Polymer Science*, 96 (2019) 1-20.
- [54] Salgado CL, Sanchez EMS, Zavaglia CAC, Granja PL, Biocompatibility and biodegradation of polycaprolactone-sebacic acid blended gels, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100A (2012) 243-251.
- [55] Serrano MC, Pagani R, Vallet-Regí M, et al., In vitro biocompatibility assessment of poly(ϵ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts, *Biomaterials*, 25 (2004) 5603-5611.
- [56] Griffith LG, Polymeric biomaterials, *Acta Materialia*, 48 (2000) 263-277.
- [57] Kweon H, Yoo MK, Park IK, et al., A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering, *Biomaterials*, 24 (2003) 801-808.
- [58] Sun Y, Gates B, Mayers B, Xia Y, Crystalline Silver Nanowires by Soft Solution Processing, *Nano Letters*, 2 (2002) 165-168.
- [59] Coskun S, Aksoy B, Unalan HE, Polyol Synthesis of Silver Nanowires: An Extensive Parametric Study, *Crystal Growth & Design*, 11 (2011) 4963-4969.
- [60] Pratsinis A, Hervella P, Leroux J-C, Pratsinis SE, Sotiriou GA, Toxicity of Silver Nanoparticles in Macrophages, *Small*, 9 (2013) 2576-2584.
- [61] García-Galán MJ, Silvia Díaz-Cruz M, Barceló D, Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27 (2008) 1008-1022.
- [62] Kremer E, Facchin G, Estévez E, et al., Copper complexes with heterocyclic sulfonamides: Synthesis, spectroscopic characterization, microbiological and SOD-like activities: Crystal structure of [Cu(sulfisoxazole)₂(H₂O)₄] \cdot 2H₂O, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100 (2006) 1167-1175.
- [63] Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, Dibo SA, Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature, *Burns*, 33 (2007) 139-148.

- [64] Bormio Nunes JH, de Paiva REF, Cuin A, Lustrri WR, Corbi PP, Silver complexes with sulfathiazole and sulfamethoxazole: Synthesis, spectroscopic characterization, crystal structure and antibacterial assays, *Polyhedron*, 85 (2015) 437-444.
- [65] Modak SM, Fox Jr CL, Binding of silver sulfadiazine to the cellular components of *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochemical Pharmacology*, 22 (1973) 2391-2404.
- [66] Hindi KM, Ditto AJ, Panzner MJ, et al., The antimicrobial efficacy of sustained release silver-carbene complex-loaded L-tyrosine polyphosphate nanoparticles: Characterization, in vitro and in vivo studies, *Biomaterials*, 30 (2009) 3771-3779.
- [67] Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M, Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method, *American Journal of Clinical Pathology*, 45 (1966) 493-496.
- [68] Chua P-H, Neoh K-G, Kang E-T, Wang W, Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion, *Biomaterials*, 29 (2008) 1412-1421.
- [69] Foss BL, Ghimire N, Tang R, Sun Y, Deng Y, Bacteria and osteoblast adhesion to chitosan immobilized titanium surface: A race for the surface, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 134 (2015) 370-376.
- [70] Shi X, Ostrovidov S, Zhao Y, et al., Microfluidic Spinning of Cell-Responsive Grooved Microfibers, *Advanced Functional Materials*, 25 (2015) 2250-2259.
- [71] Bota PCS, Collie AMB, Puolakkainen P, et al., Biomaterial topography alters healing in vivo and monocyte/macrophage activation in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95A (2010) 649-657.
- [72] Rickman J, Tronci G, Liang H, Russell SJ, Rotation-assisted wet-spinning of UV-cured gelatin fibres and nonwovens, *Journal of Materials Science*, 54 (2019) 10529-10547.
- [73] Chen J, Wang C, Ge H, Bai Y, Wang Y, Effect of coagulation temperature on the properties of poly(acrylonitrile- itaconic acid) fibers in wet spinning, *Journal of Polymer Research*, 14 (2007) 223-228.
- [74] Wang Y-X, Wang C-G, Yu M-J, Effects of different coagulation conditions on polyacrylonitrile fibers wet spun in a system of dimethylsulphoxide and water, *Journal of Applied Polymer Science*, 104 (2007) 3723-3729.
- [75] Elzein T, Nasser-Eddine M, Delaite C, Bistac S, Dumas P, FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 273 (2004) 381-387.
- [76] Abdelrazek EM, Hezma AM, El-khodary A, Elzayat AM, Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3 (2016) 10-15.
- [77] Song Y-J, Wang M, Zhang X-Y, Wu J-Y, Zhang T, Investigation on the role of the molecular weight of polyvinyl pyrrolidone in the shape control of high-yield silver nanospheres and nanowires, *Nanoscale Research Letters*, 9 (2014) 17.
- [78] Tiptipakorn S, Keungputpong N, Phothiphiphit S, Rimdusit S, Effects of polycaprolactone molecular weights on thermal and mechanical properties of polybenzoxazine, *Journal of Applied Polymer Science*, 132 (2015).

- [79] Altinkok C, Oytun F, Basarir F, Tasdelen MA, Cysteamine-functionalized silver nanowires as hydrogen donor for type II photopolymerization, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 346 (2017) 479-484.
- [80] Gan Z, Liang Q, Zhang J, Jing X, Enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone) film in phosphate buffer solution containing lipases, *Polymer Degradation and Stability*, 56 (1997) 209-213.
- [81] Sivalingam G, Chattopadhyay S, Madras G, Enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactone), poly (vinyl acetate) and their blends by lipases, *Chemical Engineering Science*, 58 (2003) 2911-2919.
- [82] Doganay D, Coskun S, Kaynak C, Unalan HE, Electrical, mechanical and thermal properties of aligned silver nanowire/poly lactide nanocomposite films, *Composites Part B: Engineering*, 99 (2016) 288-296.
- [83] Huang NF, Lee RJ, Li S, Engineering of aligned skeletal muscle by micropatterning, *Am J Transl Res*, 2 (2010) 43-55.
- [84] Dihydropteroate Synthase (Sulfonamides) and Dihydrofolate Reductase Inhibitors, *Bacterial Resistance to Antibiotics – From Molecules to Man*, pp. 163-172.
- [85] Elzbieta B, Role of Metal Ions Complexes and their Ligands in Medicine, Pharmacy and Cosmetology, *Current Medicinal Chemistry*, 26 (2019) 578-579.
- [86] Sim W, Barnard RT, Blaskovich MAT, Ziora ZM, Antimicrobial Silver in Medicinal and Consumer Applications: A Patent Review of the Past Decade (2007-2017), *Antibiotics (Basel)*, 7 (2018).
- [87] Bryaskova R, Pencheva D, Nikolov S, Kantardjiev T, Synthesis and comparative study on the antimicrobial activity of hybrid materials based on silver nanoparticles (AgNPs) stabilized by polyvinylpyrrolidone (PVP), *Journal of chemical biology*, 4 (2011) 185-191.
- [88] Puppi D, Dinucci D, Bartoli C, et al., Development of 3D wet-spun polymeric scaffolds loaded with antimicrobial agents for bone engineering, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 26 (2011) 478-492.
- [89] Zeitler JA, Newnham DA, Taday PF, et al., Characterization of temperature-induced phase transitions in five polymorphic forms of sulfathiazole by terahertz pulsed spectroscopy and differential scanning calorimetry, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95 (2006) 2486-2498.
- [90] Xue J, He M, Liu H, et al., Drug loaded homogeneous electrospun PCL/gelatin hybrid nanofiber structures for anti-infective tissue regeneration membranes, *Biomaterials*, 35 (2014) 9395-9405.
- [91] Hevener KE, Zhao W, Ball DM, et al., Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49 (2009) 444-460.
- [92] Zhao Y, Shadrack WR, Wallace MJ, et al., Pterin-sulfa conjugates as dihydropteroate synthase inhibitors and antibacterial agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26 (2016) 3950-3954.
- [93] López-Esparza J, Espinosa-Cristóbal LF, Donohue-Cornejo A, Reyes-López SY, Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles in Polycaprolactone Nanofibers against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 55 (2016) 12532-12538.

- [94] Shi Z, Neoh KG, Kang ET, Poh C, Wang W, Bacterial adhesion and osteoblast function on titanium with surface-grafted chitosan and immobilized RGD peptide, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 86A (2008) 865-872.

EKLER

EK 1 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

1. **B. Baştürkmen**, E. Ergene, P. Yilgör Huri, D. Doğanay, E. Ünalın, E.A. Aksoy, 24th International Biomedical Science and Technology Symposium Biomed 2017 kongresi dahilindeki "24th International Biomedical Science and Technology Symposium Biomed 2019" bildiri kitabındaki 'Silver nanowire-doped conductive nanocomposite fibers as scaffolds for skeletal muscle tissue engineering', 142 pp., İzmir, Turkey, 17 – 20 Ekim 2019 (Poster Sunum).