

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ANTİMİKROBİYAL PEPTİTLERİN İMMOBİLİZASYONU İLE
ENFEKSİYONA DİRENÇLİ MALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ**

Emre YÜKSEL

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

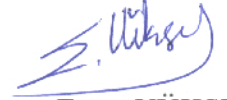
**ANKARA
2014**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

03 / 07 / 2014



Emre YÜKSEL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Emre YÜKSEL

ANTİMİKROBİYAL PEPTİTLERİN İMMOBİLİZASYONU İLE ENFEKSİYONA DİRENÇLİ MALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşe Gönen KARAKEÇİLİ

Biyomalzemelerin biyomedikal uygulamalarda kullanımı, malzeme-kaynaklı enfeksiyon problemini de beraberinde getirmektedir. Biyofilm oluşumu sonucu önlenemeyen enfeksiyon, implantın vücuttan uzaklaştırılmasını zorunlu hale getirmektedir. Bununla birlikte, büyüme faktörlerinin biyomalzeme yapısında yer alması, biyomalzemelerin hücreler ile olan etkileşimini arttırmakta ve iyileşme sürecinde sağlıklı doku oluşumunu desteklemektedir. Gerçekleştirilen tezde amaç, yara tedavisinde ve implant kaplamalarda kullanılmak üzere, antimikrobiyal özellikteki Magainin II (Mag II) peptidinin kovalent immobilizasyonu ve Epidermal büyüme faktörü (EGF) kullanımı ile antimikrobiyal özelliğe sahip biyoaktif polimerik malzemelerin hazırlanmasıdır. Poliester yapıdaki poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) veya PLGA-jelatin (PLGA/J) kompozitleri elektroegirme tekniği kullanılarak nanofibröz yapıda ardışık iki tabakalı membranlar elde edilmiştir. İlk tabakada Mag II kovalent immobilizasyonu kimyasal yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ardından, büyüme faktörü içeren ikinci tabakanın elde edilebilmesi için EGF içeren polimer çözeltileri (PLGA ve PLGA/J), elektroegirme tekniği ile antimikrobiyal nanofibröz membranın Mag II immobilize edilmemiş yüzeyi üzerinde toplanmıştır. Mag II immobilizasyonu X-ışınları fotoelektron spektroskopisi, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Atomik Kuvvet Mikroskobu ve su temas açısı ölçümleri analizleri ile karakterize edilmiştir. Yüzeylere immobilize olan Mag II miktarı Floresan Spektrofotometresi kullanılarak tayin edilmiştir. Çift tabakalı membranlardan EGF salımının izlenmesinde ELIZA analizi kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin incelenmesi Gram-pozitif (*Staphylococcus aureus*) ve Gram-negatif (*Escherichia coli*) bakteri suşları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bakteri yapışması, SEM ve konfokal mikroskobu ile görüntülenmiştir. Nanofibröz membranların sitotoksikite çalışmaları ve membranlar üzerinde hücresel aktivitenin incelenmesi için L929 fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar, Mag II immobilizasyonunun başarıyla gerçekleştirildiğini ve bakteri yapışmasını %50 üzerinde inhibe ettiğini göstermiştir. Bununla birlikte Mag II, L929 fare fibroblastları üzerinde toksik etkiye neden olmamıştır. Yapıda bulunan EGF, L929 yapışmasını ve üremesini arttırırken, Mag II varlığında bakteri yapışması engellenmiştir.

Temmuz 2014, 95 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal peptid, Magainin II, Epidermal büyüme faktörü, PLGA, jelatin, elektroegirme

ABSTRACT

Master Thesis

Emre YÜKSEL

DEVELOPMENT OF INFECTION RESISTANT MATERIALS BY IMMOBILIZATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Ass. Prof. Dr. Ayse Gonen KARAKECILI

Biofilm formation remains a major problem for long-term use of biomaterials in the medical devices field. Implant-associated infections which are resistant to antibiotics may cause implant failure and implant removal, all leading to patient suffering. Meanwhile, biomaterials should be biocompatible to enhance cell interactions for tissue regeneration. In the presented study, it was aimed to develop biocompatible and biodegradable nanofibrous polymeric membranes having antimicrobial and bioactive properties by covalent immobilization of Magainin II (Mag II) and incorporation of Epidermal Growth Factor (EGF). For this purpose, electrospinning technique was used to prepare nanofibrous membranes with two layers having different functionalities. A biodegradable polymer poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) or a composite of PLGA and gelatin (J) was used to prepare nanofibrous membranes by electrospinning. The antimicrobial peptide Magainin II was covalently immobilized on the nanofibrous membrane in order to produce the first layer with antimicrobial activity. Then, EGF was added to PLGA or PLGA/J before electrospinning and the solution containing EGF was electrospun on the reverse side of the first membrane to produce the bioactive layer. Mag II immobilization was characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Atomic Force Microscopy and water contact angle measurements. The immobilized Mag II amount was determined by Fluorescence Spectroscopy. EGF release was examined by ELISA. The antibacterial activity of the membranes was investigated by using bacteria with different properties (Gram-negative *Escherichia coli* and Gram-positive *Staphylococcus aureus*). Finally, cell culture studies were carried out with L929 mouse fibroblasts. The results obtained from the studies showed that the successful Mag II immobilization inhibited the bacterial adhesion up to 50%. Meanwhile, Mag II did not have any toxic effect on L929 mouse fibroblasts. While EGF incorporation enhanced the adhesion and proliferation of L929 cells, bacterial adhesion was inhibited in the presence of Mag II on double layered membranes.

July 2014, 95 pages

Key Words: Antimicrobial peptide, Magainin II, Epidermal growth factor, PLGA, gelatin, electrospinning

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimime başladığım ilk günden beri bana her konuda destek olan, tez çalışmamın her safhasında beni yönlendiren ve çalışmalarımı gerçekleştirirken benden güvenini ve desteği hiç esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ayşe Gönen KARAKEÇİLİ'ye (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı), çalışmalarım esnasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Araş. Gör. Eda Semizer GÖZ, (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı), Sayın Tuğrul Tolga DEMİRTAŞ, Sayın Dr. Murat Şimşek'e (Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı), çalışmalarım esnasında karşılaştığım zorluklarda yol gösterici fikirlerini hiçbir zaman esirgemeyen, Sayın Prof. Dr. Ayla ÇALIMLI, Sayın Prof. Dr. Nuray YILDIZ, Sayın Prof. Dr. Serpil TAKAÇ (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Sayın Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU'na (Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) ve son olarak desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme en samimi duygularıyla teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından 111M640 numaralı “Antimikrobiyal Peptid ve Büyüme Faktörlerini İçeren Enfeksiyona Dirençli Biyoaktif Malzemelerin Geliştirilmesi” konulu proje kapsamında desteklenmiştir.

Emre YÜKSEL

Ankara, Temmuz 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYASI	
ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Biyomalzemeler	4
2.1.1 Poli(laktik-ko-glikolik asit)	5
2.1.2 Jelatin	7
2.2 Elektroegirme	7
2.3 Mikroorganizmalar	15
2.4 Biyomalzeme Kaynaklı Enfeksiyonlar	20
2.5 Biyomalzeme Kaynaklı Enfeksiyonların Önlenmesinde Kullanılan Yöntemler	21
2.5.1 Sentetik yaklaşımlar	22
2.5.2 Doğal yaklaşımlar	24
2.5.3 Antimikrobiyal peptidler	25
2.6 Biyoaktif Biyomalzemeler	28
2.6.1 Büyüme faktörleri	28
2.6.1.1 Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	29
3. MATERYAL ve YÖNTEM	31
3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler	31
3.2 PLGA ve PLGA/J Nanofibröz Membranların Hazırlanması	32
3.3 PLGA ve PLGA/J Nanofibröz Membranlara Magainin II İmmobilizasyonu	34
3.4 PLGA ve PLGA/J Nanofibröz Membranların Karakterizasyonu	34
3.4.1 <i>Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance</i> spektroskopisi	34
3.4.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi	34
3.4.3 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) analizi	35
3.4.4 X-ışınları Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) analizi	35
3.4.5 Yüzeye immobilize olan Magainin II miktarının tayini	35
3.5 EGF İçeren PLGA Nanofibröz Membranların Hazırlanması	36
3.6 EGF İçeren Nanofibröz Membranların Karakterizasyonu	37
3.6.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi	37
3.6.2 Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) analizi	38
3.6.3 Floresan Mikroskobu analizi	38
3.7 Çift Tabakalı Antibakteriyal Biyoaktif Nanofibröz Membranların Hazırlanması	38
3.7.1 Çift tabakalı nanofibröz membranlardan EGF salımının incelenmesi	39
3.8 Su Temas Açısı Tayini	39
3.9 Denge Su İçeriği Tayini	40

3.10 Antimikrobiyal Aktivitenin İncelenmesi	40
3.10.1 Nanofibröz membranlara bakteri yapışmasının incelenmesi	41
3.10.2 Antimikrobiyal aktivitenin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile analizi	41
3.10.3 Antimikrobiyal aktivitenin Konfokal Mikroskobu ile analizi	42
3.11 L929 Fare Fibroblastları ile Hücresel Aktivitenin İncelenmesi	42
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	45
4.1 PLGA ve PLGA/J Nanofibröz Membranların Hazırlanması	45
4.2 PLGA ve PLGA/J Nanofibröz Membranlara Mag II İmmobilizasyonu	48
4.3 PLGA ve PLGA/J Nanofibröz Membranların Karakterizasyonu	49
4.3.1 FTIR-ATR analizi	49
4.3.2 X-ışınları Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) analizi	51
4.3.3 PLGA ve PLGA/J nanofibröz membranların morfolojik analizi	53
4.4 PLGA Membranlara İmmobilize Olan Magainin II Miktarının Tayini	57
4.5 EGF İçeren PLGA Nanofibröz Membranların Hazırlanması	58
4.6 EGF İçeren PLGA Nanofibröz Membranların Karakterizasyonu	63
4.6.1 Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) analizi	63
4.6.2 Floresan Mikroskobu analizi	64
4.6.3 Su Temas Açısı tayini	65
4.7 Çift Tabakalı Antibakteriyal Biyoaktif Nanofibröz Membranların Hazırlanması	66
4.8 Çift Tabakalı Membranlardan EGF Salımı	67
4.9 Antimikrobiyal Aktivitenin İncelenmesi	68
4.9.1 Nanofibröz membranlara bakteri yapışmasının incelenmesi	68
4.9.2 Antimikrobiyal Aktivitenin SEM ile analizi	72
4.9.3 Antibakteriyal aktivitenin Konfokal Mikroskobu ile analizi	77
4.10 L929 Fare Fibroblastları ile Hücresel Aktivitenin İncelenmesi	80
5. SONUÇLAR	85
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	95

SİMGELER DİZİNİ

cm	Santimetre
kV	Kilo volt
nm	Nanometre
ml	Mililitre
°C	Santigrat
µm	Mikrometre
λ_{uy}	Uyarılma dalga boyu
λ_{em}	Emisyon dalga boyu

Kısaltmalar

THF	Tetrahidrofuron
DCM	Diklorometan
DMSO	Dimetil sülfoksit
HFIP	Hekza floro izopropanol
TFE	Trifloro etanol
DMF	Dimetil formamit
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
AMP	Antimikrobiyal peptid
PEG	Poli etilen glikol
PLGA	Poli (laktid-ko-glikolik) asit
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
BMP	Kemik morfojenik proteinleri
IGF-I	İnsülin benzeri büyüme faktörü
EGF	Epidermal büyüme faktörü
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
XPS	X- ışını fotoelektron spektroskopisi
FTIR	Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
EDC	1-etil-3-(3-dimetil aminopropil)-karbodiimid
NHS	N-hidroksi suksinimid
Mag II	Magainin II
MES	2-(N-morfolino)ethansülfonik asit
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
BSA	Sığır serum albümin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
FBS	Fetal sığır serum
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-diphenyltetrazolium bromür
J	Jelatin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Biyomedikal alanda kullanılan malzemeler ve uygulama alanları	5
Şekil 2.2 PLGA kopolimerinin kimyasal yapısı	6
Şekil 2.3 Jelatinin kimyasal yapısı	7
Şekil 2.4 Elektroeğirme düzeneği	9
Şekil 2.5 Uygulanan voltajın Taylor konisine etkisi	12
Şekil 2.6 Prokaryotik ve ökaryotik hücre yapıları ve yapılarında bulunan organeller	16
Şekil 2.7 <i>Staphylococcus aureus</i> bakterisinin SEM ve ekim görüntüleri	17
Şekil 2.8 <i>Escherichia coli</i> bakterisinin SEM ve ekim görüntüleri	18
Şekil 2.9 Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı yapıları	19
Şekil 2.10 Biyofilm oluşum mekanizmasının şematik gösterimi	21
Şekil 2.11 Gümüş nanopartiküllerin TEM görüntüsü	23
Şekil 2.12 Magainin II amino asit dizilimi	28
Şekil 2.13 EGF molekülünün amino asit dizilimi.....	30
Şekil 3.1 Çift tabakalı antimikrobiyal biyoaktif nanofibröz membranların elektroeğirme ile üretimi	39
Şekil 4.1 PLGA nanofibröz membranlara ait SEM görüntüleri	47
Şekil 4.2 PLGA/J nanofibröz membranlara ait SEM görüntüleri	48
Şekil 4.3 PLGA nanofibröz membrana ait FTIR-ATR spektrumu	49
Şekil 4.4 PLGA/J nanofibröz membrana ait FTIR-ATR spektrumu	50
Şekil 4.5 Mag II immobilizasyonu öncesi ve sonrasında nanofibröz membranlara ait XPS spektrumları	52
Şekil 4.6 PLGA ve PLGA-Mag II membranlara ait görüntüler	54
Şekil 4.7 PLGA/J ve PLGA/J-Mag II membranlara ait görüntüler	56
Şekil 4.8 Magainin II kalibrasyon grafiği	57
Şekil 4.9 150 µl EGF çözeltisi eklenen %19.6'lık PLGA membranların SEM görüntüleri	60
Şekil 4.10 EGF içeren PLGA nanofibröz membranlara ait SEM görüntüleri	62
Şekil 4.11 EGF içeren PLGA/J nanofibröz membranlara ait SEM görüntüleri	63
Şekil 4.12 EGF içeren PLGA membranların TEM analizi sonuçları	64

Şekil 4.13 PLGA bazlı membranların floresan mikroskobu görüntüleri	65
Şekil 4.14 Çift tabakalı nanofibröz membrandan zamana karşı salınan kümülatif EGF miktarı (n=3)	67
Şekil 4.15 <i>S.aureus</i> suşunun PLGA, PLGA-Mag II ve PLGA-Mag II+PLGA- EGF nanofibröz membranlar üzerindeki yapışma değerleri (koloni sayımı yöntemi)	69
Şekil 4.16 <i>S.aureus</i> suşunun PLGA/J, PLGA/J-Mag II ve PLGA/J-Mag II+PLGA/J-EGF nanofibröz membranlar üzerindeki yapışma değerleri (koloni sayımı yöntemi)	70
Şekil 4.17 <i>E.coli</i> suşunun PLGA, PLGA-Mag II ve PLGA-Mag II+PLGA-EGF nanofibröz membranlar üzerindeki yapışma değerleri (koloni sayımı yöntemi)	71
Şekil 4.18 <i>E.coli</i> suşunun PLGA/J, PLGA/J-Mag II ve PLGA/J-Mag II+PLGA/J-EGF nanofibröz membranlar üzerindeki yapışma değerleri (koloni sayımı yöntemi)	72
Şekil 4.19 <i>S. aureus</i> suşunun PLGA bazlı membran yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri	72
Şekil 4.20 <i>S. aureus</i> suşunun PLGA/J bazlı membran yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri	73
Şekil 4.21 <i>E.coli</i> suşunun PLGA bazlı membran yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri	74
Şekil 4.22 <i>E.coli</i> suşunun PLGA/J bazlı membran yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri	75
Şekil 4.23 <i>E.coli</i> ve <i>S.aureus</i> suşlarının PLGA ve PLGA/J bazlı membran yüzeyler üzerindeki 24 saat sonunda bakteri yapışması SEM görüntüleri	76
Şekil 4.24 PLGA bazlı membranlar üzerinde tutunan <i>S.aureus</i> bakteri suşuna ait konfokal mikroskobu görüntüleri (x20)	78
Şekil 4.25 PLGA bazlı membranlar üzerinde tutunan <i>E.coli</i> bakteri suşuna ait konfokal mikroskobu görüntüleri (x20)	78
Şekil 4.26 L929 fare fibroblastların PLGA ve PLGA/J bazlı membran yüzeylerin üzerindeki hücre tutunması SEM görüntüleri (4. saat) (x1000)	81

Şekil 4.27 MTT analizi ile PLGA ve PLGA/J bazlı nanofibröz membranlar üzerindeki hücre canlılığının takibi	82
Şekil 4.28 L929 fare fibroblastların PLGA ve PLGA/J bazlı membran yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri (2. Gün) (x2000)	83
Şekil 4.29 L929 fare fibroblastların a. PLGA, b. PLGA-Mag II ve c. PLGA-Mag II+PLGA-EGF membran yüzeyler üzerindeki floresan mikroskobu görüntüleri (x40) (2. gün)	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Farklı çözücülerin dielektrik sabitleri	11
Çizelge 2.2 Elektrospinning parametrelerinin fiber morfolojisi üzerindeki etkileri ...	13
Çizelge 2.3 Gram-Pozitif ve Gram-Negatif bakterilerin özellikleri	19
Çizelge 3.1 PLGA ve PLGA/J nanofibröz membranların eldesi için incelenen sistem parametreleri	33
Çizelge 3.2 PLGA-EGF ve PLGA/J-EGF nanofibröz membranların eldesi için incelenen sistem parametreleri	37
Çizelge 4.1 PLGA nanofibröz membrana ait FTIR-ATR spektrum verileri ve değerlendirilmesi	50
Çizelge 4.2 PLGA/J nanofibröz membrana ait FTIR-ATR spektrum verileri ve değerlendirilmesi	51
Çizelge 4.3 Mag II immobilizasyonu öncesi ve sonrasında PLGA ve PLGA/J membranlara ait yüzey atomik bileşenleri	53
Çizelge 4.4 PLGA ve PLGA-Mag II membran yapılarında bulunan fiberlerin yüzey pürüzlülüğü değerleri	55
Çizelge 4.5 PLGA/J ve PLGA/J-Mag II membran yapılarında bulunan fiberlerin yüzey pürüzlülüğü değerleri	57
Çizelge 4.6 PLGA-EGF nanofibröz membranların elektroegirme yöntemi ile elde edilmesinde kullanılan parametreler	62
Çizelge 4.7 PLGA, PLGA-Mag II ve PLGA-EGF membranların su temas açısı değerleri	65
Çizelge 4.8 PLGA/J, PLGA/J-Mag II ve PLGA/J-EGF membranların su temas açısı değerleri	66

1. GİRİŞ

Biyomalzemelerin doku rejenerasyonu süresince kullanımını engelleyen nedenlerin başında malzemeden kaynaklanabilecek enfeksiyon gelmektedir (Costa vd. 2011). Mikroorganizmaların özellikle bakterilerin biyomalzeme yüzeyine kolaylıkla uyum sağlayarak üremeleri ve kolonize olmaları, biyofilm oluşumuna ve enfeksiyona sebep olmaktadır. Biyofilm oluşumu sonucu bakteriler antibiyotiklere karşı direnç kazanmakta ve antibiyotik kullanımı ile önlenemeyen enfeksiyon, implantın vücuttan uzaklaştırılmasını zorunlu hale getirmektedir. Bununla birlikte, enfeksiyona bağlı olarak sağlıklı doku hücrelerinin zarar görmesi doku kayıpları ve ölümle sonuçlanabilmektedir (Costa vd. 2011, Glinel vd. 2012). Biyomalzeme kaynaklı enfeksiyonlar, ortopedik ve dental implantlar, üriner ve damar içi kataterler gibi implantların yanı sıra, yara tedavisinde kullanılan biyomalzemeler için de önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Akut veya kronik yaraların tedavisinde kullanılan biyomalzemelerde karşılaşılan enfeksiyon problemi, yara iyileşme sürecini olumsuz yönde etkileyerek çoklu enfeksiyonların oluşmasına sebep olmaktadır (Costa vd. 2011).

Biyomalzeme kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi amacıyla, malzeme yüzeyinde bakteriyel kolonizasyonunun engellendiği ve biyofilm oluşum potansiyelinin en aza indirildiği antimikrobiyal özelliğe sahip malzemelerin üretilmesi hedeflenmiştir (Costa vd. 2011). Bu malzemelerin üretilmesi için geliştirilen yaklaşım, biyomalzeme yüzeylerinin bakterisidal veya bakteriyostatik mekanizmalar ile bakteri üremesini engelleyen antimikrobiyal ajanlar ile kaplanmasıdır. Bu yaklaşımla antimikrobiyal özellik gösteren biyomalzemelerin elde edilmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Antibiyotiklerin yüzeye kovalent immobilizasyonu (Ruggeri vd. 2007), implant öncesi yüzeylerde patojen olmayan bakterilerin kolonizasyonu (Carvalho vd. 2007), yüzeylerde protein yapışmasının engellenmesi (Harbers vd. 2007) ve biyosidal ajan olarak gümüş nanopartiküllerin kullanımı (Liu vd. 2013) gibi yöntemler biyomalzemelere antimikrobiyal özellik kazandırmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde, düşük verim, alerjik reaksiyonların ortaya çıkması, toksik etki, antimikrobiyal rezistans oluşumu gibi çeşitli dezavantajlar mevcuttur. Söz konusu yöntemlere alternatif olarak antimikrobiyal peptidlerin (AMP) kullanımı ile

bakteri kolonizasyonunun engellendiği biyomalzemelerin elde edilmesi mümkündür (Costa vd. 2011).

Biyomalzeme yüzeyinde bakteri kolonizasyonunun engellenmesinin yanı sıra, kullanılan malzemelerin büyüme faktörleri gibi çeşitli biyosinyal moleküller ile biyoaktif hale getirilerek, doku hücreleri ile etkileşiminin arttırılması implantın uzun süreli kullanımını ve doku rejenerasyonunun hızlanmasını sağlamaktadır. Büyüme faktörleri hücrelerin hasarlı bölgeye göçü, üremesi ve farklılaşmasını hızlandırdığından iyileşme sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve platelet-kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) fibroblast ve epidermal hücrelerin yaralı bölgeye göçünü hızlandıran ve hücre üremesine etki eden, özellikle yumuşak dokulardaki kronik yaraların tedavisinde tercih edilen büyüme faktörleridir. Bunların yanı sıra, kemik iyileşmesi için kemik doku oluşumunu tetikleyen kemik morfojenik proteinleri (BMPler) ve insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF-I) de kullanılmaktadır (Karakeçili 2006).

Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) biyomedikal alanda sıklıkla kullanılan biyobozunur yapıda alifatik bir poliesterdir. Mekanik dayanımının ve degradasyon hızının kontrol edilebilmesinin yanı sıra biyouyumlu yapısı dolayısıyla doku mühendisliğinde, yara tedavisinde ve kontrollü ilaç salım sistemlerinde kullanılmaktadır (Han vd. 2011, Makadia ve Siegel 2011, Chen vd. 2013). Bununla birlikte, doğal bir polimer olan jelatin, biyouyumlu ve biyobozunur yapısı ile ucuz ve üretimi çevreye zarar vermeyen özellikleri nedeniyle biyomedikal alanda ve doku mühendisliği uygulamalarında oldukça fazla ilgi gören bir malzemedir. Elektroeğirme yöntemi ile hazırlanan PLGA/jelatin (PLGA/J) kompozitleri özellikle damar greftleri (Han vd. 2011), yara örtü malzemesi (Li vd. 2006) ve kemik rejenerasyonunun (Meng vd. 2010) hedeflendiği çalışmalarda kullanılmaktadır.

Sunulan tez kapsamındaki çalışmanın amacı, biyoaktif ve antimikrobiyal özellik gösteren biyomalzemelerin tasarlanması ve karakterizasyonudur. Bu amaçla, biyomalzeme olarak PLGA ve PLGA/J kompozitleri kullanılarak antimikrobiyal ve biyoaktif özellikler taşıyan çift tabakalı membranlar hazırlanmıştır. Hazırlanan membranların bakteri ve hücre etkileşimlerine ilişkin çalışmalar yürütülmüştür.

Tez çalışması kapsamında, biyomalzeme olarak seçilen poliester yapıdaki PLGA ve bu yapıya doğal bir polimer olan jelatinin eklenmesiyle elde edilen PLGA/J kompozitleri ile yürütülen çalışmalarda, elektroğirme yöntemiyle nanofibröz yapıda hazırlanan membranlar kovalent immobilizasyon yöntemi kullanılarak antimikrobiyal bir peptid olan Magainin II ile modifiye edilmiştir. Ardından PLGA ya da PLGA/J yapılar bir büyüme faktörü olan EGF varlığında elektroğirme yöntemi kullanılarak Mag II ile modifiye edilmiş membranlar üzerinde toplanmıştır. Böylelikle, ilk tabakası antimikrobiyal özellik taşıyan ikinci tabakası ise biyoaktif özellik taşıyan çift tabakalı membranlar elde edilmiştir. Membranların antibakteriyal özelliklerinin araştırıldığı çalışmalarda, iki farklı bakteri suşu kullanılmıştır. Gram-pozitif *Staphylococcus aureus* (S. aureus, ATCC 6538) ve Gram-negatif *Escherichia coli* (E.coli, ATCC 25922) suşları ile yürütülen çalışmalarda, Mag II modifikasyonu sonrasında PLGA ve PLGA/jelatin membranlara yapışan bakteri sayısının %50 üzerinde azaldığı sonucuna varılmıştır. L929 fare fibroblast hücrelerinin kullanıldığı hücre kültür çalışmalarında ise, Mag II varlığının toksik bir etkiye sebep olmadığı bulunmuştur. Bununla birlikte, PLGA ve PLGA/J yapılarına katılan EGF, L929 hücrelerinin yüzeye tutunmasını ve yapışmasını arttırmış, EGF içeren çift tabakalı membranlarda hücre üremesinde önemli artış olduğu sonucuna varılmıştır. Tez çalışması kapsamında hazırlanan PLGA bazlı membranların hem antibakteriyal aktiviteye sahip hem de biyoaktif özellik gösteren membranlar olduğu sonucuna varılmıştır.

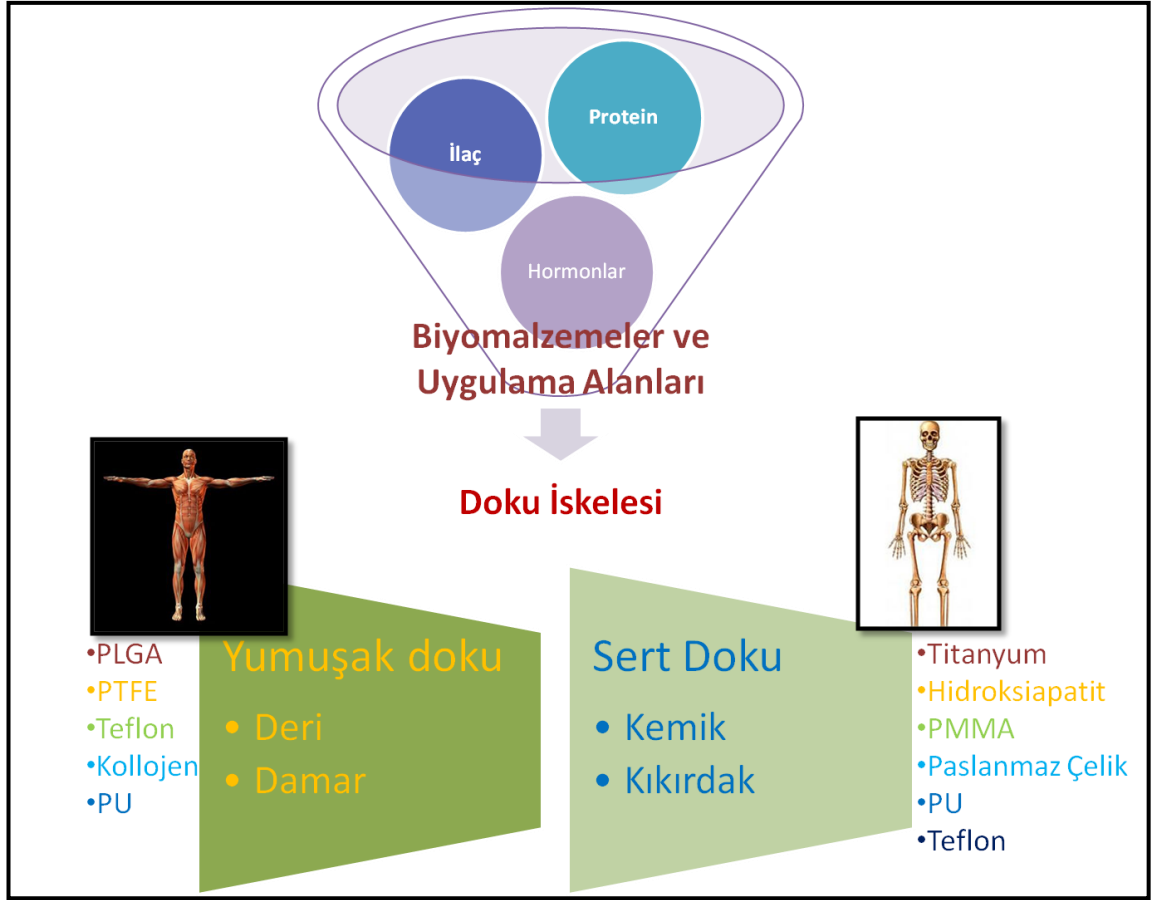
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

Bu bölümde sunulan tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili literatür bilgisi beş ana başlık altında özetlenmiştir. İlk bölümde, biyomalzemeler hakkında genel bilgi verilmiş, polimerik biyomalzemeler ve özellikle çalışmada kullanılan poli(laktik-ko-glikolik asit) ile jelatinin özellikleri açıklanmıştır. İkinci bölümde, biyomedikal alanda biyomalzeme üretiminde kullanılan elektroegirme tekniği hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir. Sonraki bölümde, biyomalzeme kaynaklı enfeksiyonlara sebep olan mikroorganizmalar açıklanmıştır. Dördüncü bölümde, biyomalzeme kaynaklı enfeksiyonlar, bu enfeksiyonların önlenmesinde kullanılan yöntemler ve antimikrobiyal peptidlere değinilmiştir. Son bölümde ise, biyoaktif malzemeler ve büyüme faktörleri hakkında bilgi verilmiştir.

2.1 Biyomalzemeler

Biyomalzemeler, biyomedikal alanda doku mühendisliği yaklaşımı ile geliştirilen yapay doku ve organlarda, hücrelere yapısal destek sağlayan ve yapay organın ya da dokunun iskeletini oluşturan malzemelerdir. İnsan vücudunda kullanıldıkları bölgeye göre çok değişik koşullara sahip olan ortamlarda kullanılmaktadırlar. Biyomalzemeler; metaller, seramikler, polimerler ve kompozit malzemeler olarak gruplandırılmaktadır. Alüminyum oksit, biyoaktif cam ve karbon biyoyumlu seramik malzemelere örnek olarak verilebilir. Biyomalzeme olarak kullanılan metaller ve alaşımlar ise, altın, tantal, paslanmaz çelik ve titanyum alaşımlarıdır. Polimerler çok değişik bileşimlerde ve şekillerde (lif, film, membran, jel) hazırlanabilmeleri nedeniyle biyomalzeme olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir (Ratner vd. 2013). Şekil 2.1’de biyomalzeme olarak kullanılan yapılara örnekler verilmiştir.

Doğal veya sentetik yapıda olabilen biyomalzemelerin, dokularla uyumlu bir şekilde kullanılabilmesi için yüzey özelliklerinin fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak doğal dokulara uygun olması gerekmektedir. **Biyoyumluluk** olarak tanımlanan bu özelliğin yanı sıra, malzemelerin *in vivo* koşullarda enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla toksik yan ürünler oluşturmayacak şekilde bozunması yani **biyobozunur** yapıda olması istenmektedir (Karakeçili 2006, Ratner vd. 2013)



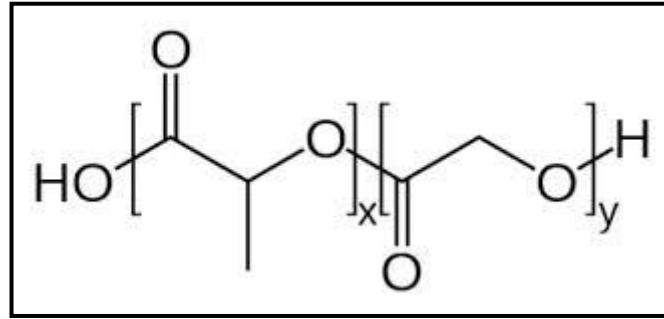
Şekil 2.1 Biyomedikal alanda kullanılan malzemeler ve uygulama alanları

Sunulan tez çalışmasında, biyomalzeme olarak poliester yapıdaki poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve doğal bir polimer olan jelatin kullanılmıştır. Kullanılan bu biyomalzemeler ile ilgili detaylı bilgi bölüm 2.1.1 ve bölüm 2.1.2’de sunulmuştur.

2.1.1 Poli(laktik-ko-glikolik asit)

Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), biyobozunur polimer ailesine giren fiziksel olarak güçlü ve yüksek biyoyumumluluğa sahip ilaç, protein ve çeşitli makromolekül salım çalışmalarında kullanılabilen sentetik bir polimerdir. Poliester yapıda olan PLGA'nın kopolimerleri yapısında asimetrik α -karbonları bulunan klasik sterokimyasal olarak D ve L formları bulunan PLA ve PGA polimerleridir ve bu polimerlerin ester bağı yapmaları sonucunda elde edilmektedir (Makadia ve Siegel 2013). PLGA kopolimerinin kimyasal yapısı şekil 2.2’de verilmiştir.

PLGA hidrofobik ve amorf yapıda olup camsı geçiş sıcaklığı 40-60°C arasında değişiklik göstermektedir. Sulu ortamda PLGA hidrolize uğrayarak ester bağlarının parçalanmasıyla bozunmaktadır. PGA, hidrofilik yapısı nedeniyle sulu ortamlarda ve hücre içinde hızla çözünür ve kısa bir sürede yapısal bütünlüğünü kaybeder. PLA yapısındaki metil grupları yapıyı hidrofobik hale getirmekte, PLA oranı arttıkça su tutma kapasitesi azaldığından ve hidroliz yavaşladığından bozunma süresi artmaktadır. PLGA (50:50) için bozunma süresi 1-2 ay aralığında değişirken bu değer PLGA (85:15) için 5-6 ay aralığına kadar uzamaktadır (Domb vd. 2011).



Şekil 2.2 PLGA kopolimerinin kimyasal yapısı

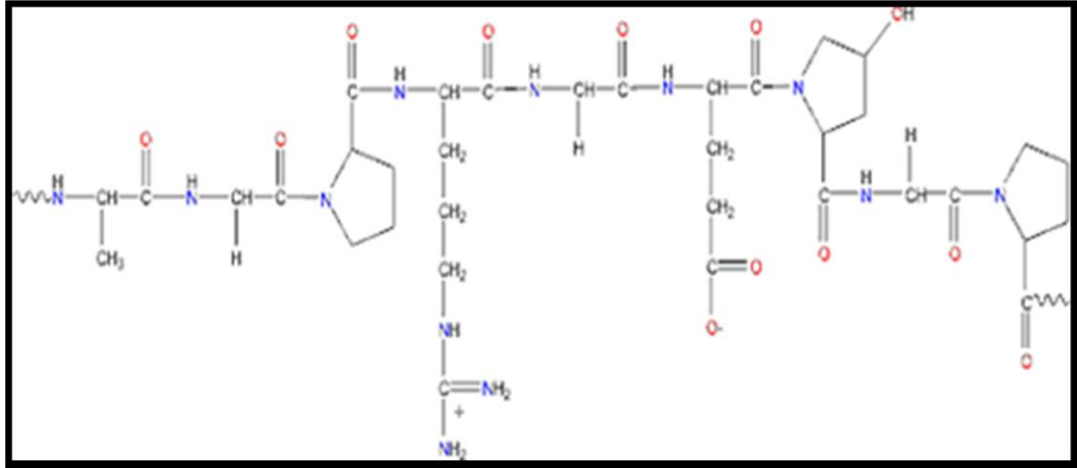
Biyomedikal alanda kullanımı **Food and Drug Administration** (FDA) tarafından onaylanmış olan PLGA, ticari olarak biyobozunur ameliyat ipliklerinin (Purasorb, Vicryl ve Panacryl) ve deri doku eşleniklerinin (Dermagraft ve Transyte) üretiminde kullanılmaktadır (Domb vd. 2011).

PLGA doku mühendisliği uygulamalarında ve kontrollü ilaç salım sistemlerinde mekanik dayanım, biyobozunurluk ve toksik olmayan özellikleri dolayısıyla sıklıkla tercih edilen bir polimerdir. Buna karşın, yüksek hidrofobik özeliği sebebiyle hücrelerin üzerinde çoğalması konusunda dezavantaja sahiptir. Bu nedenle literatürde PLGA ile gerçekleştirilen çalışmalarda yapının doğal polimerler ile kompozitleri hazırlanmış ya da hücrel aktiviteyi artıracak protein ve büyüme faktörleri ile desteklenmiştir (Wang vd. 2003, Sahoo vd. 2010) PLGA, doku mühendisliği uygulamaları için elektroegirme (Sahoo vd. 2010), çözücü döküm-partikül uzaklaştırma (Dorati vd. 2010) ve süperkritik karbon dioksit ile gaz köpükleştirme

(Mou vd. 2011) gibi yöntemler kullanılarak üç boyutlu gözenekli yapılarda hazırlanabilmektedir. Bunların dışında, kontrollü ilaç salım sistemlerinde kullanılmak üzere mikro ya da nano partikül formunda elde edilebilmektedir (Yallapu vd. 2010).

2.1.2 Jelatin

Doğal polimerlerden insan vücudunda en çok bulunan protein olan kollajenin kontrollü hidrolizinden elde edilen hayvansal kaynaklı bir protein olan jelatin, yarı saydam, renksiz mekanik dayanımı zayıf olan bir polimerdir. Jelatin, hidroliz işlemi sırasında kollajenden izole edilen yapının farklılığına göre Tip-A ve Tip-B olmak üzere iki farklı şekilde üretilmektedir. Jelatinin kimyasal yapısı şekil 2.3’de verilmiştir. Biyouyumlu ve biyobozunur bir malzeme olması dolayısıyla doku iskelesi üretimi ve ilaç salım sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Kang vd. 1999). Ayrıca hidrofilik özellikte olması jelatin ile elde edilen doku iskelelerinde hücresel aktivitenin daha yüksek olmasını sağlamaktadır. Amino asit dizilimi yapısında bulunan amino asit miktarlarına bağlı olarak molekül ağırlığı 20-100 kDa arasında değişebilmektedir.



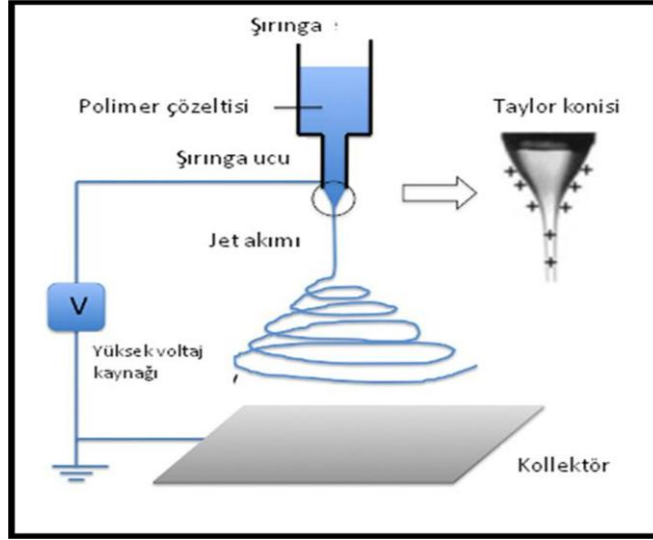
Şekil 2.3 Jelatinin kimyasal yapısı.

2.2 Elektroeğirme

Elektroeğirme tekniği elektrostatik kuvvetler kullanılarak polimerlerin fiber yapıda elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Elektroeğirme tekniği birçok polimere uygulanabilmesi dolayısıyla doku mühendisliği uygulamalarında önemli bir yer

tutmaktadır. Bu teknik ile örülmemiş ağ yapıda ya da doğrusal yapıda nanoboyuttan mikron boyuta kadar fiberlerin elde edilebilmesi mümkündür. Bununla birlikte oluşturulan fiber yapıların doğal hücre dışı matriks yapısına benzerlik göstermesi, fiberlerin hücre etkileşimi için geniş yüzey alanı sağlaması ve oluşan yapının besin maddeleri gibi sıvıların transferine olanak tanınması açısından önemli bir tekniktir (Kim vd. 2008, Sill vd. 2008).

Elektroeğirme için gerekli deney düzeneği; yüksek voltaj güç kaynağı, besleme ünitesi ve toplayıcı olmak üzere üç temel düzenden oluşmaktadır. Bu teknikte, polimer uygun bir çözücünde çözülerek ya da eriyik haline getirilerek şırınganın içine yerleştirilir. Daha sonra polimer çözeltisi ile toplayıcı levha arasında voltaj gerilimi uygulanır. Besleyici üniteye bağlı iğnenin ucunda asılı durumda duran polimer çözeltisi damlası kritik bir voltaj değerine kadar, yüzey geriliminin uyguladığı kuvvetlerden dolayı, küresel bir biçimde bulunur. Uygulanan potansiyel fark bir eşik değerine ulaştığı anda, elektrostatik kuvvetler yüzey gerilimi kuvvetlerine eşitlenir. Bu noktada polimer damlası şekil değiştirerek koni biçimini alır. Bu koniye **Taylor konisi** adı verilmektedir. Polimer damlası Taylor konisi halini aldıktan sonra voltajdaki çok küçük bir artışla birlikte koni ucundan bir jet fışkırır. Yüklenen jet Taylor konisinden çıktıktan sonra belli bir mesafede kararlı bir şekilde hareket eder. Daha sonra jette kararsızlık hali belirir ve fiber jet formunda oluşan akış kararsız halde kollektör üzerinde toplanır (Sill vd. 2008) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Elektroğirme düzeneği

Elektroğirme ve bu teknikle elde edilen fiberleri etkileyen parametreler; polimer çözeltisi parametreleri ve işlem parametreleri olarak ikiye ayrılabilir. Bu parametrelerin optimizasyonu ile boncuk içermeyen nanofibröz membranlar elde edilebilmektedir. Polimer çözelti parametreleri ve işlem parametrelerinin fiber oluşumundaki etkileri aşağıda incelenmektedir.

Polimer Çözeltisi Parametreleri

Elektroğirme tekniği ve elde edilen fiberlerin morfolojisi polimer çözeltisinin özellikleri ile doğrudan ilgilidir. Bu kapsamda polimerin molekül ağırlığı, çözelti viskozitesi, derişimi ve elektriksel özellikleri elektroğirme işlemi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir.

- **Polimerlerin Molekül Ağırlığı, Çözelti Viskozitesi ve Derişimi**

Çözelti viskozitesini etkileyen faktörlerden birisi kullanılan polimerin molekül ağırlığıdır. Polimerin molekül ağırlığı polimer zincirinin uzunluğunun göstergesidir. Çözelti viskozitesini arttırmak için yüksek molekül ağırlıklı polimerler kullanmanın yanında çözelti derişimi artırılabilir. Fiberlerin elektroğirme tekniği ile oluşturulabilmesi için çözelti yeterli molekül ağırlığına sahip polimer kullanılarak hazırlanmalı ve elde edilen çözeltinin viskozitesinin elektroğirme sistemi eşik

değerinin üzerinde olması gerekmektedir. Elektroeğirme işlemi sırasında polimer jeti şırınga ucunu terk ettikten sonra polimer çözeltisi toplayıcı tabakaya doğru gerilir ve uzar (Buchko vd. 1999). Bu uzama esnasında polimer zincirleri birbirine dolanır ve polimer jetin kopması engellenir. Polimer jetin birbirine dolanması, elde edilen fiberlerin üzerinde boncuk oluşması arasında önemli bir bağlantı vardır. Polimer jetin birbirine dolanması ve boncuksuz fiberlerin oluşması için minimum viskozite gerekmektedir (Bhardwaj vd. 2010). Bununla beraber yüksek viskozite elektroeğirme işlemi başlamadan çözeltinin şırınga ucunda kurummasına sebep olabilir. (Zhong vd. 2006).

- **Yüzey Gerilimi**

Elektroeğirme işleminin başlaması için yüklü çözeltinin kendi yüzey gerilimini aşması gerekmektedir. Oluşan polimer jeti, toplayıcıya doğru hareket ederken yüzey gerilimi jet boyunca boncuk oluşumuna neden olabilir. Yüzey geriliminin akışkanın birim kütlesi başına yüzey alanını düşürücü etkisi çözelti içindeki yüksek derişimli bölgelerin küresel formda boncuk oluşturmalarına neden olmaktadır. (Zhong vd. 2006).

- **Çözelti İletkenliği**

Elektroeğirme tekniği, çözelti üzerindeki yüklerin birbirini itmesi ile polimer jetin gerilmesi ve uzaması prensibine dayanır. Dolayısıyla çözelti iletkenliğinin artması ile elektroeğirme işlemi esnasında polimer jeti tarafından daha fazla yük taşınır ve polimer jetin uzaması artar. Sonuç olarak jetin uzaması arttıkça daha küçük çaplı ve düzgün fiberler elde edilir (Zhong vd. 2006). Ayrıca çözelti iletkenliğinin artması fiberin elde edilmesi için gerekli olan kritik voltaj değerinin azalmasını sağlayacaktır. Bununla beraber çözelti iletkenliğinin artması, yüklerin birbirlerini itmesi ile meydana gelen bükülme kararsızlığının şırınga ucuna daha yakın bir yerde başlamasını sağlayacak ve fiberlerin toplayıcı üzerinde biriktiği alan artacaktır (Choi vd. 2003).

- **Çözücü Dielektrik Sabiti**

Kullanılan çözücünün dielektrik sabiti, elektroğirme işlemi üzerinde önemli bir parametredir. Yüksek dielektrik sabitine sahip çözücü kullanılan uygulamalarda elde edilen fiberlerin çaplarında ve boncuk oluşumunda azalmalar meydana geldiği görülmektedir (Bhardwaj vd. 2010). Çözücünün dielektrik sabiti arttığında elektroğirme jetinin bükülme kararsızlığı da artmaktadır. Bu aynı zamanda polimer jetin kat edeceği yolu arttırmakta ve fiberlerin çapını düşürmektedir. Farklı çözücülerin dielektrik sabitleri çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Farklı çözücülerin dielektrik sabitleri

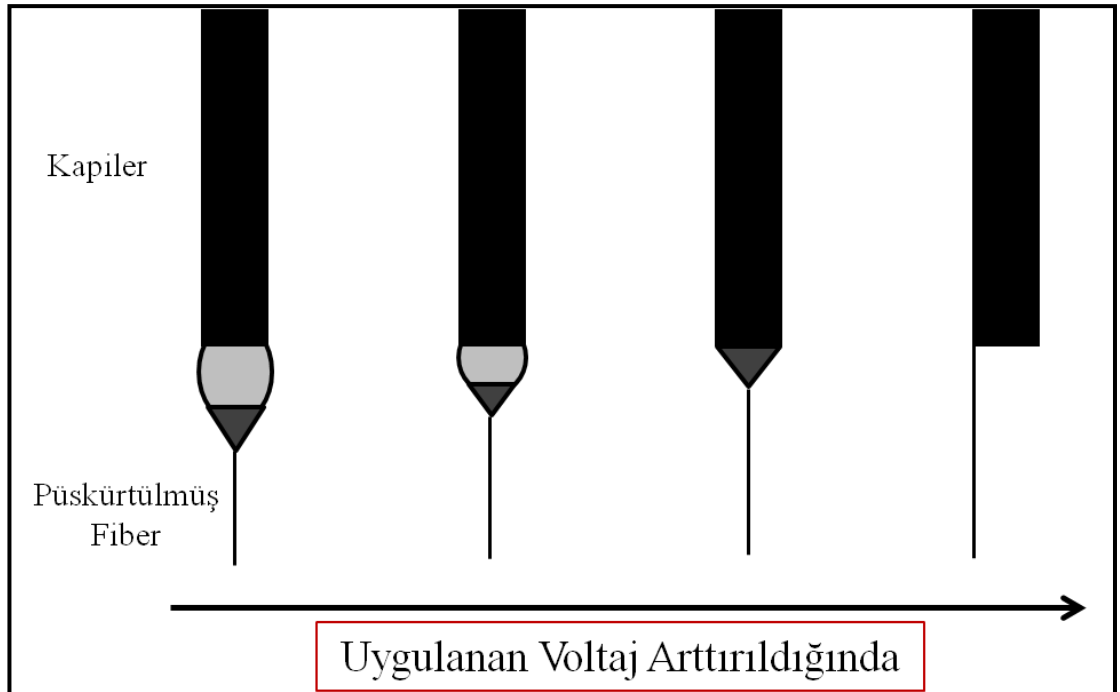
Çözücü	Dielektrik sabiti (20-25°C)
Kloroform	4.8
Su	80.0
Etanol	24.3
Metanol	33.0
Tetrahidrofuron (THF)	7.5
Diklorometan (DCM)	9.1
Aseton	21.0
1,4 Dioksan	2.3
Dimetil sülfoksit (DMSO)	47.0
Toluen	2.4
Hekza floro izopropanol (HFIP)	16.7
İzopropanol	18.0
Trifloro etanol (TFE)	27.7
Dimetil formamit (DMF)	38.3
Asetik Asit	6.1

İşlem Parametreleri

Elektroeğirme prosesini etkileyen diğer parametreler, işlem parametreleri olarak bilinen elektroegirme jetine uygulanan dış faktörlerdir. Bu parametreler; uygulanan voltaj çözelti akış hızı ve toplayıcı-iğne ucu uzaklığıdır. Bu parametrelerin elde edilen fiber morfolojisinde etkileri olmakla beraber çözelti parametrelerine göre etkileri daha azdır.

- **Uygulanan Voltaj**

Elektroegirme işlemi gerçekleşirken uygulanan voltaj, elde edilen fiberlerin çapları ve morfolojileri üzerine doğrudan etki etmektedir. İşlem sırasında elektroegirme jetinin oluşabilmesi için voltaj değerinin belirli bir eşik değerini aşması gerekir. Fakat bu minimum voltaj değerinde elde edilen fiberin yapısında boncuk bulunması yüksek bir olasılıktır. Belirli bir seviyeye kadar voltaj değeri artırılarak boncuk oluşumu engellenebilir. Voltaj değerinin artırılması fiber çaplarının azalmasına da neden olmaktadır.



Şekil 2.5 Uygulanan voltajın Taylor konisine etkisi (Sill vd. 2008)

- **Çözelti Akış Hızı**

Polimer çözeltisinin akış hızı, fiber çapı ve morfolojisi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Genellikle çözelti akış hızının artırılması ile fiber çaplarında artış olduğu gözlenmiştir. Bununla beraber yüksek hızla toplayıcıya gönderilen çözeltinin toplayıcıya ulaşmadan kuruyamaması sonucunda fiber yapıların küresel formlarının bozulması söz konusu olabilir. Düşük akış hızında çözeltinin gönderilmesi ise şırınganın ucunda çözücünün kurumasına ve boncuksu yapıların oluşmasına neden olmaktadır.

- **Şırınga Ucu-Toplayıcı Arası Uzaklık**

Şırınga ucu-toplayıcı uzaklığı diğer işlem parametrelerine oranla fiber çapı ve morfolojisi üzerinde daha az etkili olsa da toplayıcı uzaklığının artması hem fiberlerin çapının küçülmesine hem de ağsı yapının daha büyük bir alana toplanmasını sağlamaktadır.

Çizelge 2.2'de elektroğirme parametrelerinin fiber morfolojisi üzerindeki etkilerine ilişkin genel bir tablo sunulmuştur.

Çizelge 2.2 Elektroğirme parametrelerinin fiber morfolojisi üzerindeki etkileri

Parametre	Fiber morfolojisi üzerindeki etkisi
Volta j ↑	Fiber çapı ↓
Akış Hızı ↑	Fiber çapı ↑ (Akış hızı çok arttığında fiber morfolojisinde boncuklar görülebilir)
Şırınga ucu-toplayıcı uzaklığı ↑	Fiber çapı ↓ (Şırınga ucu-toplayıcı uzaklığı çok kısa olursa fiber morfolojisinde boncuklar görülebilir)
Polimer derişimi (Viskozite) ↑	Fiber çapı ↑ (Optimum koşullarda)
Çözelti İletkenliği ↑	Fiber çapı ↓ (Geniş çap dağılımı olabilir)

Elektroeğirme tekniği, malzeme seçimindeki esneklik ve fiber özelliklerinin kontrol edilebilmesi dolayısıyla çeşitli doku mühendisliği uygulamaları için biyomalzeme üretiminde avantajlar sağlamaktadır (Sill vd. 2008). Elektroeğirme tekniği kullanılarak hücre dışı matris benzeri yapılar oluşturulabilir ki bu yapılar hücre çoğalması ve yapışmasında önemli rol oynamaktadır (Sill vd. 2008). Bununla beraber gözenekli membran hücrelere besin transferini hızlandırmaktadır (Bhardwaj vd. 2010). Çok sayıda fiberden oluşan membranın yüzey alanı artmaktadır ve bu özellik hücre yapışmasının daha kolay gerçekleşmesini sağlamaktadır. Buna karşın, küçük gözenekli yapısı nedeniyle hücre penetrasyonunun zorlaşması ve 2-boyutlu (2D) yapısı elektroeğirme tekniği ile elde edilen membranların kullanımında karşılaşılan dezavantajlar olarak sıralanabilir (Sill vd. 2008).

Doku mühendisliği uygulamalarında elektroeğirme tekniği ile birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Tıgılı ve grubu tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, elektroeğirme tekniği kullanılarak hazırlanan poli(kaprolakton)/jelatin (PCL/J) nanofibröz doku iskelelerine EGF immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen yapının özellikle deri doku mühendisliğinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Damar doku mühendisliği uygulamaları için yürütülen çalışmalarda poli(laktik-ko-ε-kaprolakton) (PLCL) kopolimerinden elektroeğirme yöntemi ile elde edilen doku iskeleleri kullanılmış ve insan umbilikal damar endotel (HUVEC) hücrelerinin yapışmasında artış gözlenmiştir (Inoguchi vd. 2007).

Elektroeğirme tekniği kullanılarak elde edilen fiber yapıların yüzey alanı/hacim oranının yüksek olması nedeniyle su absorplama kapasitelerinin fazla olması, gözenekli yapı sayesinde nem kontrolünün sağlanabilmesi ve nanofibröz yapının hemostatik fazı desteklemesi nedeniyle, yara iyileşme sürecinde kullanılan fonksiyonel malzemelerin üretilmesinde de tercih edilen bir tekniktir (Zahadi vd. 2010). Bu teknik kullanılarak hazırlanan nanofibröz membranlar, çeşitli yöntemler kullanılarak antimikrobiyal ajanlarla modifiye edilmiş ve antibakteriyal özelliğe sahip biyomalzemelerin elde edilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda, antimikrobiyal ajan olarak gümüş partiküller, antibiyotikler veya salisilik asit türevleri kullanılmıştır (Zahadi vd. 2010). Poli(vinil alkol) kullanılarak

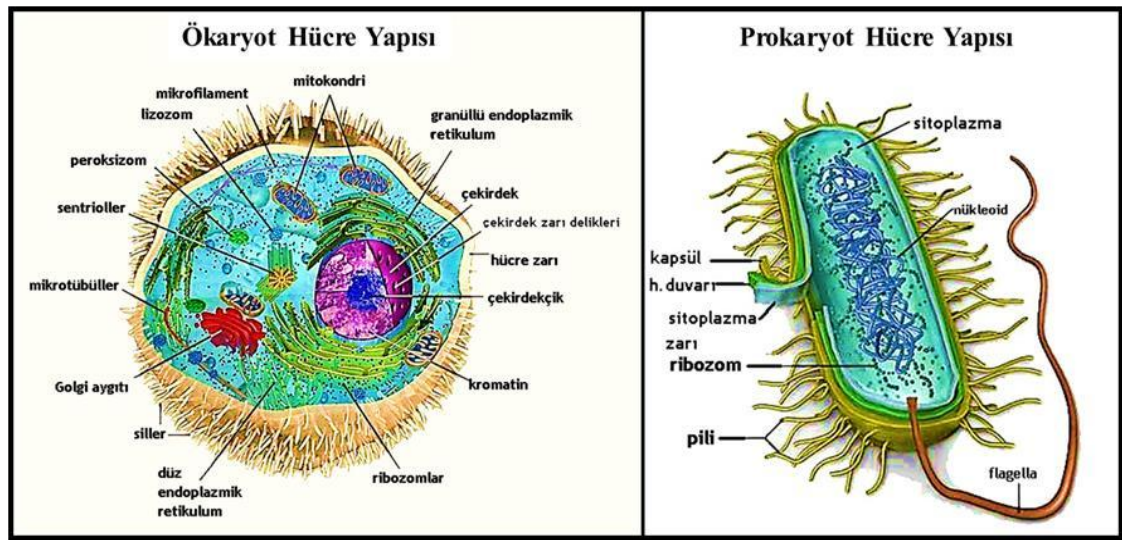
yapılan bir çalışmada, yara örtü materyali olarak kullanılmak üzere nanofiber yapıda membranlar elektroğirme tekniği ile hazırlanmıştır. Hazırlanan membrana antimikrobiyal özellik kazandırmak amacıyla gümüş iyonları yüklenmiş zirkonyum nanopartikülleri eklenmiştir (Hong 2007). Said ve grubu (2011) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ile antimikrobiyal bir ajan olan fusidik asit (FA) kullanılmış, elektroğirme tekniği ile elde edilen PLGA/FA nanofiberler üzerinde biyofilm oluşumu incelenmiştir. Xing ve grubu (2010) tarafından yürütülen bir diğer çalışmada, yapay eklemlerde kullanılmak üzere poli(hidroksi bütıl valerat) (PHBV) nanofiber yapılar elektroğirme tekniği ile elde edilmiştir. Yapay eklemlerde karşılaşılan enfeksiyon probleminin önüne geçilmesi amacıyla yapıya gümüş nanopartiküller eklenmiştir.

2.3 Mikroorganizmalar

Mikroorganizma; adından da anlaşıldığı üzere boyutları 1 mm altında olan mikroskopik organizmaların genel adıdır. Halk arasında “**mikrop**” diye adlandırılan mikroorganizmalar, yapılarına göre üç gruba ayrılmıştır. Birinci grup; hücre yapıları hayvan ve bitki hücre yapısına benzerlik gösteren mikroorganizmaları içerir ve gerçek çekirdekli anlamına gelen **ökaryotik mikroorganizma** olarak adlandırılır. Mikroorganizmaların ikinci grubu; daha basit bir hücre yapısına sahip olan mavi-yeşil algler, bakteriler ve arkbakterileri içeren **prokaryotik mikroorganizmalardır**. Mikroorganizmaların üçüncü grubunu ise; hücre yapısı göstermeyen ve tek başlarına metabolizma aktivitesi bulunmayan **virüsler** oluşturmaktadır (Bilgehan 2008).

Hayvanlarda, bitkilerde ve gelişmiş protistlerde bulunan **ökaryotik hücreler**; genellikle 10 µm ve daha büyük çapa sahiptir. Bununla beraber, içerisinde DNA’yı bulunduran çekirdek yapısı, çok çeşitli amaçlar için kullanılan organeller ve bölünme tarzı gibi farklılıklar ile prokaryotik hücrelere göre daha gelişmiş yapıya sahiptir. Ökaryotik mikroorganizmalar grubuna **algler**, **protozoonlar** ve **mantarlar** girmektedir (Sumbali ve Mehrotra 2001, Tunail 2009).

Prokaryotik hücreler; ökaryotik hücreler ile kıyaslandığında çok daha küçük ve basit morfolojiye sahiptirler. Prokaryot hücreler genellikle 0.2–2 μm çapında ve 2–8 μm uzunluğundadır. Bununla beraber bakterilerin boyutları 125 nm ile 20 μm arasında değişmektedir. Prokaryotik hücrede sitoplazmanın dış tarafında hücreye şekil veren ve ozmotik basınç nedeniyle parçalanıp dağılmasına karşı direnç sağlayan hücre duvarı bulunur. Yapılarında yalnızca sitoplazma içerisinde serbest halde bulunan DNA ve suda yaşayan bakterilerin yüzmesine yarayan gaz vakuolleri bulunmaktadır (Tunail 2009) (Şekil 2.6).



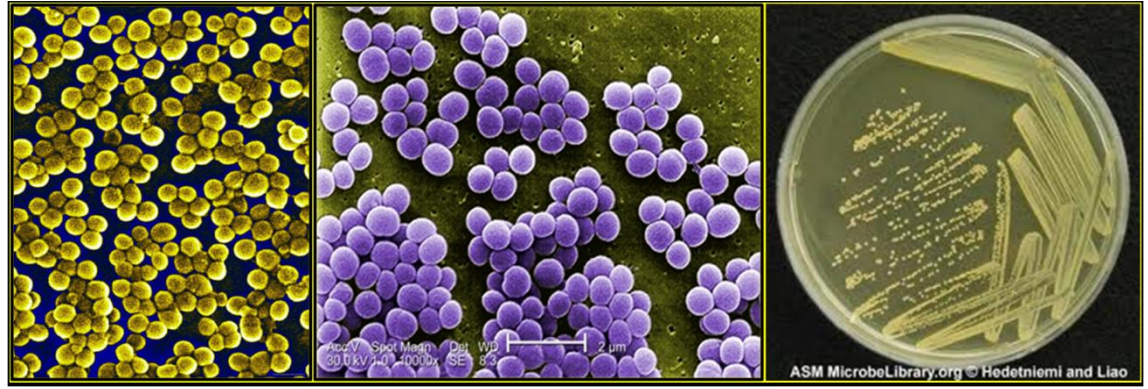
Şekil 2.6 Prokaryotik ve ökaryotik hücre yapıları ve yapılarında bulunan organeller

(<http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/canlilar/monera/proeufark.htm>)

Bakteriler morfolojik olarak birbirine çok benzer yapıdadırlar ve genellikle **yuvarlak** (*coccus*), **çomak** (*bacilli*) ya da **sarmal** formlarda bulunurlar. Bununla beraber bu temel formlardan ayrılan birçok cins bulunur (Sumbali ve Mehrotra 2001).

Yuvarlak şekilde olan bakteriler; **koklar**, genellikle pürüzlü ve küresel hücreleri içerir. Bu bakteriler ortamda tek tek bulunabildikleri gibi farklı düzlemsel yapılarda da bulunabilmektedir. Kokların çapları 0.4 ila 2 μm arasında değişmekle birlikte daha çok 0.8-1 μm aralığında bulunurlar (Tayar ve Hecer 2010, Sumbali ve Mehrotra 2001). Koklar bölünme sonrası dizilimlerine göre yeniden isimlendirilmektedir. Bölünme sonrası birbirinden tam olarak ayrılan koklara **mikrokok** olarak

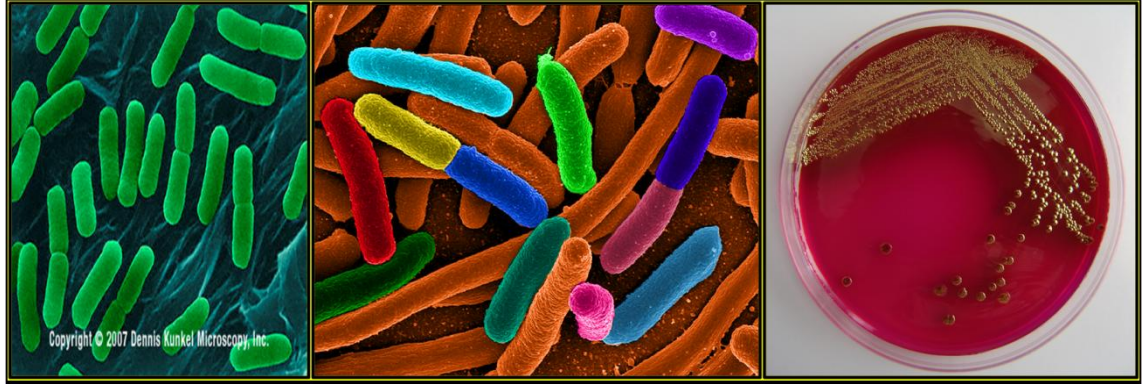
adlandırılırken çift olarak dizilen koklara **diplokok** denir. Kokların bölünmesi; paralel düzlemler halinde, devamlı ve uzun zincirler halinde ise **streptokoklar** (*streptococcus*) olarak adlandırılır. Bu tür bakteriler **Gram-pozitif** grubuna giren sporsuz ve hareketsiz bakterilerdir. Bu tür koklara örnek olarak *Streptococcus epidermidis* ve *Streptococcus pneumoniae* gösterilebilir. Bireysel koklar çeşitli yönlerde doğru çoğalırken üzüm salkımı gibi birbirlerine bağlı kaldıklarında ise **stafilokokus** (*staphylococcus*) olarak adlandırılır. Bu çeşit koklar streptokoklara benzer şekilde Gram-pozitif grubuna giren sporsuz ve hareketsiz bakterilerdir. *Staphylococcus aureus* bakterisi bu türe örnek olarak gösterilebilmektedir (Tayar ve Hecer 2010) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 *Staphylococcus aureus* bakterisinin SEM ve ekim görüntüleri

(<http://lib.jiangnan.edu.cn>, <http://www.extension.org>)

Başka bir bakteri formu olan **çomak** (*bacillus*) şeklindeki bakteriler silindir şeklinde olup genellikle 0.5-1 µm eninde ve 5-6 µm boyundadır. Çomak bakterilerin uçları düz, yuvarlak, çatallanmış ve puro biçimlerinde olup bazı türleri hareket kabiliyeti kazandıran kapçılara sahiptir. Çomak bakteriler bölünme sonrası farklı dizilimlerde bulunurlar. Bölünme sonrası tek başına bulunanlar **basilus** (*bacillus*), zincir oluşturmuş halde bulunanlar **streptobasilus** (*streptobacillus*) ve oval ve kok benzeri olanlar ise **kokobasilus** (*coccobacillus*) olarak adlandırılır. Çomak bakterilere *Escherichia coli* örnek gösterilebilir (Bilgehan 2008, Tayar ve Hecer 2010) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 *Escherichia coli* bakterisinin SEM ve ekim görüntüleri

(<http://www.keepourfoodsafesafe.org/wp-content>, <http://www.oxbridgebiotech.com/review>)

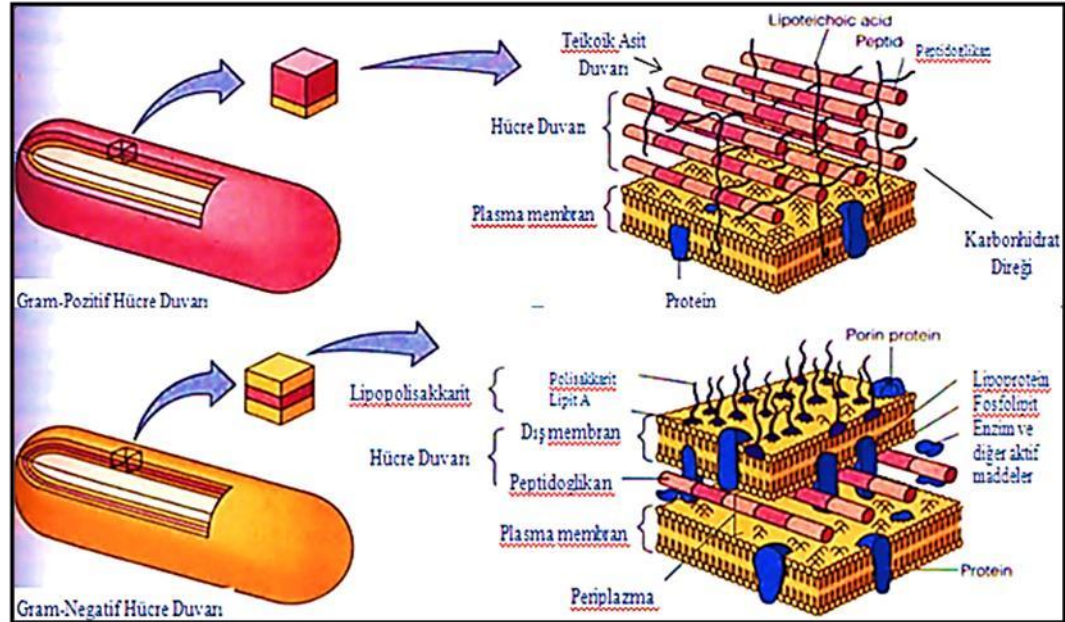
Prokaryotik hücrelerin bir diğer hücre formu ise **spiral**dir. Tam bir turdan daha az kıvrıma sahip bakteriler **spiral** şekil bakteri formuna sahiptir ve **vibrios** ya da **komma** olarak adlandırılır. Bu tür bakteriler esnek ve bükülebilen ve yumuşak yapıya sahiptir, örnek olarak *Aquaspirillum* ve *Treponema* gösterilebilir (Sumbali ve Mehrotra 2001, Bilgehan 2008).

Bakteriler; günümüzde bakteri tanısında en geçerli testlerden birisi olan **Gram-boyama** yöntemine verdikleri reaksiyon ile ikiye ayrılmaktadır. Bu testte bakteri kültürüne kristal viyole boya uygulanır ve ardından derhal iyot çözeltisi ile yıkanır. Daha sonra boyanın geri alınması amacıyla bakteri kültürü etanol ya da eter ile kısa süre yıkanır. Bu işlem sonunda bazı bakteriler kristal viyole ile etkileşime giren iyotu hücre içinde tutarken, bazı bakterilerde ise yıkama işlemi ile kristal viyole boya geri verilmekte ve bakteri hücresi renksiz kalmaktadır. Renksiz kalan bakterilerin daha iyi görülebilmesi amacıyla bu bakteriler safranin ile boyanır. Sonuç olarak ilk boyama işleminde kristal viyole rengi tutanlar **Gram-pozitif** bakteriler, ilk boyamada boyayı dışarı veren, ikinci boyamada boyandıklarında ise pembe-kırmızı rengi alanlar **Gram-negatif** bakteriler olarak adlandırılmaktadır (Bilgehan 2008, Tunail 2009). **Gram-pozitif** ve **Gram-negatif** bakterilerin özellikleri çizelge 2.3’de verilmiştir.

Çizelge 2.3 Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin özellikleri (Tortora vd. 2012)

Karakteristik	Gram-pozitif	Gram-negatif
Peptidoglikan Tabakası	Kalın (Çok Tabakalı)	İnce (Tek Tabakalı)
Dış Membran	Yok	Mevcut
Lipopolisakkarit İçeriği	Çok Az	Çok
Lipit ve Lipoprotein İçeriği	Az	Çok
Toksin Üretimi	Dış Zehir	İç Zehir
Direnç ve Fiziksel Bozunma	Yüksek	Düşük
Lizozom ile Hücre Duvarı Bozunması	Yüksek	Düşük
Sülfonamit ve Penisilin Duyarlılığı	Yüksek	Düşük
Boyama ile inhibisyonu	Yüksek	Düşük
Anyonik Deterjan Duyarlılığı	Yüksek	Düşük

Gram-boyama mekanizmasının kendi boyanmadığı halde hücre duvarı yapısına bağlı olduğu bilinen bir gerçektir. Şekil 2.9’da yapıları verilen **Gram-pozitif** ve **Gram-negatif** bakterilerin hücre duvarları yapısının ve içeriklerinin farklı olmasının boyama sonucunu etkilediği düşünülmektedir.



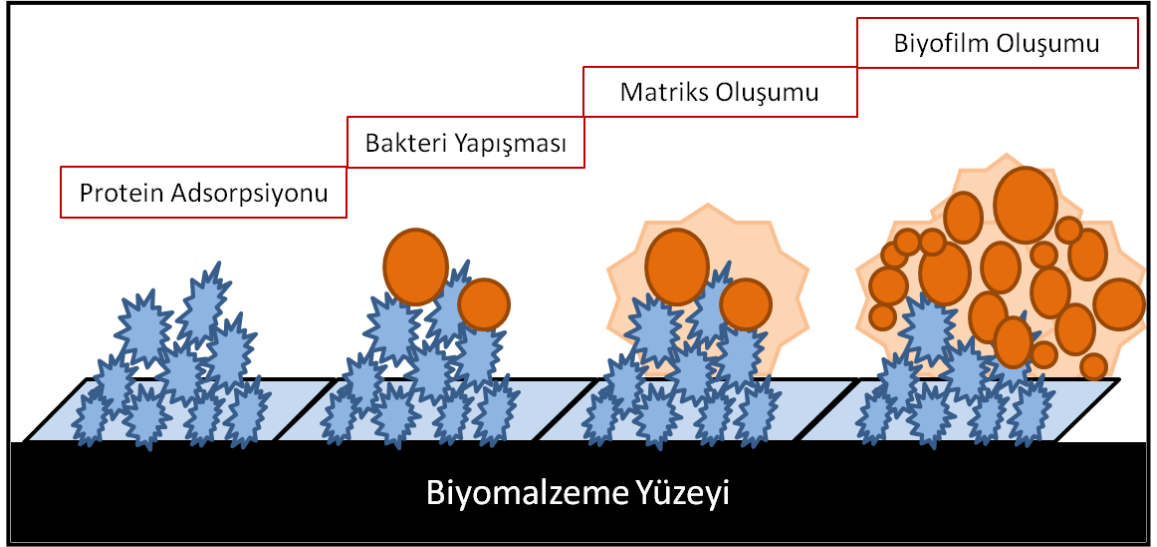
Şekil 2.9 **Gram-pozitif** ve **Gram-negatif** bakterilerin hücre duvarı yapıları (Tortora vd. 2012)

Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarının % 50'si kristal viyole-iyot kompleksini tutma özeliğine sahip çok katı homojen ve yoğun peptidoglikan tabasından oluşmaktadır. Hücre duvarının ağısı ve kat kat peptidoglikandan oluşan yapısı boya parçacıklarını tutmaktadır (Tortora vd. 2012). Oysa **Gram-negatif** bakterilerde bu tabaka çok incedir. Ayrıca **Gram-pozitif** bakterilerin hücre duvarında **Gram-negatif** bakterilerden farklı olarak teikoik asit ve teikuronik asit bulunmakta, bununla beraber **Gram-negatif** bakterilerin hücre duvarında ise murein ağına tutunan lipoprotein, lipopolisakkarit ve lipit oranının çok yüksek olduğu görülmektedir. Sonuç olarak; **Gram-negatif** ve **Gram-pozitif** bakterilerin hücre duvarı farklılıklarının gram-boyama sonuçlarını etkilediği düşünülmektedir (Tunail 2009).

2.4 Biyomalzeme Kaynaklı Enfeksiyonlar

Biyomalzemelerin, kateter, kalp kapakçığı, stent, eklem protezi ve yara örtü malzemesi gibi biyomedikal uygulamalarda kullanımı, biyomalzeme-kaynaklı enfeksiyon problemini de beraberinde getirmektedir (Costa vd. 2011). Bakterilerin biyomalzeme yüzeyi üzerinde tutunarak çoğalmaları ve biyofilm oluşturmaları, antibiyotiklere karşı dirençli hale gelen patojenik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bakterilerin yüzeye tutunması ile başlayan biyofilm oluşumu metaller, seramikler ve polimerler gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılan her çeşit malzeme yüzeyinde gerçekleşebilmektedir (Gristina 1987).

Biyofilm oluşumu birbirini takip eden bir dizi olay sonrasında gerçekleşmektedir. Bunlar sırasıyla mikrobiyal yapışma, mikrokoloni oluşumu ve üreme, matriks üretimi, biyofilmin olgunlaşması ve enfeksiyon oluşumudur (Costa vd. 2011). Bir biyomalzeme vücuda implante edildiğinde, fibronektin gibi ortamda bulunan proteinler ile kaplanmaktadır. Bu proteinler bakteriler için bir hazırlayıcı tabaka görevi görerek bakteri yapışmasını desteklemektedir. Bakterilerin yüzey proteinleri ile etkileşimleri zayıf van der Waals kuvvetleri ile başlamakta ve ilerleyen sürelerde spesifik etkileşimler ile kuvvetlenmektedir. Bakterilerin yüzeye tutunmasının ardından gerçekleşen matriks üretimi ile biyofilm oluşumu tamamlanmaktadır (Gristina 1987) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Biyofilm oluşum mekanizmasının şematik gösterimi

Biyofilm, yüksek yoğunlukta mikroorganizma popülasyonu içeren, mikroorganizmaların ürettiği polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler ve lipitlerden oluşan üç-boyutlu bir matris yapısıdır. Bu matris yapısı, ultra viyole radyasyonu, pH değişimleri, osmotik şok ve akışa karşı direnç göstermekte, antibiyotiklerin ve biyosidal ajanların geçişine izin vermemekte ve standart klinik prosedürler biyofilm oluşumunun ve enfeksiyonun önüne geçilmesinde yetersiz kalmaktadır. Antibiyotikler ile önlenemeyen enfeksiyon sonucunda ise implant biyomalzeme kullanılamaz duruma gelmekte, sağlıklı hücrelerin zarar görmesi doku kayıpları ve ölümle sonuçlanabilmektedir (Hetrick vd. 2006, Vila vd. 2008, Costa vd. 2011). Biyomalzeme yüzeylerinde bakteri kolonizasyonu ve biyofilm oluşumu engellenerek biyomalzeme-kaynaklı enfeksiyonların önüne geçilmesi hedeflenmektedir (Darouchie 2004, Costa vd. 2011).

2.5 Biyomalzeme Kaynaklı Enfeksiyonların Önlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Biyomalzeme-kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi amacıyla, bakterilerin yüzeye tutunmasının engellendiği antimikrobiyal özellikte malzemelerin üretimi için sentetik ve doğal yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu yaklaşımlar aşağıda açıklanmıştır.

2.5.1 Sentetik yaklaşımlar

Antibiyotik adsorpsiyonu gümüş nanopartiküllerin membran yüzeyine kaplanması, hücre yapışmasını engelleyen yapışmaz (*non-fouling*) yüzeylerin elde edilmesi ve antimikrobiyal özellik taşıyan polimerlerden elde edilen doku iskelelerinin kullanımı (Harbers vd. 2007) gibi sentetik yaklaşımların amacı implantasyon öncesinde yüzeylerin patojenik olmayan bakteriler ya da hücreler ile kolonizasyonu (Carvalho 2007) ve yüzeylerin biyosidal ajanlar ya da antibiyotikler ile kaplanmasıdır (Chung vd. 2003, Jose vd. 2005). Sentetik yaklaşımlar kullanılarak elde edilen antimikrobiyal malzemelerin kullanımı, avantajları ve dezavantajları aşağıda sunulmuştur.

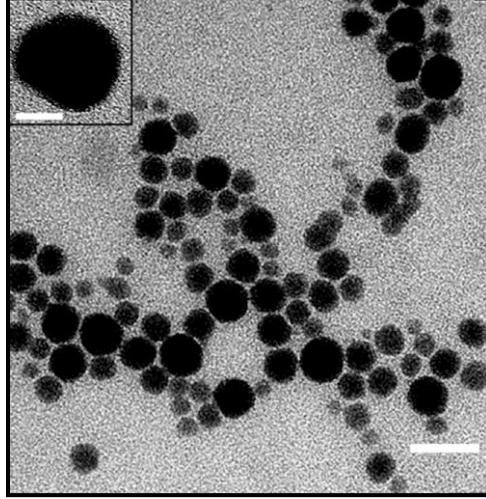
- **Antibiyotikler ile biyomalzeme yüzeyinin kaplanması**

Bu yöntem kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda; membran yüzeyi antibiyotik kullanılarak antimikrobiyal hale getirilmekte ve doku iskelesi mikroorganizmalardan korunmaktadır. Toncheva ve grubu (2012) florokinolon antibiyotiği içeren coPLA nanofibröz membran elde etmişler ve *S.aureus* ile gerçekleştirilen bakteri yapışma testi sonucunda bakteri yapışmasının florokinolin etkisi ile azaldığı sonucuna varmışlardır. Bir diğer çalışmada ise PLGA polimerinde elde edilen malzeme emme tekniği ile sefazolin antibiyotiği ile kaplanmakta ve salım ve antimikrobiyal aktivite testi sonuçlarına göre antibiyotiğin mikroorganizma yapışmasını engellediği, buna karşın antibiyotik salımının ilk 24 saatte gerçekleştiği görülmüştür (Kılıç vd. 2007). Antibiyotiklerin uzun süreli etkiye sahip olamadıkları ve bu nedenle çok gelişmiş bir ilaç salım sistemi ile kullanılmaları gerektiği sonucuna varılmıştır. Ne var ki, klasik antibiyotiklerin kullanımı, seçilen ilacın spektrumu, bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmeleri ve kısa süreli etkileri ile sınırlı kalmaktadır (Costa vd. 2011).

- **Antibiyotik olmayan antimikrobiyal ajanlar ile biyomalzeme yüzeyinin kaplanması**

Mikroorganizmalara karşı biyomalzeme yüzeyinin korunması için farklı bir yaklaşım ise antibiyotik olmayan antimikrobiyal ajanların kullanımıdır. Bu yaklaşımda daha çok gümüş nanopartiküller olarak bilinen fakat farklı metal ve biyouyumlu malzemeleride içeren ajanlar kullanılarak biyomalzemenin yüzeyinin kaplanması ve

antimikrobiyal özellik gösteren biyomalzeme üretimi amaçlanmaktadır (Costa vd. 2011). Bakır, çinko, titanyum, altın gibi metal iyonlarının da antimikrobiyal özellikte olduğu bilinmekle beraber mikroorganizmalara karşı en etkin metalin gümüş olduğu bilinmektedir (Can ve Körlü 2011, Said vd. 2011).



Şekil 2.11 Gümüş nanopartiküllerin TEM görüntüsü

Gümüş bileşiklerinin, mikroorganizma etki mekanizması çok anlaşılamamakla birlikte yapılan son çalışmalarda ağır metallerin hücre duvarı ve hücre zarına bağlandığı, tiyol grupları ile etkileşerek solunum enzimlerini inhibe ettiği ve böylece mikroorganizmaların ölümüne yol açtığı bilinmektedir (Can ve Körlü, 2011). Bunun yanında gümüş nanopartiküllerin vücut içerisinde toksik etki göstermemesi bu yöntemin kullanımı için önemli bir avantajdır (Xue vd. 2011, Said vd. 2011). Ancak yine de FDA' ın 1999 yılında mikro ya da nano partiküller içeren gümüş partiküllerin nörolojik problemlere, baş ağrısına, halsizliğe, mide rahatsızlığına yol açabileceği konusunda uyarıları dikkate alındığında gümüş nanopartiküllerin kullanımı sınırlanmaktadır (Can ve Körlü 2011).

- **Biyomalzeme yüzeyinin yapışmaz (*non-fouling*) hale getirilmesi**

İmplant yüzeyinin fizikokimyasal özellikleri, yüzey pürüzsüzlük enerjisi ve potansiyeli, mikroorganizmaların biyomalzeme yüzeyine yapışması ve büyümesinde önemli rol oynamaktadır. Bu yüzden yapışmaz (*non-fouling*) yüzey yaklaşımında

adsorban protein yapısı ve miktarı, mikroorganizma yapışması ve biyofilm oluşumunu etkilemektedir (Moriarty vd. 2011).

Gerçekleştirilen çalışmalarda; yüzeyin yapışmaz ajanlar ya da antimikrobiyal özellik taşıyan polimerler ile kaplanması sonucunda yapışmaz yüzey elde edilebilmektedir. Cheng ve grubu (2008) gerçekleştirdikleri çalışmada yapışmaz çift kutuplu sulfobetain metakrilat yüzey üzerinde *S. epidermidis* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin yüzeye yapışmalarının % 90' ın üzerinde azaldığı sonucuna varılmıştır. Bununla beraber; bu yöntemde yapışmanın mikroorganizmaya göre farklılık göstermesi, sağlıklı doku hücrelerinin de yüzeye bağlanmasının engellenmesi ve doku entegrasyonunun sağlanamaması gibi kısıtlamalar bulunmaktadır (Costa vd. 2011).

2.5.2 Doğal yaklaşımlar

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sentetik yaklaşımların dışında, doğal bileşenlerin malzeme yapısına katılmasıyla antimikrobiyal yüzeylerin geliştirilmesi konusunda önemli gelişmeler elde edilmiştir. Bakteriyolitik enzimler (Yuan vd. 2011) bitkilerden elde edilen uçucu yağlar (Guarda vd. 2011), antikuarum sensör moleküller (Al-Bataineh vd. 2009) ve antimikrobiyal peptidlerin (Humblot 2009, Hequet vd. 2011) kullanıldığı çalışmalarda, bakteri kolonizasyonunun engellenmesine yönelik olumlu bulgular elde edilmiştir.

• Bakteriyolojik enzimler

Bu yaklaşımda, biyomalzeme yüzeyi bakteriyolojik enzimlerle kovalent bağlanma, plazma birikimi, yüzey adsorpsiyonu gibi yöntemler kullanılarak kaplanmakta ve mikroorganizmaların yüzeye yapışması engellenmektedir. Yapılan çalışmalarda bakteri büyümesini ve çoğalmasını engelleyen hidrolitik enzimler (protoaz, glikosidaz, lizozim vb.) kullanılmaktadır (Yuan vd. 2011). Yuan ve grubu (2011) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada poli(etilen glikol)-metakrilat polimerinin yüzeyi lizozim ile kaplanmış ve bakteri kolonizasyonunda belirgin bir düşüş olduğu gözlenmiştir.

- **Uçucu yağlar**

Bitkilerden elde edilen ve antimikrobiyal özeliğe sahip uçucu yağlar genellikle besin ambalajlarında tercih edilmektedir. Guarda ve grubu (2011) gerçekleştirdiği bir çalışmada timol ve kekik yağları kullanılmış, polipropilen yüzeye antimikrobiyal özellik kazandırılmıştır. Gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite çalışmalarında ise kullanılan uçucu yağların mikroorganizma üreme ve çoğalmasında belirgin bir düşüşe sebep olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla beraber uçucu yağların etki süresinin az olması ve etki süresini arttırmak amacıyla çok iyi bir salım sistemine sahip olması gerekliliği kullanımını kısıtlamaktadır.

Doğal yaklaşımlar arasında antimikrobiyal peptidler, geniş antimikrobiyal spektruma sahip, bakteri kolonizasyonunu engelleyebilen, bakteri direncinin en aza indirildiği, toksik etki göstermeyen ve uzun süre etkisini devam ettirebilecek antimikrobiyal maddeler olarak oldukça ilgi çekmektedir (Glinel vd. 2012).

2.5.3 Antimikrobiyal peptidler

Antimikrobiyal peptidler (AMP), 10-25 amino asit içeren, 1 ila 5 kDa molekül ağırlığına sahip, katyonik karakterde moleküllerdir (van't Hoff vd. 2001). Bakterisidal, fungisidal ve virisidal etkilerinin yanı sıra, çok düşük derişimlerde etkili olabilmektedirler. Bakterilerin bu peptid moleküllerine karşı direnç geliştirme olasılıklarının çok düşük olması da AMPlerin sağladığı diğer bir avantajdır. Çok hücreli mikroorganizmaların bağışıklık sistemlerinde bulunduklarından doğal kaynaklardan izole edilebildikleri gibi sentetik olarak da üretimleri mümkündür (Reddy vd. 2004). AMPlerin etki mekanizması tam olarak açığa kavuşturulmamış olmakla birlikte, fizikokimyasal özelliklerinden dolayı lipid bakımından yoğun ve negatif yüklü lipid grupları içeren bakteri membranı ile etkileşerek hücre duvarını parçalamakta ve bakterilerin ölümüne sebep olduğu düşünülmektedir (Costa vd. 2011). Peptid agregasyonu ya da proteolitik parçalanma sonucu aktivasyon kaybının önüne geçilebilmesi için, AMPlerin yüzeylere kovalent immobilizasyonunun gerçekleştirilmesi düşünülmüş ve AMP immobilizasyonunun antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, biyomalzeme

yüzeyine immobilize edilmiş olan AMP yoğunluğu, ara molekül (*spacer*) kullanımı ve kimyasal immobilizasyon stratejilerinin AMP aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Costa vd. 2011) Haynie ve grubu (1995) tarafından yapılan bir çalışmada, Magainin II antimikrobiyal peptidi, poliamid reçine yüzeylere immobilize edilmiştir. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri suşlarıyla yapılan çalışmada, Magainin II'nin bakterilerin membranları ile etkileşimi sonucu bakterisidal etki gösterdiği bulunmuştur. Paslanmaz çelik yüzeylere AMP immobilizasyonu ile biyofilm oluşumunun incelendiği bir çalışmada, modifiye yüzeylerde bakteri yapışmasının azaldığı sonucuna varılmıştır (Hequet vd. 2011). Willcox ve grubu (2008) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, sentetik bir peptid olan melimine kullanılmış, ticari kontakt lenslerin yüzeyine adsorbe olmuş veya kovalent olarak immobilize edilmiş peptid yapının antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Kovalent immobilizasyon peptid yapısında bulunan serbest amino grupları üzerinden gerçekleştirilmiş ve immobilize haldeki peptid aktivitesinin daha yüksek olduğu, yüzeye adsorbe olan peptidlerin koagüle olarak aktivite kaybına uğradıkları gözlemlenmiştir. Steven ve grubu (2008) tarafından yapılan çalışmalarda, polietilen filmler AMP ile modifiye edilmiş ve *Escherichia coli* üremesinin yavaşladığı bulunmuştur. Literatürde yapılmış çalışmalarda, AMPlerin bir ara molekül varlığında yüzeylere immobilizasyonu ile aktivitesindeki değişim incelenmiştir. Ara molekül kullanılmadığında da aktivite gösterdiği sonucuna varılmış olmasına karşın, kovalent immobilizasyon öncesi yüzeylerin bir ara molekül kullanılarak modifiye edildiği çalışmalar da öne çıkmaktadır. Ara molekül olarak 3000 ila 5400 kDa molekül ağırlığına sahip polietilen (glikol) (PEG) yapılar kullanılmaktadır (Costa vd. 2011) Ara molekülün ucuna bağlanmış olan AMP molekülünün, hareket serbestliği kazanarak bakteri membranı ile daha kolay ve etkin biçimde etkileşebileceği düşünülmektedir. Ayrıca ara molekül olarak kullanılan PEG, yüzeylere yapışmaz özellik kazandırmakta ve PEG kullanımı ile spesifik olmayan protein adsorpsiyonunun önüne geçilebilmektedir. Gabriel ve grubu (2006) tarafından yapılan bir çalışmada LL37 antimikrobiyal peptidinin titanyum yüzeylere immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. PEG varlığında immobilizasyon yapılan yüzeyler *Escherichia coli* bakterileri için ölümcül olurken, PEG kullanılmadan gerçekleştirilen immobilizasyon sonrasında antibakteriyal aktivite gözlenememiştir. Bagheri ve grubu (2009)

tarafından yapılan bir çalışmada farklı uzunlukta PEG kullanımının AMP aktivitesi üzerinde etkili olduğu ve ara molekül uzunluğu azaldıkça aktivitenin düştüğü gözlenmiştir. Diğer yandan, Hilbert ve grubu (2009) tarafından yapılan çalışmalarda ara molekül olmaksızın antibakteriyal aktivitenin sağlandığı görülmüştür. Bu çalışmalar değerlendirildiğinde ara molekül kullanımının biyomalzemenin yüzey özellikleri, immobilizasyon yöntemi ve peptid oryantasyonuna bağlı olarak farklı etkilere sebep olabileceği sonucuna varılmaktadır. Yüzeye immobilize edilmiş olan peptid derişiminin AMP aktivitesi üzerine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde, peptid yoğunluğunun aktivite üzerinde farklı etkilere sebep olabileceği görülmektedir. Glinel ve grubu (2009) tarafından yapılan çalışmalarda, derişimin düşmesiyle Magainin I immobilize edilmiş 2-(2-metoksi etoksi)etil metakrilat yüzeylerde bakterisidal aktivenin azalmadığı sonucuna varılırken, Chen ve grubu (2009) tarafında yürütölen bir diğör çalışmada, yüksek AMP derişimlerinde antibakteriyal aktivitenin arttığı sonucuna varılmıştır. Humblot ve grubu (2009) tarafından yapılan diğör bir çalışmada ise, düşük derişimlerde peptidlerin yalnızca bakteriyostatik bir etkiye neden olduğu belirlenmiştir.

Literatürde yapılmış olan bu çalışmalar değerlendirildiğinde, AMPlerin yüzeylere kovalent immobilizasyonu ile uzun süre kararlılığını koruyan, bakteri kolonizasyonunun önüne geçilerek biyofilm oluşumunun engellendiğı antimikrobiyal aktiviteye sahip biyomalzemeleri elde etmek mümkündür.

Sunulan tez çalışmasında antimikrobiyal peptid olarak kullanılan Magainin II, 23 amino asitten oluşın pozitif yüklü amfipatik özellik taşıyan fosfolipid yapıda bir peptiddir. Magainin II antibiyotiklere benzer özellikler taşımak ile birlikte elektrokimyasal yaklaşım olarak membran üzerinde bulunan bakteri, mantar vb. yapıları parçaladığı halde membran üzerinde bulunan kırmızı kan hücreleri gibi hücresel aktiviteleri engellememektedir. Molekül ağırlığı 2466.9 g/mol olan Magainin II, alfa-heliks sekonder yapıda bir peptiddir. Magainin II, immobilizasyon etkileşimi fosfolipidler üzerinden gerçekleştirmekte olup, membran yüzeyine paralel olarak yönelim göstermektedir (Bechinger vd. 1993). Magainin II'nin amino asit dizilimi şekil 2.12'de verilmiştir.



Şekil 2.12 Magainin II amino asit dizilimi

2.6 Biyoaktif Biyomalzemeler

Biyomalzemelerin, vücut içerisinde enfeksiyon oluşturma, iltihaplanma, lokal doku kaybı, implant enkasülasyonu ve spesifik olmayan protein adsorpsiyonu gibi istenmeyen reaksiyonları önlemek amacıyla, spesifik hücre etkileşimlerini sağlayacak şekilde tasarlanması gerekmektedir. Bu amaçla, biyomalzemelerin hücrelerle olan etkileşimlerini arttıracak büyüme faktörleri gibi sinyal proteinlerin kullanımıyla biyoaktif malzemelerin tasarlanması hedeflenmiştir (Karakeçili 2006).

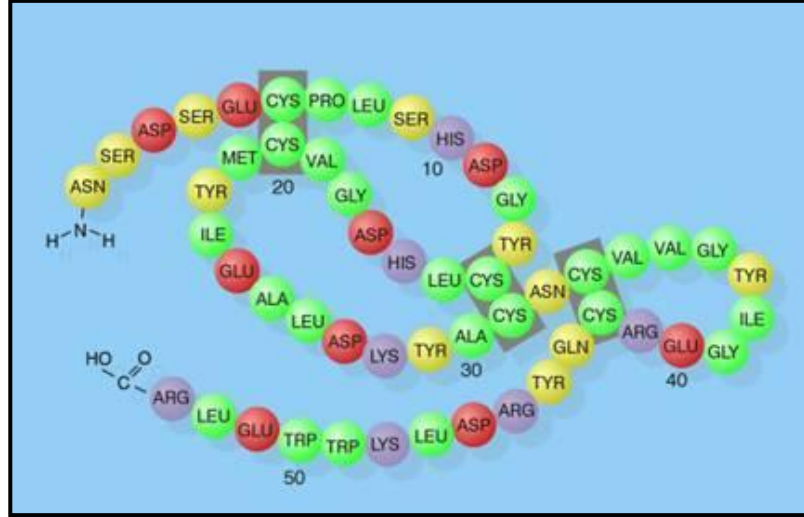
2.6.1 Büyüme faktörleri

Büyüme faktörleri serum bileşiminde çok düşük derişimde (10^{-9} , 10^{-11} M) bulunan ve dokuların büyüme ve gelişiminden sorumlu olan oligopeptid yapısındaki moleküllerdir. Hücre bölünmesi ve farklılaşmasını doğrudan uyaran bu biyosinyal moleküller, hücrel aktivitelere modüle eden mekanizmaların anlaşılması açısından son derece değerli malzemeler haline gelmişlerdir (Ito ve Chen 2001). Büyüme faktörleri hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak hücrelerin farklılaşmasını ve çoğalmasını aktive ederler. Bu sinyal proteinler hücre yüzeyindeki reseptörlerle etkileşerek bir kompleks oluştururlar. Bu kompleks hücre yüzeyi üzerinde bir agregat oluşturduktan sonra hücre içine alınır (internalizasyon) ve burada lizozomlar tarafından parçalanır. Ne var ki, hücrenin çekirdeğine bu sinyallerin iletilmesini sağlayacak mekanizma bugüne kadar aydınlatılamamıştır. Hücre yüzeyi üzerinde gerçekleşen olayların bu sinyal iletimini başlatabileceği düşüncesi, büyüme faktörleri gibi biyosinyal moleküller ile aktifleştirilmiş biyomalzemelerin, hücrel fonksiyonların regülasyonunda etkili olacağını göstermektedir (Ito ve Chen 2001, Karakeçili 2006).

Literatürde farklı dokuların rejenerasyonuna yönelik yapılan çalışmalarda, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), kemik morfojenik proteinleri (BMPs), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi çeşitli büyüme faktörleri kullanılmıştır. Judith ve grubu (2010) tarafından yapılan bir çalışmada PDGF içeren jel yapıda kitosan-kollajen kompozitler hazırlanmıştır. Biyomimetik özellikteki bu matris yapının epitelizasyonu hızlandırarak deride oluşan yaraların iyileşme sürecini kısalttığı sonucuna varılmıştır. Li ve grubu (2009) tarafından yapılan diğer bir çalışmada PDGF yüklü poliüretan doku iskeleleri kullanılmış ve farelerdeki kesik yaraların iyileşmesinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Damak yaralarının tedavisine yönelik olarak, bFGF içeren kollajen-jelatin doku iskeleleri ile gerçekleştirilen bir çalışmada, bFGF yüklü iskelelerin yara iyileşmesini hızlandırdığı ve damarlaşmayı arttırdığı görülmüştür (Ayvazyan vd. 2011). Xie ve grubu (2011) tarafından yürütülen bir çalışmada, aFGF'nün fibroblast hücrelerin üremesini arttırdığı ve diabetik ülserlerin tedavisinde etkin olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Kemik morfojenik proteinleri (BMPs) kemik dokusunun iyileşmesinde ve kırıkta oluşumunda büyük bir öneme sahiptir. Wang ve grubu (2011) tarafından yürütülen bir çalışmada, periosteal öncü hücrelerin osteojenik farklılaşmasında BMP-2'nin etkin olduğu görülmüştür. BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri ile yürütülen bir diğer çalışmada, MC3T3-E1 hücrelerinin osteoblastik farklılaşması incelenmiş ve BMP-6'nın önemli bir role sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Akman vd. 2010).

2.6.1.1 Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

EGF, 53 amino asitten oluşan üç disülfid bağına sahip bir oligopeptittir (Şekil 2.13). Genellikle tükürük bezlerinde bir arjinin esteraz ile kombine olmuş durumda bulunur. Dokularda EGF salımı sinir sistemi kontrolündedir. EGF'in embriyonik ve neonatan aşamada dişlerin çıkması, gözlerin açılması ve deri oluşumu gibi özelliklerinin yanı sıra normal, özellikle de epitelium hücreler üzerinde pek çok etki gösterdiği bilinmektedir.



Şekil 2.13 EGF molekülünün amino asit dizilimi.

<http://www.extension.org>

EGF'in memelilerde bilinen biyolojik aktivitelerinin bazıları şunlardır:

- Epidermis'in oluşumunu, farklılaşmasını artırır ve keratinize olmasını sağlar.
- Fetal pulmoner epitelyum dokusunun büyüme ve olgunlaşmasını hızlandırır.
- Sindirim sistemi mukozasında ornitin dekarboksilaz aktivitesini ve DNA sentezini artırır.
- Korneal epitelyumda yara iyileşmesini, membran proteinlerin fosforilasyonunu hızlandırır.
- Mezodermal ve ektodermal kökenli pek çok hücre tipi için çoğaltıcı etkilere sahiptir.
- Bazı karsinoma tipleri için negatif büyüme etkilerine sahiptir.

EGF, normal ve patolojik yaraların iyileşme sürecinde etkin olduğu bilinen bir büyüme faktörüdür. Keratinosit hücrelerin göçünü hızlandırdığı ve fibroblastik hücrelerin fonksiyonlarını arttırdığı bilinmektedir (Karakçili 2006, Hardwick 2008). PCL ve PCL/J nanofibröz membranlar ile yürütülen bir çalışmada, EGF immobilize edilen nanofiberler üzerinde hücre yayılmasının arttığı ve EGF varlığının hücre çoğalmasını hızlandırdığı görülmüştür. Sonuç olarak EGF içeren PCL/jelatin nanofibröz membranların deri doku mühendisliği uygulamaları için önemli bir alternatif oluşturacağı sonucuna varılmıştır (Tıǧlı vd. 2011).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu bölümde sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ile ilgili bilgi sunulmaktadır. İlk bölümde; elektroegirme tekniği ile nanofibröz yapıdaki membranların hazırlanmasına yönelik çalışmalar açıklanmıştır. İkinci bölümde; Magainin II ile gerçekleştirilen modifikasyon çalışmaları ve modifikasyon öncesi ve sonrasında gerçekleştirilen XPS, AFM ve SEM analizleri ile kantitatif tayine yönelik olarak yapılan floresan spektroskopisi analizlerine yer verilmiştir. Üçüncü bölümde; biyoaktif membranların elde edilmesi amacıyla EGF içeren membranların hazırlanmasına yönelik yapılan çalışmalar ve çift tabakalı membranların hazırlanması için yapılan çalışmalar açıklanmıştır. Son bölümde ise; membranların antimikrobiyal özelliklerinin ve hücre etkileşimlerinin araştırılması amacıyla yürütülmüş olan bakteri yapışması, SEM ve konfokal analizleri ile hücre yapışması ve üremesinin incelendiği hücre kültür çalışmaları ile ilgili deneysel yöntemler açıklanmıştır.

3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Tez kapsamında nanofibröz membran eldesinde kullanılan poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA 85:15, MW: 50-75 kDa) ve jelatin (J) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan hekzafloroizopropanol Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Membranlara antimikrobiyal özellik kazandırılması amacıyla kullanılan Magainin II (MW: 2.47 kDa) ve immobilizasyon işlemlerinde kullanılan 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil)-karbodiimid (EDC) ile N-hidroksi suksinimid (NHS) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Fosfat tampon çözeltisi (pH: 7.4) hazırlamada kullanılan tabletler, 2-(N-morfolino) ethansülfonik asit (MES) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Tez çalışması kapsamında biyoaktif nanofibröz membranların hazırlanmasında kullanılan epidermal büyüme faktörü (EGF, MW: 6.04 kDa), TRIS tampon çözelti tableti ve sığır serum albümin (BSA, MW: 66 kDa) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Tez kapsamında antibakteriyal aktivitenin incelenmesi çalışmalarında kullanılan *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) ve *Escherichia coli* (ATCC 25922) bakterileri için besi ortamı olarak kullanılan Tryptic Soy Agar ve Tryptic Soy Broth Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Bakteri yapışmasının konfokal mikroskobu altında görüntülenmesinde Invitrogen (Almanya) BacLight Bacterial Viability Kit kullanılmıştır. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) ve fetal sığır serum (FBS) Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hücre üremesinin takibinde kullanılan 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-diphenyltetrazolium bromür (MTT) Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Nanofibröz membranlarda hücre yapışması ve üremesinin SEM analizi ile takibi öncesinde hücrelerin yüzeye fiksasyon işlemi için Merck (Almanya) firmasından temin edilen glutaraldehit (%25, v/v) kullanılmıştır.

3.2 PLGA ve PLGA/J Nanofibröz Membranların Hazırlanması

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında kullanılan PLGA ve PLGA/J membranlar elektroğirme tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Uygun çözücülerde çözünen polimerlerden elektroğirme ile nanofiber yapıda membranların elde edilebilmesi için çözücü türü, derişim, uygulanan voltaj değeri, şırınga-toplayıcı mesafesi ve akış hızı parametreleri incelenmiştir. Gelişigüzel yapıda nanofiberlerden oluşan membranlar alüminyum folyo üzerinde toplanmış ve çözücünün uzaklaştırılması amacıyla 1 gün süreyle oda koşullarında bekletilmiştir. İncelenen sistem parametreleri çizelge 3.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1 PLGA ve PLGA/J nanofibröz membranların eldesi için incelenen sistem parametreleri

Polimer	Çözücü	Derişim (w/v)	Akış Hızı (ml sa ⁻¹)	Voltaj (kV)	Toplayıcı Mesafesi (cm)
PLGA	TFE	10	0.4, 0.5, 0.6	8, 9, 10, 11, 12, 13	10, 15
		15			
		20	0.8, 1, 1.5	10, 15, 20	20, 25, 30
	HFIP	10	2	18, 20	10, 20
			4	17	7
				17.5	8.5
				18	10, 15
				20, 22.5, 25	20
			6	17.5	8.5
			8	27.5	35
		12	2	18, 20	10, 20
			4	17	7
				17.5	8
				18	10, 15
				20, 22.5, 25	20
			6	17.5	8.5
			8	27.5	35
		15	2	18, 20	10, 20
			4	17	7
				17.5	8
				18	10, 15, 20
				20	20
				22.5	20, 35
				25	20
				27.5	30
			5	17.5	8.5
			6	17.5	8.5
				27.5	35
			8	22.5, 27.5	35
			12	22.5	35
PLGA/J	HFIP	15 (%13.5 PLGA + %1.5 J)	4	18	10

3.3 PLGA ve PLGA/J Nanofibröz Membranlara Magainin II İmmobilizasyonu

Elektroeğirme tekniği ile elde edilen PLGA ve PLGA/J membranlara Magainin II (Mag II) immobilizasyonu kimyasal yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. 70 mm çaplı cam Petrilere alınan membranlar öncelikle 10 mM EDC/NHS içeren 0.1 M MES tampon çözeltisinde (pH: 5.5) 5 saat süreyle karanlık ortamda bekletilmiş ve karboksilik asit gruplarının aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Aktivasyon işlemi sonrasında membranlar iki kez PBS (pH: 7.4) çözeltisi ile yıkanmıştır. Ardından, PBS içerisinde hazırlanan Mag II çözeltisinde (0.025 mg ml^{-1}) 12 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilerek immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. PBS ile yıkama işleminin ardından membranlar oda koşullarında kurutulmuş ve desikatörde saklanmıştır (**PLGA-Mag II** ve **PLGA/J-Mag II**).

3.4 PLGA ve PLGA/J Nanofibröz Membranların Karakterizasyonu

Çalışma kapsamında hazırlanan **PLGA**, **PLGA-Mag II**, **PLGA/J**, **PLGA/J-Mag II**, membranların karakterizasyon çalışmaları aşağıda açıklanan yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.1 *Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance* (FTIR-ATR) spektroskopisi

Elektroeğirme tekniğiyle hazırlanan **PLGA** ve **PLGA/J** membranların yüzey kimyasal bileşenlerinin analiz edilmesi amacıyla, yüzey infrared spektrumları FTIR-ATR spektrofotometresi (ATR-FTIR, Thermo Scientific Nicolet iS10) ile incelenmiştir. Spektrumlar 4 cm^{-1} çözünürlükte, $800\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında kaydedilmiştir.

3.4.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi

Çizelge 3.1’de belirtildiği şekilde farklı sistem parametrelerine göre yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen nanofiber yapıdaki membranların fiziksel özellikleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, FEI Quanta 200 FEG, USA) ile analiz edilmiştir. Nanoyapıdaki fiberlerden oluşan membranların fiziksel yapısının (çap)

incelenmesi amacıyla yapılan analizlerde örneklerin yüzeyi altın-palladyum ile kaplandıktan sonra SEM görüntüleri alınmıştır. SEM görüntülerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda PLGA ve PLGA/J membranların üretim koşulları belirlenmiştir. PLGA ve PLGA/J membranlar Mag II immobilizasyonu sonrasında da SEM ile analiz edilmiş ve modifikasyon işlemlerinin fiber morfolojisi üzerine olan etkileri incelenmiştir.

3.4.3 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) analizi

Tez kapsamında hazırlanan membranları oluşturan fiberlerin detaylı morfolojik karakterizasyonu amacıyla Mag II modifikasyonu öncesi ve sonrasında AFM analizleri yapılmıştır (AFM, Vecoo MultiMode V). Yüzey görüntüleri silikon kantilever kullanılarak *non-contact* (temazsız) koşullarında alınmıştır. Ölçümler 5 μm^2 ve 500 nm^2 'lik karesel bölgelerde gerçekleştirilmiştir. Yüzeylerin ortalama pürüzlülük değerleri (R_a), cihazda bulunan standart programlar kullanılarak seçilen 500x500 nm^2 'lik alanlarda hesaplanmıştır. Mag II immobilizasyonu sonrasında nanofiber yapı üzerinde oluşan faz farkı 500x500 nm^2 'lik karesel bölgeden elde edilen görüntüler kullanılarak incelenmiştir.

3.4.4 X-ışınları Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) analizi

Nanofibröz membranların yüzey atomik bileşimi XPS (Versa Probe, PHI 5000) analizi ile kantitatif ve kalitatif olarak tayin edilmiştir. Analiz Al monokromatik anot kullanılarak yapılmıştır. Yüzeylere elektron çarpma açısı 45° olarak belirlenmiştir. Bu açıyla yapılan analizde örnek derinliği 0-10 nm aralığındadır. Geniş spektrumların elde edilebilmesi için elektron geçiş enerjisi 187.5 eV'dir. Örneğin bulunduğu hücrenin vakumu analiz sırasında 10^{-8} mbar değerinin altında tutulmuştur.

3.4.5 Yüzeye immobilize olan Magainin II miktarının tayini

Tez çalışması kapsamında hazırlanan **PLGA** nanofibröz membranların yüzeyine immobilize olan Mag II miktarı floresan spektroskopisinde (Varian Carry, Avustralya) peptidin fenil alanin uçlarından izlenerek tayin edilmiştir. Uyarılma

(λ_{uy}) ve emisyon (λ_{em}) dalga boylarını belirlemek amacıyla pH=7.4'de PBS tamponu ile Mag II stok çözeltisi hazırlanmıştır. Kuartz küvetlere aktarılan Mag II çözeltisinin uyarılma dalga boyu 260 nm'de sabit tutularak emisyon spektrumu 270 - 350 nm aralığında taranmıştır. Tarama sonucu Mag II için maksimum emisyon dalga boyu 290 nm olarak bulunmuştur. Emisyon dalga boyu 290 nm'de sabit tutularak, uyarılma dalga boyu için 220 - 350 nm arasında maksimum dalga boyu taraması yapılmış ve bu değer 260 nm olarak gözlenmiştir. İmmobilizasyon işlemi sonrasında membran üzerinden alınan çözeltinin floresan şiddeti ölçülerek yüzeye immobilize olan miktar indirekt olarak hesaplanmıştır. Floresan şiddetinin Mag II miktarı ile orantılı olan değişimini belirlemek amacıyla bilinen derişimlerde hazırlanan Mag II çözeltileri kullanılarak kalibrasyon grafiğı elde edilmiştir.

3.5 EGF İçeren PLGA Nanofibröz Membranların Hazırlanması

Çalışma kapsamında biyoaktif tabakayı oluşturmak üzere hazırlanan ve EGF içeren **PLGA** ve **PLGA/J** membranların üretiminde elektroğirme tekniğı kullanılmıştır. HFIP içerisinde hazırlanan polimer çözeltilerine belirlenen miktarda EGF içeren Tris tampon çözeltisi (pH: 6.0) eklenerek karıştırılmıştır. Elektroğirme ile biyoaktif ajan içeren nanofibröz yapıda membranların elde edilebilmesi için polimer derişimi, EGF çözeltisi miktarı, uygulanan voltaj değeri, şırınga-toplayıcı mesafesi ve akış hızı parametreleri incelenmiştir. Gelişigüzel yapıda nanofiberlerden oluşan membranlar alüminyum folyo üzerinde toplanmış ve çözücünün uzaklaştırılması amacıyla 1 gün süreyle oda koşullarında bekletilmiştir. İncelenen sistem parametreleri çizelge 3.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2 **PLGA-EGF** ve **PLGA/J-EGF** nanofibröz membranların eldesi için incelenen sistem parametreleri

Polimer	Derişim (%w/v)	EGF içeren *TRIS Çözeltilisi (µl)	Akış Hızı (ml sa ⁻¹)	Voltaj (kV)	Toplayıcı Uzaklığı (cm)
PLGA	16.6	150	1, 2, 3, 3.5, 4, 4.5	17, 18, 19, 20, 21, 22	10
			5, 5.5	19, 20, 21, 22, 23	15
					20
					15
	18.3	150	1, 2, 3, 3.5, 4, 4.5	18, 19, 20, 21, 22	10
			5, 5.5	19, 20, 21, 22, 23	15
					20
					15
	19.6	150	2, 3, 3.5, 4, 4.5	18, 19, 20, 21, 22	10
			5, 5.5	19, 20, 21, 22, 23	15
					20
					15
		125	3, 3.5, 4, 5	19, 20, 21, 22	15
		100	3.5, 4	19, 20, 21	15
PLGA/J	15 (%13.5 PLGA + %1.5 J)	100	4	18	10

* %0.1 BSA içermektedir.

3.6 EGF İçeren Nanofibröz Membranların Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında hazırlanan ve EGF içeren biyoaktif nanofibröz membranların karakterizasyon çalışmaları aşağıda açıklanan yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi

EGF içeren **PLGA** ve **PLGA/J** biyoaktif membranların morfolojik yapılarının tayini amacıyla yapılan SEM analizi bölüm 3.4.2’de açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.6.2 Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) analizi

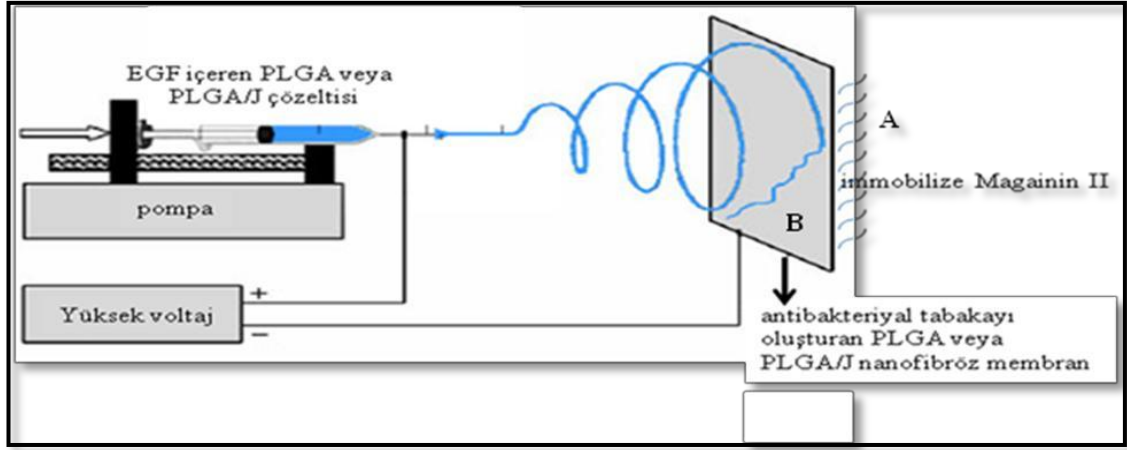
PLGA-EGF nanofibröz membranlarda yapıya katılan EGF moleküllerini tayin etmek amacıyla TEM (FEI Tecnai G² Spirit BioTwin CTEM Mikroskop) analizleri gerçekleştirilmiştir. EGF içeren PLGA nanofiberler analiz öncesi *grid* tabakalar üzerinde toplanmıştır.

3.6.3 Floresan Mikroskobu Analizi

Biyoaktif **PLGA-EGF** nanofibröz membranlar floresan mikroskobu (Olympus, IX71) altında incelenmiştir. Floresan mikroskobundan alınan görüntülerin değerlendirilmesi amacıyla EGF içermeyen PLGA nanofibröz membranlardan elde edilen görüntüler kontrol olarak kullanılmıştır.

3.7 Çift Tabakalı Antimikrobiyal Biyoaktif Nanofibröz Membranların Hazırlanması

PLGA ve **PLGA/J** membranlara Magainin II immobilizasyonu ile elde edilen antimikrobiyal aktiviteye sahip ilk tabakanın hazırlanmasının ardından, EGF içeren PLGA veya PLGA/J nanofiberler, biyoaktif özellik gösterecek ikinci tabakayı oluşturmak üzere antimikrobiyal tabakanın üzerinde elektroegirme tekniğiyle toplanmıştır. Çift tabakalı membranların elektroegirme ile üretimi şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1 Çift tabakalı antimikrobiyal biyoaktif nanofibröz membranların elektroegirme tekniği ile üretimi

3.7.1 Çift Tabakalı Nanofibröz Membranlardan EGF Salımının İncelenmesi

Şekil 3.1’de açıklanan şekilde üretilen çift tabakalı membranlardan EGF salımının takibi Enzim-bağlı immünoenzimatik analiz yöntemiyle (ELIZA) gerçekleştirilmiştir. 1.5 cm çapındaki çift tabakalı membranlar 37°C’de PBS içerisinde 100 rpm çalkalama hızında salım ortamına alınmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında salım ortamından alınan örnekler -20°C’de dondurularak saklanmıştır. ELIZA analizi sonunda kümülatif EGF salım miktarı zamana karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.8 Su Temas Açısı Tayini

PLGA, PLGA-Mag II, PLGA-EGF, PLGA/J, PLGA/J-Mag II ve PLGA/J-EGF membranların ıslatılabilirlik özellikleri su temas açısı ile tayin edilmiştir. Temas açısı ölçümleri Kruss DSA 100 (Almanya) ganyometre sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapışık damla yöntemi ile ölçülen su temas açısı değerleri Kruss DSA 100 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.9 Denge Su İçeriği Tayini

PLGA-Mag II+PLGA-EGF ve PLGA/J-Mag II+PLGA/J-EGF membranların su tutma kapasitesini belirlemek amacıyla şişme deneyleriyle gerçekleştirilmiştir. Kuru ağırlıkları belirlenen (W_0) nanofibröz membranlar 37°C'de 3 ml PBS (pH 7.4) içerisine alınmıştır. Örnekler belirli zaman aralıklarında (0.5, 1, 3, 6, 24, 48 saat) ortamdan uzaklaştırılarak ağırlıkları belirlenmiştir (W_s) Örneklerin su tutma oranı Eşitlik 3.1 kullanılarak kuru temelde hesaplanmıştır. Çalışmalar üç paralel örnek ile yürütülmüştür.

$$\% Su Tutma = \frac{W_s - W_0}{W_0} * 100 \quad (3.1)$$

Hesaplanan su tutma değerleri $\pm$ standart sapma değerleriyle verilmiştir.

3.10 Antimikrobiyal Aktivitenin İncelenmesi

Antimikrobiyal aktivitenin incelendiği çalışmalar aşağıda belirtilmiş olan üç farklı gruptaki nanofibröz membranlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

I. Grup: Magainin II ve EGF içermeyen **PLGA** ve **PLGA/J** membranlar (kontrol grubu)

II. Grup: Magainin II immobilize edilerek antimikrobiyal özellik kazandırılmış EGF içermeyen membranlar: **PLGA-Mag II** ve **PLGA/J-Mag II**

III. Grup: EGF içeren PLGA ve PLGA/J nanofiberlerden oluşan biyoaktif tabakanın Magainin II immobilize edilmiş olan ilk tabaka ile birleşiminden oluşan çift tabakalı antimikrobiyal biyoaktif membranlar : **PLGA-Mag II+PLGA-EGF** ve **PLGA/J-Mag II+PLGA/J-EGF**

Antimikrobiyal aktivitenin incelenmesi Gram-pozitif *S. aureus* (ATCC 6538) ve Gram-negatif *E. coli* (ATCC 25922) bakteri suşları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *S. aureus* ve *E. coli* bakteri suşları Tryptic Soy Broth besi ortamında inkübatörde 37°C'de kültüre edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin incelenmesi amacıyla

gerçekleştirilen çalışmalar laminar akış kabin (Berner B Max-Pro, Almanya) içerisinde yürütülmüştür.

3.10.1 Nanofibröz membranlara bakteri yapışmasının koloni sayımı ile incelenmesi

Bölüm 3.10'da açıklanan şekilde gruplanan nanofibröz membranlar 30 dakika süre ile UV altında sterilizasyon işlemine tabi tutulmuş ve daha önceden %70 etanol içerisinde bekletilerek steril edilmiş teflon kalıplar içerisinde 24 gözlü Petri kaplarına yerleştirilmiştir. Bir gece süreyle besi ortamında üretilmiş olan bakteri suşları santrifüj tüplerine alınarak 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Steril PBS ile seyreltilen bakterilerin UV absorbansı ölçülmüş ve 600 nm dalga boyunda absorbansı 1.0 olacak şekilde ayarlanmıştır (10^9 CFU ml⁻¹). Elde edilen bakteri süspansiyonu PBS ile 100 kat seyreltilmiş (10^7 CFU ml⁻¹) ve 24 gözlü Petri kaplarında bulunan her bir örnek üzerine 1 ml eklenerek 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 30 rpm'de 4 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda örnekler iki kez steril PBS ile yıkanmış ardından 1 ml PBS içerisinde 3 dakika süre ile sonikasyon işlemine (Elmasonic S 70 H, 37 kHz, Almanya) tabi tutulmuştur. Bu işlem sonunda yüzeye tutunmuş olan bakterilerin yüzeyden koparılması sağlanmış ve elde edilen bakteri süspansiyonu 10, 100 ve 1000 kat seyreltilmiştir. Her bir seyreltilmiş örnekten 0.1 ml alınarak agar ortamına aktarılmış ve 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından bakteri kolonilerinin sayımı gerçekleştirilmiştir.

3.10.2 Antimikrobiyal aktivitenin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile analizi

Bölüm 3.10.1'de açıklanan şekilde nanofibröz membran grupları üzerinde inkübe edilen bakterilerin SEM analizi öncesinde yüzeye fiksasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. SEM analizi 4 saat ve 24 saatlik inkübasyonlar sonrasında gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik bakteri yapışmasının incelendiği çalışmalarda ise, bakteri süspansiyonu Tryptic Soy Broth içerisinde hazırlanmış ve 24 gözlü petri kaplarında her bir örnek üzerine 1 ml eklenerek 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 30 rpm'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Belirlenen inkübasyon süreleri sonrasında membranlar PBS ile yıkanmış ve % 2.5'lik (v/v) glutaraldehit (Sigma, Almanya)

çözeltilisinde 4°C’da 2 saat süreyle fiksasyon işlemine tabi tutulmuştur. Membranlar PBS ile gerçekleştirilen yıkamanın ardından bir kez deionize su ile yıkanmış ve dondurarak kurutma cihazında 1 gün boyunca kurutulmuştur. Fiksasyon işleminin ardından membranlar bölüm 3.4.2’de açıklanan şekilde SEM altında görüntülenmiştir.

3.10.3 Antimikrobiyal aktivitenin Konfokal Mikroskobu ile analizi

Bölüm 3.10.1’de açıklanan şekilde nanofibröz membran grupları üzerinde inkübe edilen bakterilerin konfokal mikroskobunda görüntülenmesi amacıyla BacLight Bacterial Viability Kit (ABD) kullanılmıştır. Kit içeriğinde bulunan Syto 9 ve propidyum iyodür (PI) boyama işleminde kullanılmak üzere fizyolojik çözelti (% 0.9 NaCl içeren saf su, w/v) içerisinde sırasıyla 4000 ve 3000 kat seyreltilmiş ardından 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak floresan boyama çözeltisi hazırlanmıştır. Nanofibröz membranlara tutunan bakterilerin boyama işlemi 4 saatlik inkübasyon sonunda gerçekleştirilmiştir. Bakteriler ile inkübasyonun ardından nanofibröz membranlar iki kez fizyolojik çözelti ile yıkanmış ve hazırlanan boya çözeltisinden her bir membran üzerine 300 µl eklenerek 15 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. Bu işlemin ardından membranlar üç kez beşer dakika süreyle fizyolojik çözelti ile yıkanmış ve fazla boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Lamel arasına sıkıştırılan membranlar bekletilmeden konfokal mikroskobu altında görüntülenmiştir.

3.11 L929 Fare Fibroblastları ile Hücresel Aktivitenin İncelenmesi

Hücresel aktivitenin incelendiği çalışmalar bölüm 3.11’de açıklanan gruplar nanofibröz membranlar ile Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü’nde bulunan Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu’na ait Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür.

L929 fare fibroblast hücreleri %10 (v/v) FBS ve %1 penisilin içeren DMEM ortamında kültüre edilmiştir. Çalışmada kullanılan nanofibröz membranlar UV altında steril edildikten sonra parafilm kaplanmış 24 gözlü Petri kaplarına yerleştirilmiştir. Her bir göze hücre yoğunluğu 5×10^4 hücre ml^{-1} olan hücre süspansiyonundan 1’er ml eklenmiştir. İnkübasyon işlemleri 37°C’de, %95 nem, %5 CO₂ ve %95 hava

içeriğine sahip CO₂ inkübatöründe (Heraus Instruments,Almanya) gerçekleştirilmiştir. Steril ortam gerektiren tüm işlemler laminar akış kabini (Bioair, Type II, İtalya) yürütülmüştür.

Membranlar üzerindeki hücresel aktivitenin belirlenmesine yönelik çalışmalar, hücre yapışması, hücre üremesi ve hücrelerin morfolojilerinin tayini amacıyla SEM altında görüntüleme olmak üzere iki grupta yürütülmüştür. İlk olarak, nanofibröz membranlar üzerindeki erken dönem membran-hücre etkileşmesinin incelenmesi amacıyla, 4 saatlik inkübasyon sonunda yüzeye tutunan hücre miktarı belirlenmiştir. Membranlar üzerinden alınan hücre süspansiyonundaki hücre sayısı hemositometrik sayım yöntemiyle tayin edilmiş ve başlangıç hücre miktarına göre yüzde (%) tutunma değerleri Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ hücre tutunması} = \frac{H - H_0}{H_0} * 100 \quad (3.2)$$

Ayrıca 4 saatlik yapışma sonunda yüzeye tutunan hücreler %2.5'lik (v/v) glutaraldehit ile 30 dakika oda sıcaklığında fiksasyon işlemine tabi tutulmuştur. PBS ve distile su ile yapılan yıkamanın ardından liyofilizatörde dondurularak kurutulan örnekler altın-palladyum ile kaplanarak SEM altında görüntülenmiştir. Nanofibröz membranlar üzerindeki hücre canlılığı ve üremesi MTT testi ile belirlenmiştir. Bu analizde canlı hücrelerin mitokondrisi MTT bileşenini indirgeyerek formazan kristallerine dönüştürmektedir. Oluşan bu kristallerin çözünmesi ile ortaya mor renkli bir çözelti çıkmakta ve bu çözeltinin absorbans değeri ölçülerek üremesini devam ettiren canlı hücre miktarı kantitatif olarak tayin edilmektedir. 1, 3 ve 5. günlerin sonunda, kültür ortamı uzaklaştırılmış ve her bir örneğe 60 µl MTT çözeltisi ve 600 µl serumsuz kültür ortamı eklenerek 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda membranlar üzerindeki ortam uzaklaştırılmıştır. Formazan kristallerini çözmek amacıyla her bir göze 400 µl 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenmiştir. Optik yoğunluk 200 µl süpernatant alınarak, 690 nm referans olmak üzere 540 nm'de mikropate okuyucu (Asys UVM 340) ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Hücrelerin nanofibröz membranlar üzerindeki morfolojilerinin, yapışma ve yayılma eğilimlerinin belirlenmesi için 2. gün sonunda SEM analizi yapılmıştır. %2.5'lik (v/v) glutaraldehit ile 30 dakika oda sıcaklığında fiksasyon işlemine tabi tutulan hücreler PBS ve distile su ile yapılan yıkamanın ardından liyofilizatörde dondurularak kurutulmuş ve SEM analizi öncesi altın-palladyum ile kaplanmıştır.

L929 fare fibroblast hücrelerin nanofibröz membranlar üzerindeki aktin filament yapısı floresan mikroskobu altında incelenmiştir. 2. gün sonunda kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler %2.5'lik (v/v) glutaraldehit ile 30 dakika oda sıcaklığında fiksasyon işlemine tabi tutulmuştur. Hücre geçirgenliğini arttırmak amacıyla % 0.1 Triton-X (w/v) ile 5 dakika süreyle muamele edilmiştir. Ardından F-aktin boyaması için Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen) içinde 20 dakika süreyle karanlıkta bekletilmiştir. %0.1'lik (w/v) BSA çözeltisi ile yıkama işlemi yapılarak bağlanmayan boya uzaklaştırılmıştır. Sonrasında hücre çekirdeğinin boyanması amacıyla propidyum iyodür (PI) içerisinde bekletilmiştir. %0.1'lik (w/v) BSA çözeltisi ile yıkama işleminin ardından floresan mikroskobu altında gözlemlenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu bölümde öncelikle sunulan tez çalışması kapsamında hazırlanan çift tabakalı membraların ilk tabakasını oluşturan PLGA ve PLGA/J membranların hazırlanması ve bu membranlara antimikrobiyal özellik kazandırılması ile ilgili deneysel çalışmaların sonuçları sunulmuştur. İkinci bölümde çift tabakalı membranın ikinci tabakası olan EGF içeren PLGA ya da PLGA/J membranların hazırlanması ve bu membranların karakterizasyon çalışmaları verilmiştir. Son olarak elde edilen çift tabakalı membranların *in vitro* ortamda gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite ve hücre kültürü ile ilgili deneysel çalışmaların sonuçları sunulmuş ve elde edilen bulgular üzerinde tartışmalar yapılmıştır.

4.1 PLGA ve PLGA/J Nanofibröz Membranların Hazırlanması

PLGA nanofibröz membranların elektroegirme tekniği ile hazırlanması çalışmalarında çizelge 3.1’de belirtilen şekilde farklı derişimlerde PLGA çözeltileri kullanılmış, akış hızı, voltaj ve toplayıcı mesafesinin gelişigüzel yapıda fiber oluşumu üzerine olan etkileri incelenmiştir.

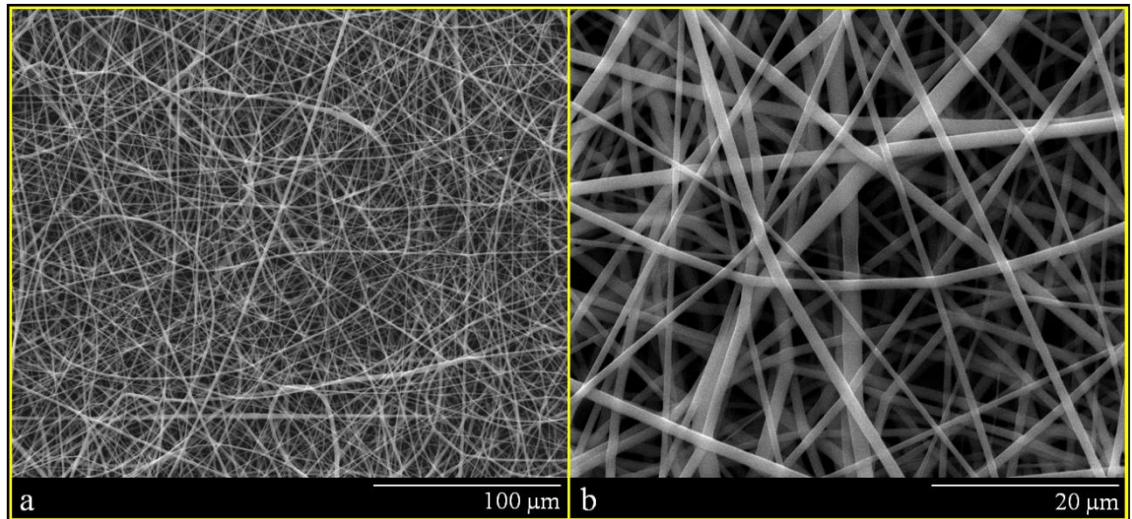
PLGA nanofiberlerin eldesi için öncelikle %10’luk (w/v) PLGA çözeltisi TFE içerisinde hazırlanmış ve çizelge 3.1’de belirtilen koşullarda çalışmalar gerçekleştirilmiştir. %10 polimer derişiminde belirlenen koşullarda fiber oluşumu gözlenmemiştir. Polimer derişimi %15 (w/v) değerine çıkarıldığında, 0.4 ml sa⁻¹ akış hızında 8kV voltaj değerinde 10 cm toplayıcı mesafesinde yapılan çalışmalarda elde edilen nanofiber yapılarda sarmal yapıların ve boncuk oluşumunun fazla olduğu gözlenmiştir. Uygulanan voltaj değeri ve toplayıcı mesafesi arttırıldığında sarmal yapılarda ve boncuk oluşumunda azalma gözlenmemiştir. Akış hızı 0.6 ml sa⁻¹ değerine çıkarıldığında 8-13 kV voltaj değeri aralığında ve 10-15 cm toplayıcı uzaklığında yapılan çalışmalarda sarmal yapılar ve boncuk oluşumu engellenememiştir. Polimer derişimi %20 (w/v) değerine çıkarıldığında boncuklanma ve sarmalanmanın devam ettiği ve elde edilen fiber kalınlıklarının arttığı gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda kullanılan TFE çözücüsünün uygun olmadığı düşünülerek, çalışmalara HFIP çözücüsü ile devam edilmesine karar verilmiştir.

HFIP içerisinde %10 (w/v) PLGA derişimi ile yürütölen çalışmalarda, sırasıyla 2, 4, 6 ve 8 ml sa⁻¹ akış hızı değeriinde çalışmalar yapılmıştır. 2 ml sa⁻¹ akış hızında gerçekleştirilen çalışmalarda, uygulanan voltaj değeri 18 kV ile 20 kV olarak değıştirilmiştir. Her bir voltaj değeri için toplayıcı mesafesi 10 cm ile 20 cm olarak belirlenmiştir. Elde edilen nanofiberlerde boncuklanma ve sarmal yapıların yanısıra fiber yapılarda kopmalar olduğu gözlenmiştir. Toplayıcı mesafesinin ve voltajın değıştirilmesinin nanofiber yapıların düzgün bir şekilde elde edilmesinde olumlu bir etkisi olmamıştır. Bu sonuçlar doğrutusunda akış hızının arttırılmasına karar verilmiştir. 4 ml sa⁻¹ akış hızında 17 kV ile 20 kV voltaj aralığında, 7 cm ile 20 cm aralığında gerçekleştirilen elektroğirme işlemleri sonunda elde edilen nanofiber yapılarda hem sarmalanmanın hem de boncuk oluşumunun azaldığı görölmüştür. 4 ml sa⁻¹ akış hızında yapılan çalışmalarda uygulanan voltajın 20 kV değeriinin üzerinde olduğu durumlarda sarmal yapıların çoğaldığı gözlenmiştir. Akış hızı sırasıyla 6 ml sa⁻¹ ve 8 ml sa⁻¹ değeriine çıkarıldığında ise, boncuk oluşumu tamamen önlenemezken, fiber çaplarının kalınlaştığı görölmüştür. Elde edilen bu sonuçlar doğrutusunda, %10 polimer derişiminde istenilen özellikte fiber üretimi için optimum koşulların sağlanamayacağı düşünölmüş ve polimer derişiminin arttırılmasına karar verilmiştir. %12 (w/v) PLGA derişiminde, 2 ml sa⁻¹ akış hızında gerçekleştirilen çalışmalarda boncuk oluşumunda azalma gözlenirken sarmal yapıların korunduğu görölmüştür. Akış hızı 4 ml sa⁻¹ değeriine çıkarılmış, uygulanan voltaj değeri 17 kV ile 25 kV aralığında, toplayıcı mesafesi ise 7 cm ile 20 cm aralığında değıştirilmiştir. Tüm alışma koşullarında elde edilen nanofiber özelliklerinde, %10 PLGA derişimine kıyasla azalan oranda sarmalanma ve boncuk oluşumu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar doğrutusunda polimer derişiminin arttırılmasına karar verilmiştir.

HFIP içerisinde %15 (w/v) derişimde hazırlanan PLGA özeltisi ile yürütölen elektroğirme tekniğinde akış hızı 2 ml sa⁻¹ ile 12 ml sa⁻¹ aralığında değıştirilmiştir. 2ml sa⁻¹ akış hızında yürütölen çalışmalarda, sarmalanmanın ve boncuk oluşumunun önemli ölçüde azaldığı görölmüştür. Akış hızı 4 ml sa⁻¹ değeriine çıkarıldığında, 20 kV değeriinin üzerindeki voltaj değeriinde sarmal yapıların arttığı görölürken, uygulanan voltajın artması ile yapıda kopmalar meydana geldiğı ve fiber çaplarının kalınlaştığı gözlenmiştir. 20 kV üzerindeki voltaj değeriilerinin 4 ml sa⁻¹ akış hızı için uygun

olmadığı sonucuna varılmıştır. Uygulanan voltaj değeri 20 kV'a düşürüldüğünde ve toplayıcı mesafesi 20 cm olduğunda sarmalanmanın azaldığı fakat boncuk oluşumunun engellenemediği görülmüştür. 4ml sa⁻¹ akış hızında 18 kV voltaj değerinde yapılan çalışmalarda toplayıcı mesafesi 10 cm ile 20 cm aralığında değiştirilmiştir. Toplayıcı mesafesi azaldıkça sarmal yapıların azaldığı gözlenmiştir. 4 ml sa⁻¹ akış hızında 18 kV voltaj değerinde ve 10 cm toplayıcı mesafesinde yapılan çalışmalarda, elde edilen nanofiberlerde boncuk oluşumuna rastlanmamış sarmal yapıların ise minimum düzeyde olduğu gözlenmiştir. Uygulanan voltaj değeri ve toplayıcı mesafesi düşürüldüğünde ise sarmal yapı gözlenmezken, boncuk oluşumu artmıştır. Akış hızı artırılarak yapılan çalışmalarda ise istenilen fiber yapısı elde edilememiş, fiber çaplarında artış gözlenmiştir.

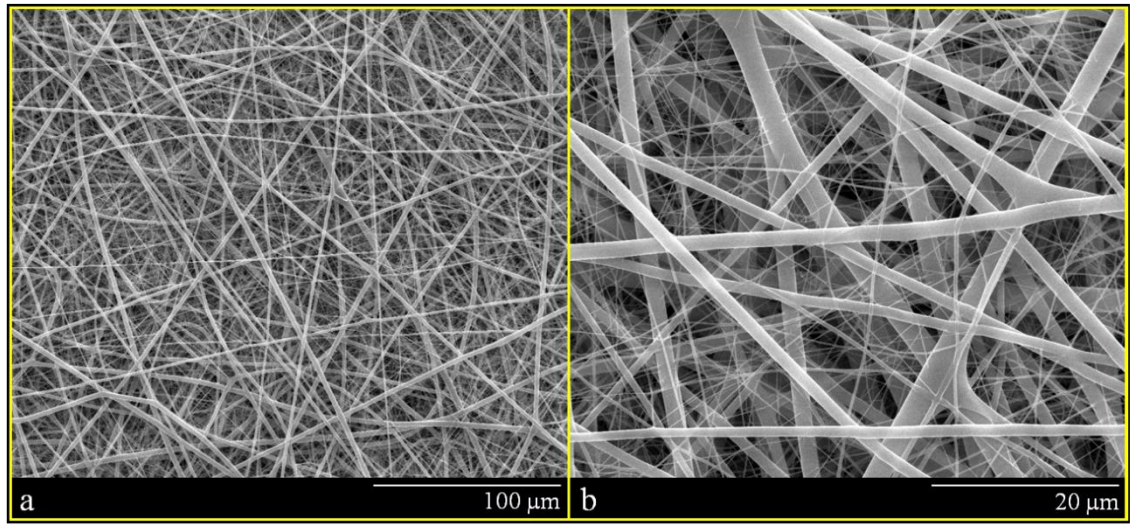
Bu sonuçlar doğrultusunda PLGA nanofibröz membranların elektroğirme tekniği ile elde edilmesi için en uygun koşulların 4 ml sa⁻¹ akış hızı, 18 kV voltaj ve 10 cm toplayıcı mesafesi olduğuna karar verilmiştir. Bu koşullarda elde edilen PLGA membranlara ait SEM görüntüleri şekil 4.1'de verilmiştir. Membranları oluşturan fiberlerin çap dağılımı JmicroVision (İsviçre) programı yardımıyla hesaplanmış ve ortalama 715±45 nm olarak bulunmuştur. Elektroğirme tekniği ile elde edilen membranların kalınlığı 50±10 µm olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.1 PLGA nanofibröz membranlara ait SEM görüntüleri

(%15 PLGA, 4ml sa⁻¹ akış hızı, 18 kV voltaj, 10 cm toplayıcı uzaklığı) a. x1000, b. x5000, ortalama çap: 715±45 nm

PLGA/J (9:1) membranların elde edilmesine yönelik yapılan çalışmalarda, çizelge 3.1’de de belirtildiği şekilde PLGA nanofibröz membranların üretim koşullarına benzer olarak, 4 ml sa⁻¹ akış hızında, 18 kV voltaj değerinde ve 10 cm toplayıcı mesafesinde elektroğirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda elde edilen PLGA/J membranlara ait SEM görüntüleri şekil 4.2’de verilmiştir. Membranlardaki fiber çap dağılımı JmicroVision (İsviçre) programı yardımıyla hesaplanmış ve ortalama 625±225 nm olarak bulunmuştur. Elektroğirme tekniği ile elde edilen membranların kalınlığı 50±5 µm olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.2 PLGA/J nanofibröz membranlara ait SEM görüntüleri

(%15 PLGA/J, 4ml sa⁻¹ akış hızı, 18 kV voltaj, 10 cm toplayıcı uzaklığı) a. x1000, b. x5000, ortalama çap: 625±225 nm

4.2 PLGA ve PLGA/J Nanofibröz Membranlara Mag II İmmobilizasyonu

Bölüm 4.1’de açıklanan sonuçlar doğrultusunda elektroğirme koşulları belirlenen PLGA ve PLGA/J membranlara Magainin II immobilizasyonu bölüm 3.3’de açıklanan şekilde EDC/NHS aktivasyonu ile gerçekleştirilmiştir. EDC/NHS aktivasyonu yüzeyinde karboksilik asit grupları bulunan biyomalzemelere biyoaktif molekül immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Wang vd. 2003, Nie vd. 2009). İmmobilizasyon işleminin ilk basamağında membranlar EDC/NHS ile işleme sokulmuş ve PLGA yapısında bulunan karboksil gruplarının aktifleştirilmesi sağlanmıştır. EDC/NHS, PLGA yapısında bulunan karboksil grupları ile reaksiyona

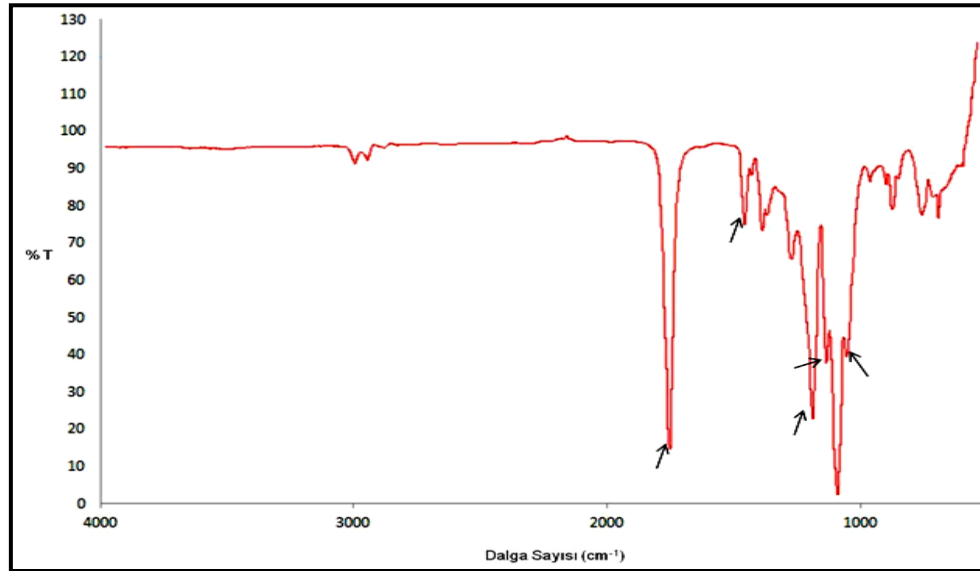
girerek aktif ve amin gruplarına karşı reaktif olan NHS ester ara molekülünü oluşturmaktadır. İmmobilizasyon işleminin ikinci basamağında, Mag II yapısında bulunan amin grupları (N-terminal amino asit) reaktif ester grupları ile reaksiyona girmekte ve peptid moleküllerinin membran yüzeye kovalent immobilizasyonu gerçekleşmektedir.

4.3 PLGA ve PLGA/J Nanofibröz Membranların Karakterizasyonu

Karakterizasyon çalışmaları PLGA, PLGA/J membranlar ile Mag II immobilizasyonu gerçekleştirilmiş olan PLGA-Mag II ve PLGA/J-Mag II membranlar ile yürütülmüştür.

4.3.1 FTIR-ATR analizi

Tez kapsamında hazırlanmış olan PLGA ve PLGA/J membranların yüzeyinde bulunan grupların ve jelatin eklenmesiyle yapıda meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi amacıyla FTIR-ATR analizleri yapılmıştır. Çalışmada kullanılan PLGA nanofibröz membrana ait FTIR-ATR spektrumu Şekil 4.3’de verilmiştir. Mag II immobilizasyonu öncesi alınan spektruma ait veriler çizelge 4.1’de değerlendirilmiştir.



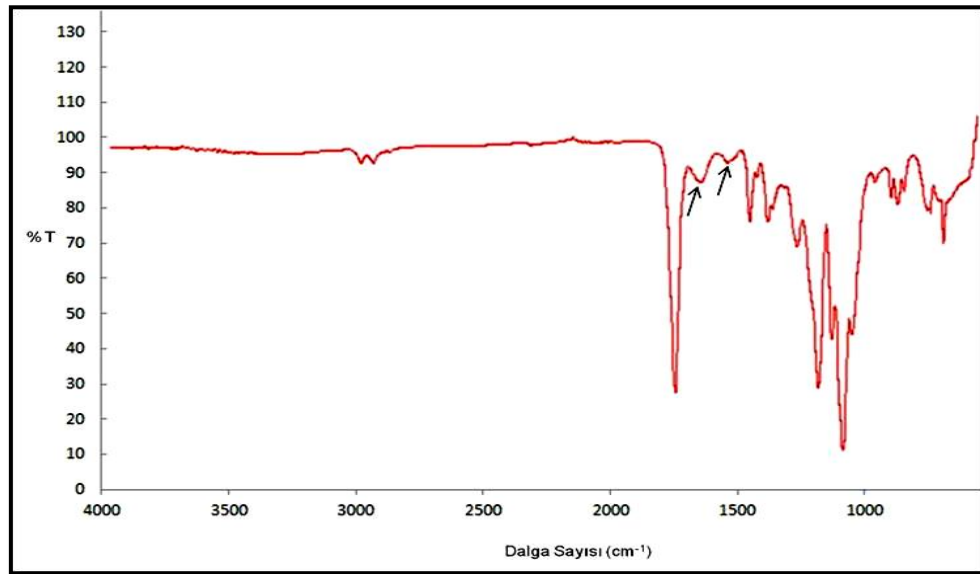
Şekil 4.3 PLGA nanofibröz membrana ait FTIR-ATR spektrumu

Çizelge 4.1 PLGA nanofibröz membrana ait FTIR-ATR spektrum verileri ve değerlendirilmesi

Dalga sayısı (cm^{-1})	Açıklama
1748 s	-C=O gerilmesi (ester)
1452 m	C-H gerilmesi
1182 s	-C-O-C asimetrik gerilmesi
1128 w	C-O (ester)
1048 w	C-CH ₃ gerilmesi

s: şiddetli, m: orta, w: zayıf

Jelatinin PLGA yapısına eklenmesiyle elde edilen PLGA/J nanofibröz membrana ait FTIR-ATR spektrumu şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.4 PLGA/J nanofibröz membrana ait FTIR-ATR spektrumu.

Jelatin yapısında bulunan Amid I ve Amid II bandlarına ait pikler sırasıyla 1649 cm^{-1} ve 1542 cm^{-1} dalga sayısında görülmektedir. Spektruma ait veriler çizelge 4.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2 PLGA/J nanofibröz membrana ait FTIR-ATR spektrum verileri ve değerlendirilmesi

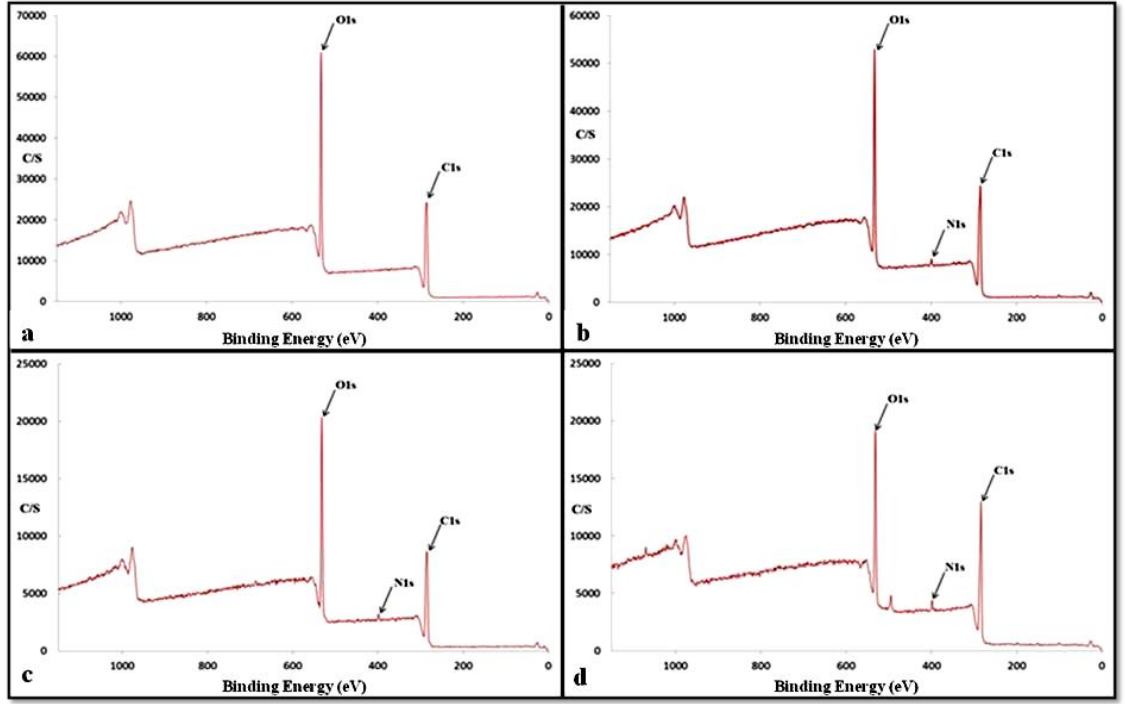
Dalga sayısı (cm ⁻¹)	Açıklama
1748 s	-C=O gerilmesi (ester)
1649 m	C-O gerilme titreşimi (jelatin)
1542 m	N-H eğilmesi (-NH ₂ grubu, jelatin)
1452 m	C-H gerilmesi
1182 s	-C-O-C asimetrik gerilmesi
1128 w	C-O (ester)
1048 w	C-CH ₃ gerilmesi

s: şiddetli, m: orta, w: zayıf

PLGA/J membrana ait FTIR-ATR spektrumundan elde edilen veriler jelatinin PLGA yapısına katıldığını göstermektedir.

4.3.2 X-ışınları Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) Analizi

Tez kapsamında hazırlanan **PLGA**, **PLGA/J** ve **PLGA-Mag II** ve **PLGA/J-Mag II** nanofibröz membranların yüzey atomik bileşimlerini belirlemek amacıyla bölüm 3.4.4’de açıklandığı şekilde XPS analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizlerden elde edilen spektrumlar şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5 Mag II immobilizasyonu öncesi ve sonrasında nanofibröz membranlara ait XPS spektrumları

a. PLGA, b. PLGA-Mag II, c. PLGA/J, d. PLGA/J-Mag II

Şekil 4.5 a’da görülen **PLGA** membrana ait spektrumda 285 eV ve 532 eV bağlanma enerjisindeki (BE) pikler sırasıyla C1s ve O1s atomlarına ait piklerdir. Spektrumdan elde edilen veriler değerlendirilerek yüzey atomik bileşimi **%60.1 C1s** ve **%39.9 O1s** olarak hesaplanmıştır. PLGA nanofibröz membranlara Mag II immobilizasyonu (**PLGA-Mag II**) sonrasında gerçekleştirilen XPS analizinden elde edilen spektrum şekil 4.5 b’de verilmiştir. Spektrumdan elde edilen veriler değerlendirildiğinde Mag II immobilizasyonu sonrasında **400.2 eV** bağlanma enerjisinde bulunan **N1s** pikinin yapıya katıldığı görülmektedir. N1s atomik yüzdesi **%1.5** olarak hesaplanmıştır. N1s pikinin varlığı Mag II peptid yapısından kaynaklanmakta ve immobilizasyonun başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Tez çalışma kapsamında hazırlanmış olan **PLGA/J** nanofibröz membranlara ait XPS spektrumu şekil 4.5 c’de verilmiştir. Spektrumda, jelatinin yapıya katılmasıyla birlikte elde edilen yüzey atomik bileşiminde jelatinin amin gruplarından kaynaklanan **N1s** piki görülmektedir. Spektrumda 285 eV, 400 eV ve 532 eV bağlanma enerjisindeki

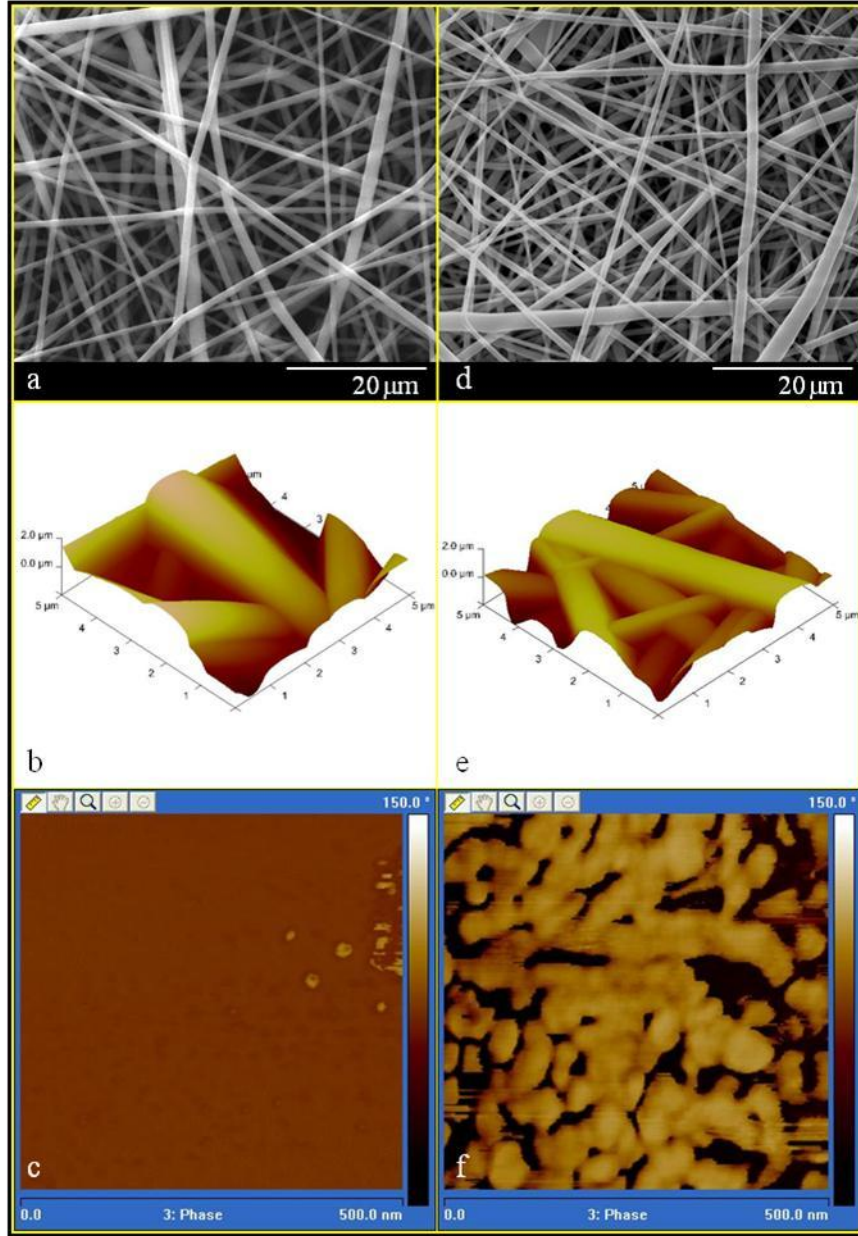
(BE) pikler sırasıyla C1s, N1s ve O1s atomlarına ait piklerdir. Spektrumdan elde edilen veriler değerlendirilerek yüzey atomik bileşimi **%60.8 C1s**, **%1.4 N1s** ve **%37.8 O1s** olarak hesaplanmıştır. PLGA/J membranlara Mag II immobilizasyonu sonucunda elde edilen spektrum şekil 4.5 d’de verilmiştir. Spektrumdan elde edilen veriler değerlendirildiğinde Mag II immobilizasyonu sonrasında **400.2 eV** bağlanma enerjisinde bulunan **N1s** pikinin varlığı görülmektedir. Elde edilen spektrumdan N1s atomik yüzdesi **%2.1** olarak bulunmuştur. PLGA/J membranlara Mag II immobilizasyonu sonunda yapılan XPS analizinde, N1s pikinin şiddetinin **%1.4** değerinden **%2.1** değerine artması immobilizasyonun başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir (Shen vd. 2009). **PLGA** ve **PLGA/J** membranlara ait Mag II immobilizasyonu öncesi ve sonrasında elde edilen ortalama yüzey atomik bileşimleri ve atomik oranlar çizelge 4.3’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.3 Mag II immobilizasyonu öncesi ve sonrasında PLGA ve PLGA/J membranlara ait yüzey atomik bileşimleri

Membranlar	C1s (at.%)	N1s (at.%)	O1s (at.%)	O/N	C/N
PLGA	60.1	-	39.9	-	-
PLGA-Mag II	62.1	1.5	36.4	24.3	41.4
PLGA/J	60.8	1.4	37.8	27.0	43.4
PLGA/J-Mag II	65.8	2.1	32.1	16.1	33.0

4.3.3 PLGA ve PLGA/J nanofibröz membranların morfolojik analizi

Bölüm 4.1’de açıklanan şekilde elektroegirme üretim koşulları belirlenen PLGA membranların Mag II immobilizasyonu öncesi ve sonrasında Bölüm 3.4.2 ve Bölüm 3.4.3’de açıklanan şekilde SEM ve AFM ile analizi gerçekleştirilmiş ve immobilizasyon işleminin fiber morfolojisi üzerine olan etkisi incelenmiştir. PLGA membrana ait SEM görüntüleri şekil 4.6 a, d’de sırasıyla Mag II immobilizasyonu öncesi ve sonrası için verilmiştir.



Şekil 4.6 PLGA ve PLGA-Mag II membranlara ait görüntüler

PLGA: a. SEM (x5000), b. 3-boyutlu AFM, c. 2-boyutlu AFM faz görüntüleri,
PLGA-Mag II: d. SEM (x5000), e. 3-boyutlu AFM, f. 2-boyutlu AFM faz görüntüleri

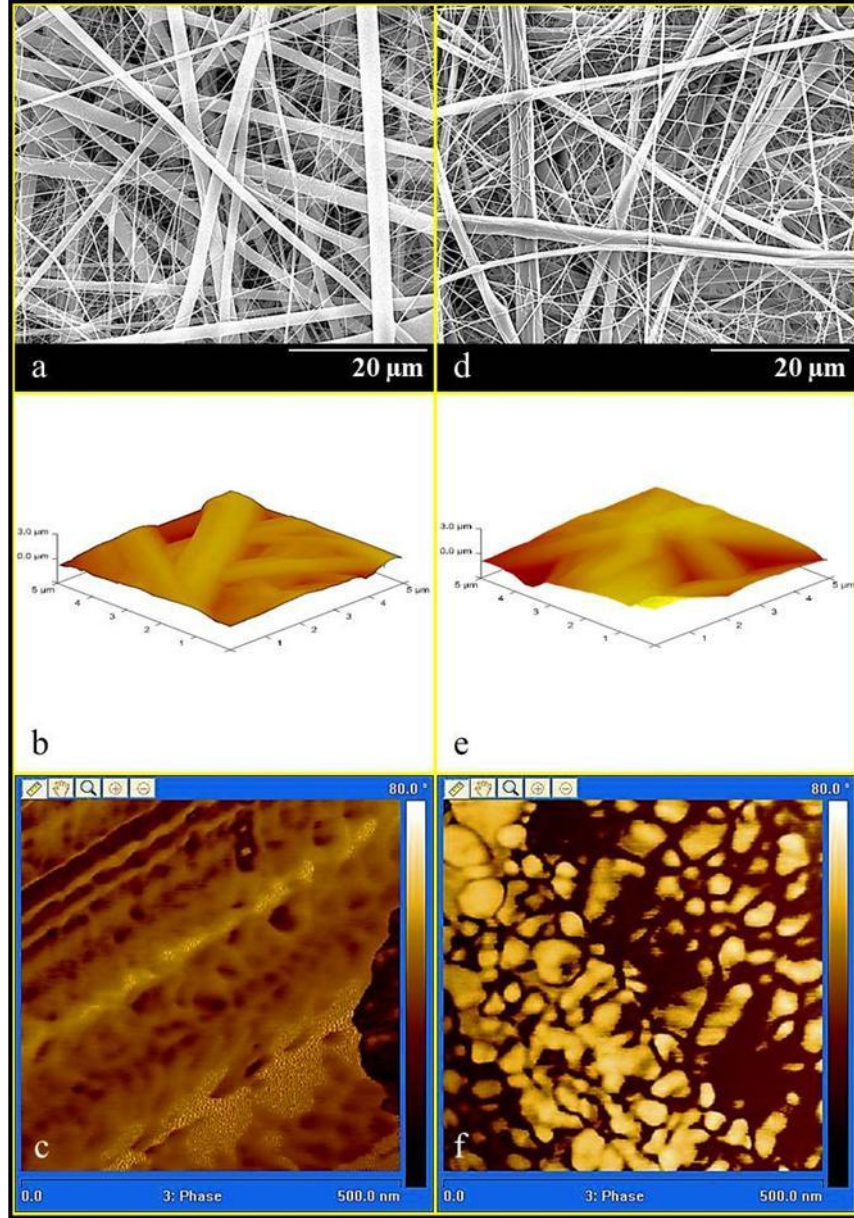
Şekil 4.6 a, d incelendiğinde, EDC/NHS varlığında gerçekleştirilen immobilizasyon işleminin fiber morfolojisini etkilemediği görülmektedir. Fiberler üzerinden alınan AFM görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.6 b, e) Mag II immobilizasyonu sonrasında fiber yapılar üzerinde mikron boyutta bir değişim olmadığını ve fiberlerin morfolojik yapısının değişmediğini söylemek mümkündür. PLGA ve PLGA-Mag II

membranlara ait tek bir fiber yapısı üzerinden alınan 500x500 nm²'lik iki boyutlu faz görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.6 c, f) Mag II immobilize edilmiş PLGA nanofiberlerde yüzey üzerinde nano boyutta agregatların olduğu gözlenmektedir. Fiber yüzeyinde gözlenen bu faz değişiminin yapıya katılan Mag II immobilizasyonu ile ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır. **PLGA** membranların fiber yapısı üzerinde 500x500 nm²'lik karesel bölgelerde gerçekleştirilen ölçümlerden hesaplanan ortalama pürüzlülük değerleri çizelge 4.4'de sunulmuştur.

Çizelge 4.4 PLGA ve PLGA-Mag II membran yapılarında bulunan fiberlerin yüzey pürüzlülüğü değerleri

Membran İçeriği	Yüzey Pürüzlülüğü Değeri (R _a , nm)
PLGA	0.86±0.12
PLGA-Mag II	1.72±0.15

R_a ile ifade edilen parametre fiber yüzeyi üzerinde bulunan topografideki en yüksek ve alçak noktalar arasındaki ortalama mesafeyi ifade etmektedir. Mag II immobilizasyonu sonrasında PLGA fiber yüzeyleri üzerindeki pürüzlülüğün arttığı görülmüştür. İmmobilizasyon işlemi mikron ölçeğinde fiber morfolojisini etkilemezken, nanoboyutta değişime neden olmuştur. **PLGA/J** membranlara ait SEM ve AFM görüntüleri şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.7 PLGA/J ve PLGA/J-Mag II membranlara ait görüntüler

PLGA/J: a. SEM (x5000), b. 3-boyutlu AFM, c. 2-boyutlu AFM faz görüntüleri, PLGA/J-Mag II: d. SEM (x5000), e. 3-boyutlu AFM, f. 2-boyutlu AFM faz görüntüleri

Şekil 4.7 incelendiğinde, PLGA membranlardan elde edilen sonuçlara benzer olarak, immobilizasyon işleminin PLGA/J membranları oluşturan fiber yapısını mikron ölçeğinde etkilemediği görülmüştür (Şekil 4.7 a, d). Elde edilen SEM görüntüleri üç boyutlu AFM görüntüleri ile uyumludur (Şekil 4.7 b, e). PLGA/J fiber üzerinden alınan AFM faz görüntüleri incelendiğinde ise (Şekil 4.7 c, f), immobilizasyon işlemi

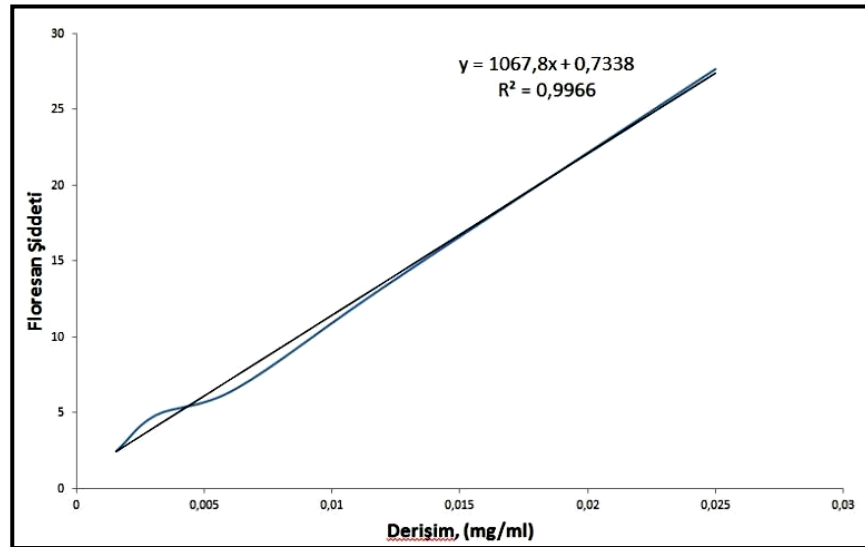
sonrasında fiber yüzeyi üzerinde nano boyutta pürüzlülük oluştuğu gözlenmiştir. PLGA/J membranların fiber yapısı üzerinde 500x500 nm²'lik karesel bölgelerde gerçekleştirilen ölçümlerden hesaplanan ortalama pürüzlülük değerleri çizelge 4.5'de sunulmuştur.

Çizelge 4.5 PLGA/J ve PLGA/J-Mag II membran yapılarında bulunan fiberlerin yüzey pürüzlülüğü değerleri

Membran İçeriği	Yüzey Pürüzlülüğü Değeri (R _a , nm)
PLGA/J	1.8±0.40
PLGA/J-Mag II	3.1±0.30

4.4 PLGA Membranlara İmmobilize Olan Magainin II Miktarının Tayini

PLGA nanofibröz membranlara immobilize edilen Mag II miktarı Bölüm 3.4.5'de açıklanan şekilde tayin edilmiştir. Mag II yapısında bulunan fenil alanin florofor gruplarına ait uyarılma ve emisyon dalga boyları sırasıyla 260 nm ve 290 nm olarak bulunmuştur. Bu koşullarda derişimleri bilinen Mag II çözeltileri ile hazırlanmış olan kalibrasyon grafiği şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8 Magainin II kalibrasyon grafiği

İmmobilizasyon işlemi sonrasında membran üzerinden alınan çözeltinin floresan şiddeti okunmuş ve kalibrasyon grafiği kullanılarak miktara geçilmiştir. Bu değer başlangıçta immobilizasyon için kullanılan miktardan çıkartılmış ve membran yüzeylere immobilize olan Mag II miktarı indirekt olarak hesaplanmıştır. Yapılan bu hesaplama göre nanofibröz PLGA membranlara immobilize olan Mag-II miktarı $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ membran olarak bulunmuştur. Bu sonuca göre başlangıçtaki Mag II miktarının %37.7'si immobilize olmuştur.

4.5 EGF İçeren PLGA Nanofibröz Membranların Hazırlanması

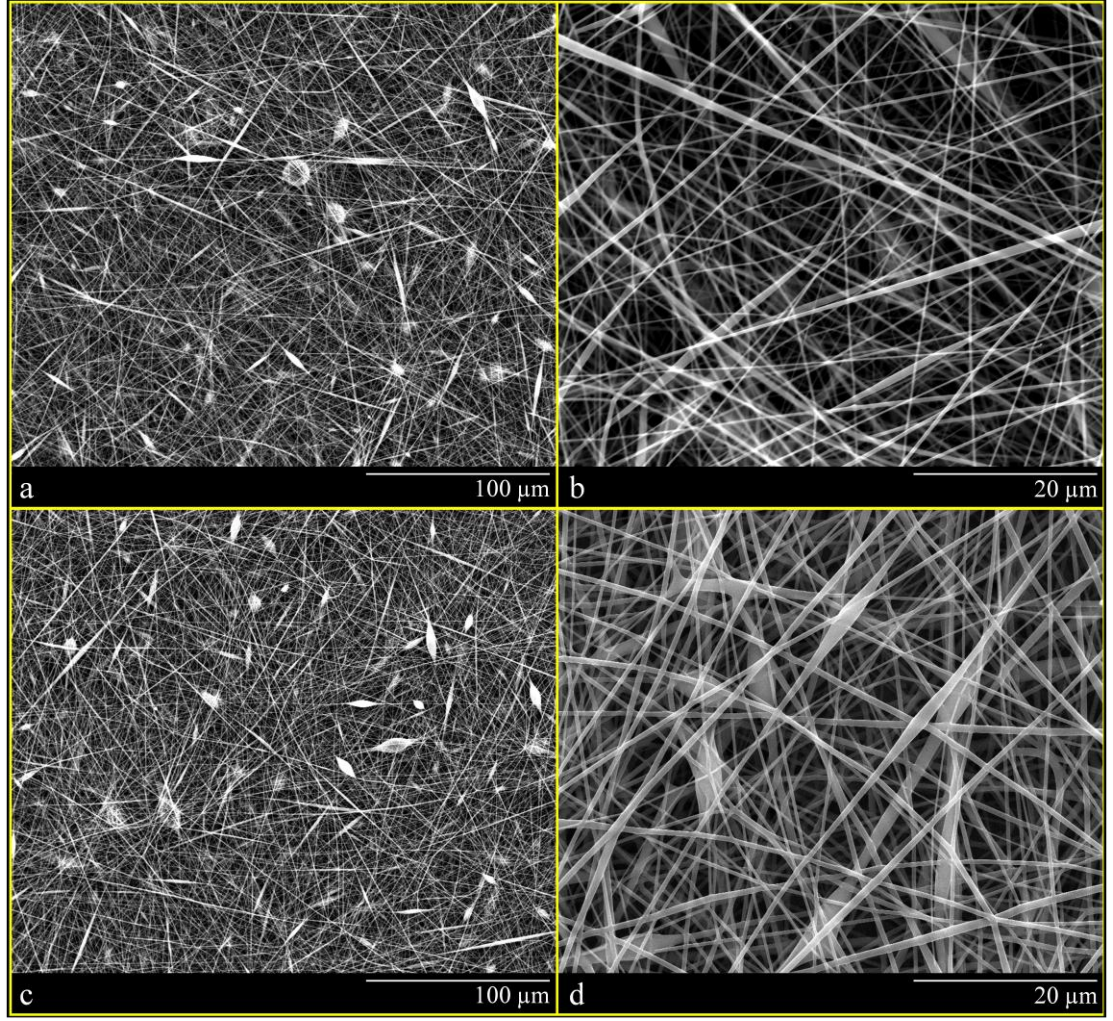
EGF içeren PLGA nanofibröz membranların elektroegirme tekniği ile hazırlanması çalışmalarında çizelge 3.2'de belirtilen şekilde farklı derişimlerde PLGA ve EGF çözeltileri kullanılarak akış hızı, voltaj ve toplayıcı mesafesinin değişiminin gelişigüzel yapıda fiber oluşumu üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları için öncelikle % 16.6'lık PLGA çözeltisi hazırlanmış ve $150 \mu\text{L}$ 'lik EGF çözeltisi eklenmiştir. 1 ml sa^{-1} akış hızında 17 kV voltaj değerinde 10 cm toplayıcı mesafesinde yapılan çalışmada elde edilen fiberlerin çaplarında azalma ve yüksek miktarda boncuk oluşumu gözlenmiştir. Akış hızı sabit tutularak uygulanan voltaj değeri ve toplayıcı uzaklığı artırıldığında 19 kV voltaj değeri ve 15 cm toplayıcı mesafesinde boncuk oluşumunun azaldığı gözlenmiş fakat daha yüksek voltaj değerleri ve toplayıcı mesafelerinde sarmal yapıların ve boncuk oluşumunun arttığı görülmüştür. Akış hızı 3 ml sa^{-1} değerine çıkarıldığında ise farklı voltaj değerleri ve toplayıcı mesafelerinde boncuk oluşumu ve sarmal yapıların azaldığı gözlenmiştir. 5 ve 5.5 ml sa^{-1} akış hızlarına çıkıldığında ise 3 ml sa^{-1} akış hızına göre boncuk ve sarmal yapıların gözle görülür şekilde arttığı görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda, fiber yapılarda meydana gelen boncuk oluşumunun elektroegirme cihazının parametrelerine değil, düşük polimer derişimine bağlı olduğu düşünülmüş ve polimer derişiminin artırılmasına karar verilmiştir.

% 18.3 (w/v) PLGA çözeltisine (HFIP içerisinde) $150 \mu\text{L}$ 'lik EGF çözeltisi eklenerek devam ettirilen çalışmalarda ilk olarak 1 ml sa^{-1} akış hızında 18 kV voltaj değerinde ve 10 cm toplayıcı mesafesinde çalışılmış ve boncuk oluşumunda azalma

gözlenmesine karşın tam olarak önüne geçilemediği sonucuna varılmıştır. Boncuk oluşumunu gidermek amacıyla akış hızı 1 ml sa^{-1} değerinde sabit tutularak voltaj ve toplayıcı mesafesinin artırılması ile gerçekleştirilen çalışmalarda ise yüksek voltaj değerlerine çıkılması ile boncuk boyutlarında artış meydana gelmiş ve sarmal yapıların ortaya çıktığı görülmüştür. Akış hızının 2 ve 3 ml sa^{-1} değerine çıkarılması sonucu elde edilen yapılarda iyileşme gözlenmemiştir. Akış hızı 3.5 ml sa^{-1} değerine çıkarılarak devam edilen çalışmalarda 19 kV voltaj değeri ve 15 cm toplayıcı uzaklığında sarmal yapıların ortadan kalktığı fakat boncuk oluşumunun giderilemediği görülmüştür. Bu yüzden akış hızının sırasıyla 4, 4.5, 5 ve 5.5 ml sa^{-1} değerlerine çıkarılması ile farklı voltaj değerleri ve toplayıcı mesafelerinde çalışmalar gerçekleştirilmiş fakat 3.5 ml sa^{-1} akış hızından daha iyi sonuçlar elde edilememiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda polimer derişiminin artırılmasına karar verilmiştir.

Çalışmalara PLGA derişimi % 19.6 (w/v) değerine çıkarılarak ve 150 μL EGF çözeltisi eklenerek elde edilen çözelti ile 2 ml sa^{-1} akış hızında 18 kV voltaj değerinde ve 10 cm toplayıcı mesafesinde devam edilmiştir. Bu koşullarda gerçekleştirilen elektroegirme işlemi sonucunda boncuk oluşumunun daha düşük PLGA derişimlerinde gerçekleştirilen çalışmalara oranla azaldığı fakat tamamen yok olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte elde edilen fiber yapılarda kopmalar olduğu gözlenmiştir. Akış hızının 3.5 ml sa^{-1} değerine çıkarılması ile kopmaların engellendiği fakat boncuk oluşumunun tam olarak giderilemediği sonucuna varılmıştır. Ayrıca 3.5 ml sa^{-1} akış hızında ve 19 kV voltaj değerlerinde sırasıyla 10 cm ve 15 cm toplayıcı mesafesinde yapılan çalışmalarda 15 cm toplayıcı uzaklığında elde edilen fiberlerin 10 cm'de elde edilenlere oranla daha düzgün yapıda olduğu ve boncuk oluşumunun azaldığı görülmüştür (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 **150 µl EGF** çözeltisi eklenen **%19.6**'lık PLGA membranların SEM görüntüleri

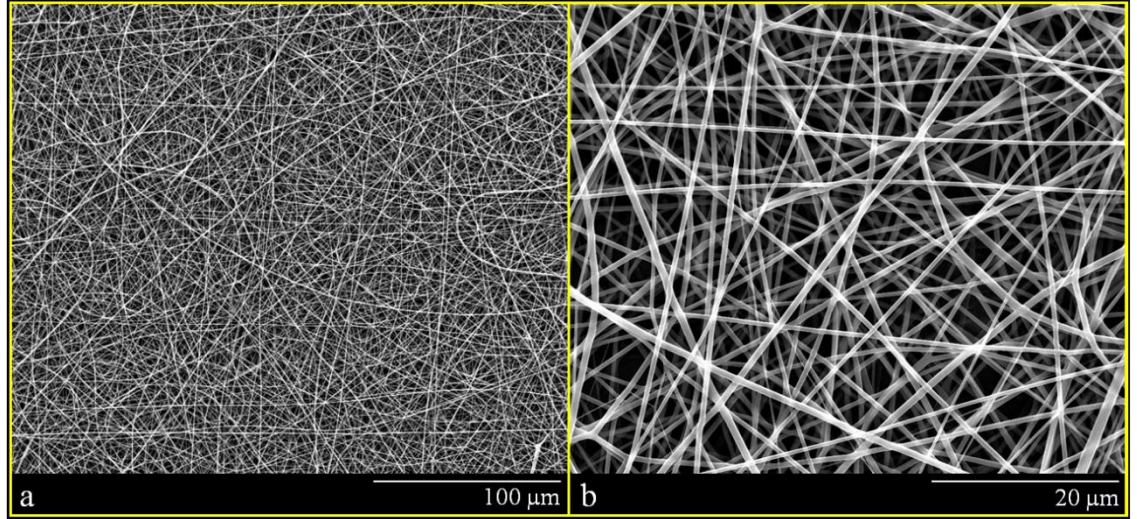
(**3.5 ml sa⁻¹, 19 kV, 10 cm**), a. x1000, b. x5000, (**3.5 ml sa⁻¹, 19 kV, 15 cm**), c. x1000, d. x5000

Akış hızları artırılarak gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda da boncuk oluşumunun önüne geçilememiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, PLGA derişiminin artırılmasının boncuk oluşumunun önlenmesinde olumlu etkileri olduğu görülmekle birlikte, polimer çözeltisine eklenen EGF/TRIS tampon miktarının da önemli bir parametre olduğu sonucuna varılmıştır. Polimer çözeltisine eklenen TRIS tamponun, çözücünün (HFIP) uçuculuğunu olumsuz yönde etkileyerek fiber yapıların tam olarak kurumadan toplayıcıya ulaşmasına ve boncuk oluşumuna neden olduğu düşünülmüştür. Toplayıcı mesafesinin artırılması ise sarmal yapıların artmasına neden olmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda polimer çözeltisine eklenen TRIS

tampon çözeltisinin (EGF miktarı sabit kalacak şekilde) miktarının düşürülmesine karar verilmiştir.

PLGA derişimi % 19.6 olan polimer çözeltisine 125 µL EGF çözeltisi eklenerek yapılan elektroeğirme çalışmaları 3-5 ml sa⁻¹ akış hızı aralığında yürütülmüştür. 3 ml sa⁻¹ akış hızı, 19 kV voltaj değerinde ve 15 cm toplayıcı mesafesinde boncuk oluşumunun azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte yapılan çalışmada fiber yapılarında kopmalar ve sarmal yapılar görülmüştür. 3.5 ml sa⁻¹ akış hızında aynı voltaj ve toplayıcı mesafelerinde yapılan çalışmalarda ise fiber yapısındaki bozuklukların tamamen giderildiği fakat yer yer boncuk oluşumunun sürdüğü görülmüştür. Boncuk oluşumunu önlemek amacıyla sırasıyla 4, 4.5 ve 5 ml sa⁻¹ akış hızlarında yapılan çalışmalarda akış hızının artırılmasıyla boncuk boyutlarının büyümesi ve sarmal yapıların oluştuğu ve bu derişim değerlerinde en iyi sonucun 3.5 – 4 ml sa⁻¹ akış hızı, 19 – 21 kV voltaj aralığında ve 15 cm toplayıcı mesafesinde olduğu sonucuna varılmıştır. Boncuk oluşumunun tamamen giderilmesi amacıyla optimizasyon çalışmalarına eklenen EGF çözeltisi miktarının düşürülerek devam edilmesine karar verilmiştir.

% 19.6'lık PLGA çözeltisi içerisine 100 µl EGF çözeltisi eklenerek elde edilen çözelti ile 3.5 ml sa⁻¹ akış hızında 19 kV voltaj değerinde ve 15 cm toplayıcı mesafesinde yapılan çalışma sonucunda boncukların tamamen giderildiği ve düzgün yapıda fiberlerin elde edildiği görülmüştür. Akış hızı ve voltaj değerlerinin artırıldığında ise; yer yer boncuk ve sarmal yapıların oluştuğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda biyoaktif EGF içeren PLGA nanofibröz membranların elektroeğirme teniği ile elde edilmesi için en uygun koşulların 3.5 ml sa⁻¹ akış hızı, 19 kV voltaj ve 15 cm toplayıcı mesafesi olduğuna karar verilmiştir. EGF içeren PLGA membranlara ait SEM görüntüleri şekil 4.10'da verilmiştir. Membranları oluşturan fiberlerin çap dağılımı JmicroVision (İsviçre) programı yardımıyla hesaplanmış ve ortalama 280 ± 100 nm olarak bulunmuştur. Elektroeğirme tekniği ile elde edilen membranların kalınlığı 40±10 µm olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.10 EGF içeren PLGA nanofibröz membranlara ait SEM görüntüleri

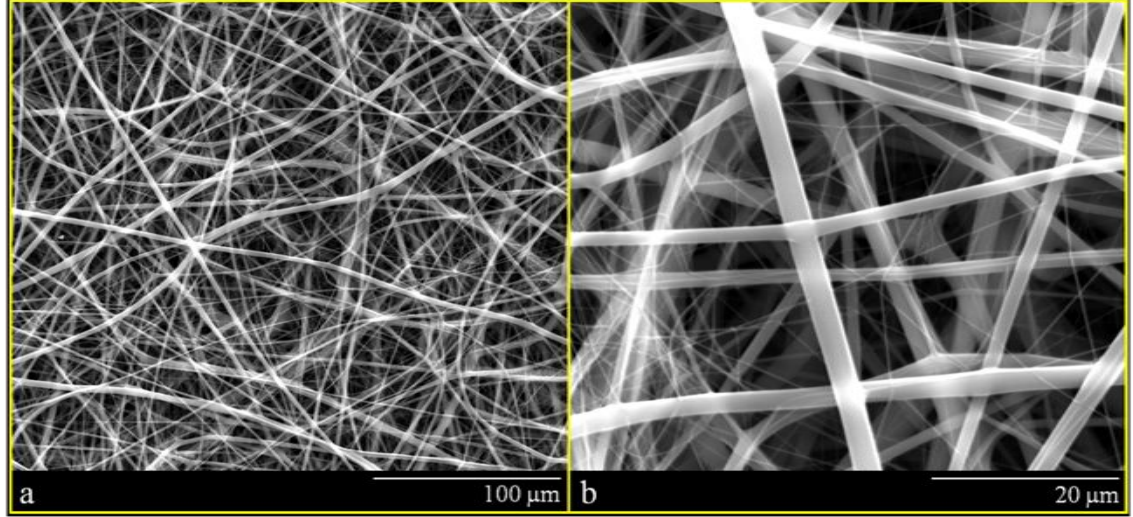
(% 19.6 PLGA + 100 µl EGF içeren TRIS tampon çözelti, 3.5 ml sa⁻¹ akış hızı, 19 kV voltaj, 15 cm toplayıcı mesafesi) a. x1000, b. x5000, Ortalama çap: 280 ± 100 nm

EGF içeren biyoaktif PLGA membranların elektroegirme tekniğiyle hazırlanmasında kullanılan elektroegirme koşulları ve çözelti özellikleri çizelge 4.6’da özetlenmiştir.

Çizelge 4.6 **PLGA-EGF** nanofibröz membranların elektroegirme tekniği ile elde edilmesinde kullanılan parametreler

%19.6 PLGA (HFIP içerisinde)	1.2 ml
EGF (%0.1 BSA içeren 5 mM TRIS tampon çözeltisi, pH: 5.5)	100 µl’de 12.5 µg EGF
Uygulanan voltaj	19 kV
Akış Hızı	3.5 ml sa ⁻¹
Toplayıcı mesafesi	15 cm

EGF içeren PLGA/J membranların hazırlanmasında ise, PLGA:J oranı 9:1 olacak şekilde çizelge 4.6'da verilen polimer çözeltisi/EGF oranları ve elektroegirme koşulları kullanılmış ve EGF içeren PLGA/J membranlar hazırlanmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 EGF içeren PLGA/J nanofibröz membranlara ait SEM görüntüleri

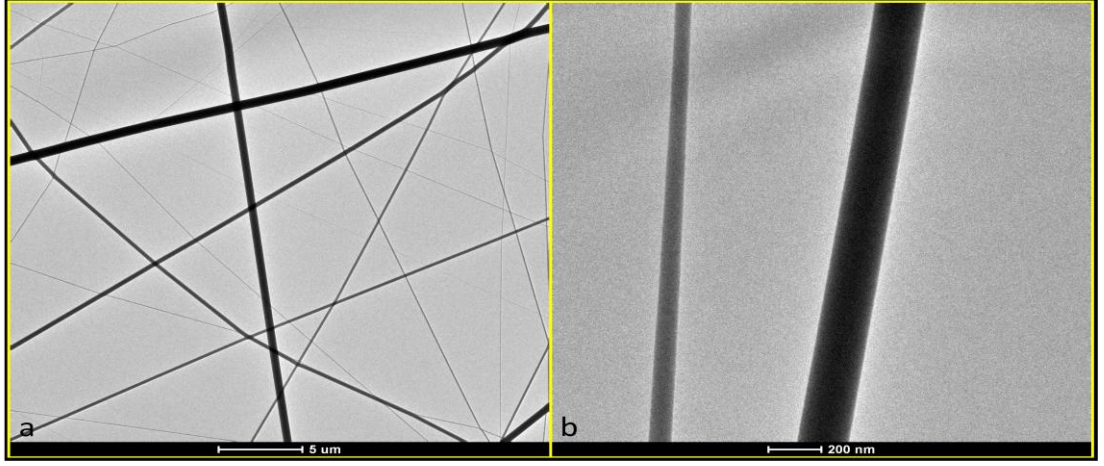
(% 19.6 PLGA/J (9:1) + 100 µl EGF içeren TRIS tampon çözelti, 3.5 ml sa⁻¹ akış hızı, 19 kV voltaj, 15 cm toplayıcı mesafesi) a. x1000, b. x5000, Ortalama çap: 1090 ± 90 nm

4.6 EGF İçeren PLGA Nanofibröz Membranların Karakterizasyonu

EGF içeren PLGA membranların karakterizasyon çalışmaları TEM ve Floresan Mikroskopisi ile yürütülmüştür.

4.6.1 TEM Analizi

Bölüm 3.6.2'de açıklanan yönteme göre gerçekleştirilen TEM analizi sonucunda elde edilen görüntüler şekil 4.12'de verilmiştir.



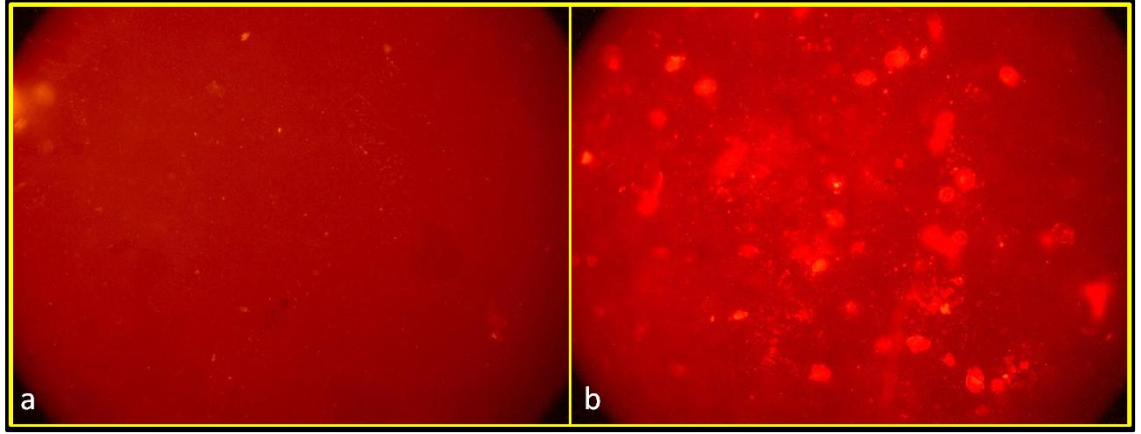
Şekil 4.12 EGF içeren PLGA membranların TEM analizi sonuçları

a. x10000, b. x120000

Şekil 4.12 incelendiğinde **PLGA-EGF** fiberlerin yapısında EGF molekülünün varlığını gösteren bir yapısal değişiklik gözlenmemiştir. Bu durumun, PLGA ve EGF yapılarının her ikisinin de yüksek C ve O içeriğine sahip olmaları nedeniyle yapısal farklılıkların TEM analizi ile gözlenememesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.6.2 Floresan Mikroskopu Analizi

PLGA nanofiber yapısında bulunan EGF moleküllerinin görüntülenmesi amacıyla floresan mikroskopu analizi gerçekleştirilmiştir. EGF molekülü yapısında bulunan triptofan grupları nedeniyle florofor özellik gösteren bir moleküldür. Bu özelliğinden dolayı floresan mikroskopu altında görüntülendiğinde ışımaya neden olmaktadır. Elde edilen floresan mikroskopu görüntüleri **PLGA** ve **PLGA-EGF** membranlar için şekil 4.13’de verilmiştir.



Şekil 4.13 PLGA bazlı membranların floresan mikroskobu görüntüleri

a. PLGA, b. PLGA-EGF

EGF molekülünde bulunan triptofan florofor grupların floresan ışık altında uyarılması sonucu ortaya çıkan ışıma EGF moleküllerinin PLGA fiberlerin yapısına katıldığını göstermektedir.

4.6.3 Su Temas Açısı Tayini

Tez çalışması kapsamında hazırlanan membranların ıslatılabilirlik özellikleri su temas açısı ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. Temas açısına yönelik ölçümler Bölüm 3.8’de açıklanan şekilde yapışık damla yöntemi ile yaklaşık 50 µm kalınlığa sahip membranlar kullanılarak ölçülmüş ve ölçülen su temas açısı değerleri Kruss DSA 100 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. çizelge 4.7’de **PLGA bazlı** membranlara ait su temas açısı değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.7 PLGA, PLGA-Mag II ve PLGA-EGF membranların su temas açısı değerleri

Membran	Su Temas Açısı (°)
PLGA	129.1±1.2
PLGA-Mag II	0*
PLGA-EGF	125.6±1.8

*8 dakika sonunda

Çizelge 4.7 incelendiğinde, Mag II immobilizasyonu sonrasında hidrofobik yapıda olan PLGA membranların su temas açısı değerinin sıfıra düştüğü görülmektedir. Bu durum Mag II molekülünün yapısını oluşturan amino asitlerin yüzeye immobilizasyonu sonucu yüzeyin hidrofilik hale geldiği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Bunun yanı sıra, PLGA-EGF membranların su temas açısı değeri azalmış olmakla birlikte PLGA yapısına katılan EGF moleküllerinin yüzey ıslatılabilirliği üzerinde önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür. EGF molekülleri elektroegirme çözeltisine eklendiğinden fiberler içerisinde dağıldığı ve yüzeye immobilizasyondan farklı olarak sadece yüzey üzerinde toplanmadığından yüzey hidrofobisitesini etkilemediği düşünülmektedir. çizelge 4.8'de PLGA/J bazlı membranlara ait su temas açısı değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.8 PLGA/J, PLGA/J-Mag II ve PLGA/J-EGF membranların su temas açısı değerleri

Membran	Su Temas Açısı (°)
PLGA/J	93.2±0.8
PLGA/J-Mag II	0*
PLGA/J-EGF	88.4±1.2

*3 dakika sonunda

Çizelge 4.8 incelendiğinde, PLGA membrana göre daha hidrofilik yapıda olan PLGA/J kompozit membranların su temas açısı değeri daha düşük çıkmaktadır. Bununla beraber Mag II molekülünün yapısını oluşturan amino asitlerin yüzeye immobilizasyonu sonucu yüzey hidrofilisitesinin arttığı görülmektedir. PLGA/J-EGF membranların su temas açısı değerinin azalmasına karşın PLGA/J yapısına katılan EGF moleküllerinin yüzey ıslatılabilirliği üzerinde önemli bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

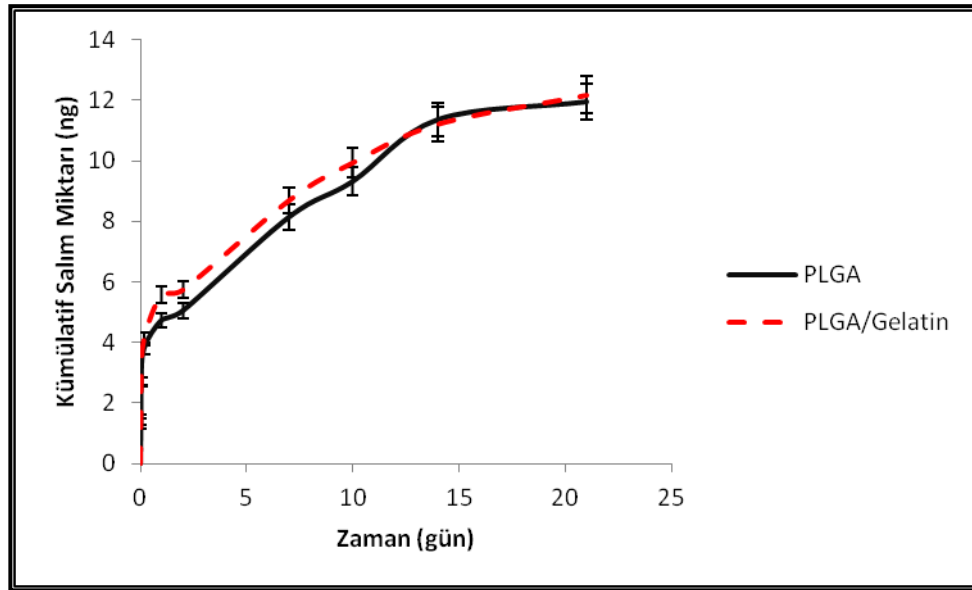
4.7 Çift Tabakalı Antimikrobiyal Biyoaktif Nanofibröz Membranların Hazırlanması

Bölüm 3.7’de açıklanan şekilde hazırlanan membranların kalınlığı $90 \pm 10 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. Çift tabakalı membranların her bir tabakası aynı çözücü ile

hazırlandığından çözücü etkisiyle tabakaların birbirinden ayrılması önlenmiştir (Simsek vd. 2012). Çift tabakalı membranların su tutma kapasiteleri Bölüm 3.9’da açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir. Denge su içeriği değerleri **PLGA-Mag II + PLGA-EGF** ve **PLGA/J-Mag II + PLGA/J-EGF** çift tabakalı membranlar için sırasıyla **%195±20** ve **%275±10** olarak bulunmuştur. PLGA yapısına katılan jelatin hidrofilik özelliği nedeniyle fibröz yapıdaki membranlarda su tutma kapasitesinin artmasına neden olmuştur.

4.8 Çift Tabakalı Membranlardan EGF Salımı

Çift tabakalı membranlardan EGF salımı ELIZA yöntemiyle belirlenmiş ve 1.5 cm çapına sahip çift tabakalı nanofibröz membrandan zamana karşı salınan kümülatif EGF miktarı şekil 4.14’de verilmiştir.



Şekil 4.14 Çift tabakalı nanofibröz membrandan zamana karşı salınan kümülatif EGF miktarı (n=3)

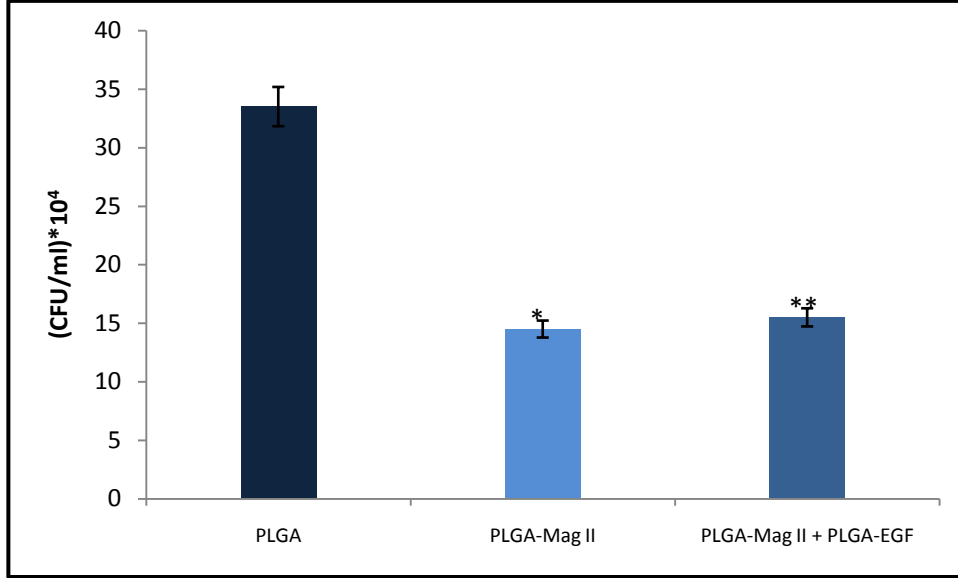
Fiber yapıların içerisinde dağılmış olan EGF moleküllerinin kontrollü salımı 21 gün boyunca izlenmiştir. İlk 24 saat içinde gerçekleşen yaklaşık %45’lik hızlı salımın (*burst release*) ardından salım kontrollü olarak 14 gün boyunca devam etmiştir.

4.9 Antimikrobiyal Aktivitenin İncelenmesi

Tez kapsamında çift tabakalı antimikrobiyal biyoaktif membranların üretimi amaçlanmıştır. Bu amaçla nanofibröz yapıda PLGA bazlı membranlara antimikrobiyal özellik kazandırılması için Mag II immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. PLGA yapısına doğal bir polimer olan jelatinin katılmasıyla PLGA/J nanofibröz membranlar hazırlanarak doğal bir polimerin antimikrobiyal aktiviteye olan etkileri incelenmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin incelendiği çalışmalar Bölüm 3.10'da açıklanan üç farklı grup membran ile yürütülmüş ve Gram-pozitif *S. aureus* ve Gram-negatif *E.coli* bakteri suşları kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar, bakteri yapışması, konfokal mikroskobu ile analiz ve SEM ile analiz olmak üzere üç ana başlık altında yürütülmüş olup kullanılan yöntemler bölüm 3.10'da detaylı olarak açıklanmıştır.

4.9.1 Nanofibröz Membranlara Bakteri Yapışmasının İncelenmesi

Mag II antimikrobiyal peptit varlığının bakteri yapışmasına olan etkisi bölüm 3.10.1'de açıklanan şekilde incelenmiştir. şekil 4.15'de PLGA bazlı membranlar üzerinde 4 saatlik inkübasyon sonunda tutunmuş olan ve sonikasyon işlemi sonrasında yüzeyden koparılarak agar üzerinde 24 saat üremesi sağlanan *S.aureus* suşuna ait koloni sayımı değerleri verilmiştir.

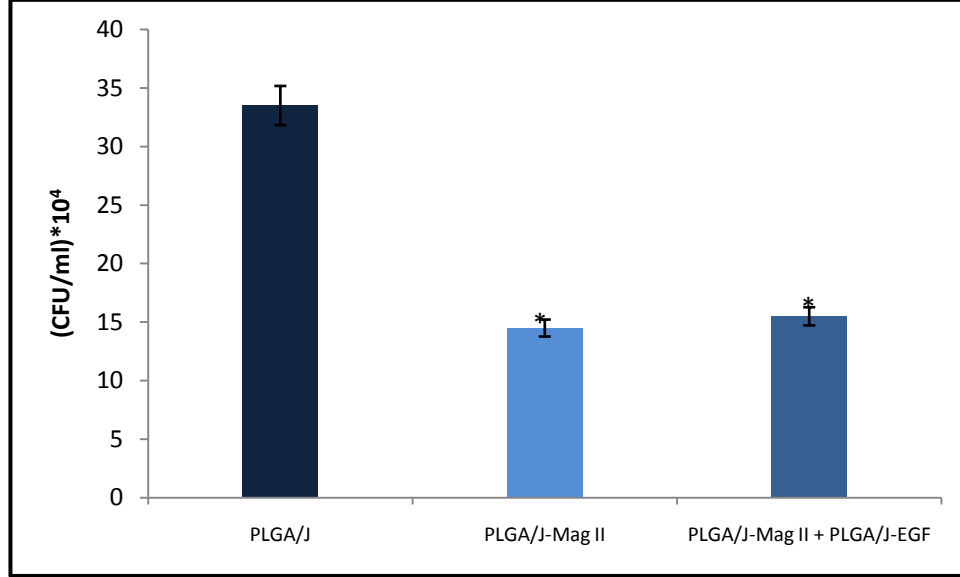


Şekil 4.15 *S.aureus* suşunun **PLGA**, **PLGA-Mag II** ve **PLGA-Mag II + PLGA-EGF** nanofibröz membranlar üzerindeki yapışma değerleri (koloni sayımı yöntemi)

[İstatistiksel önem farklılığı, n=3 * p <0.005, **p<0.05-PLGA kontrol grubu]

Koloni sayımından elde edilen değerler incelendiğinde, Mag II immobilize edilerek antimikrobiyal özellik kazandırılmış olan PLGA-Mag II membranlara tutunan *S. aureus* sayısında önemli ölçüde azalma olduğu görülmüştür. Antimikrobiyal ajan içermeyen PLGA membranlara tutunan bakteri sayısı 2.60×10^5 iken, Mag II immobilizasyonu sonunda bu değer 1.15×10^5 'e düşmüştür. PLGA-Mag II + PLGA-EGF çift tabakalı membranlar üzerinde *S. aureus* yapışması değerleri incelendiğinde, yüzeye tutunan bakteri sayısı PLGA membrana göre daha düşük olmakla birlikte, PLGA-Mag II membran yüzeylere kıyasla % ~13 oranında arttığı görülmüştür. Bu artış, PLGA yapısında bulunan EGF moleküllerinin bakterilerin yüzeye tutunmasında rol oynayabileceği sonucunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, yüzeye tutunan bakteri sayısının PLGA membranlara oranla % ~46 az olması Mag II moleküllerinin antimikrobiyal aktivitesini sürdürdüğünü göstermektedir. PLGA yapısına doğal bir polimer olan jelatin katılmasıyla elde edilen PLGA/J bazlı membranlar üzerinde tutunan *S.aureus* suşuna ait koloni sayım değerleri şekil 4.16'da verilmiştir. Elde edilen değerler incelendiğinde PLGA bazlı membranlara benzer olarak Mag II immobilizasyonu sonrasında PLGA/J membran yüzeylere tutunan *S. aureus* sayısının

azaldığı görülmektedir. Bu sonuç yapıdaki jelatin varlığının immobilizasyon yöntemi açısından bir dezavantaj oluşturmadığını ve antimikrobiyal aktivitenin yüzeye immobilize edilmiş olan Mag II sonucu oluştuğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.16).

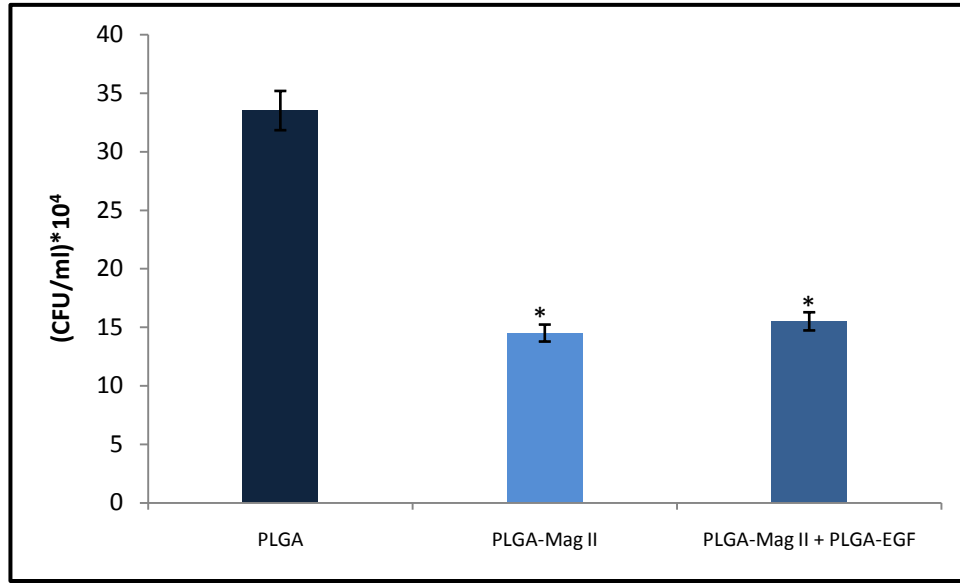


Şekil 4.16 *S.aureus* suşunun **PLGA/J**, **PLGA/J-Mag II** ve **PLGA/J-Mag II + PLGA/J-EGF** nanofibröz membranlar üzerindeki yapışma değerleri (koloni sayımı yöntemi)

[İstatistiksel önem farklılığı, n=3 *p<0.005-PLGA/J kontrol grubudur]

Bununla birlikte, PLGA/J-Mag II + PLGA/J-EGF membranlarda elde edilen sonuçlar ise yapıdaki EGF varlığının *S.aureus* yapışması üzerine önemli bir etkisi olmadığını göstermiştir.

Tez kapsamında, antimikrobiyal aktivitenin incelenmesi amacıyla nanofibröz membran yüzeylerde inkübe edilen diğer bakteri suşu *E.coli*'dir. Koloni sayım yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar şekil 4.17 ve şekil 4.18'de verilmiştir.

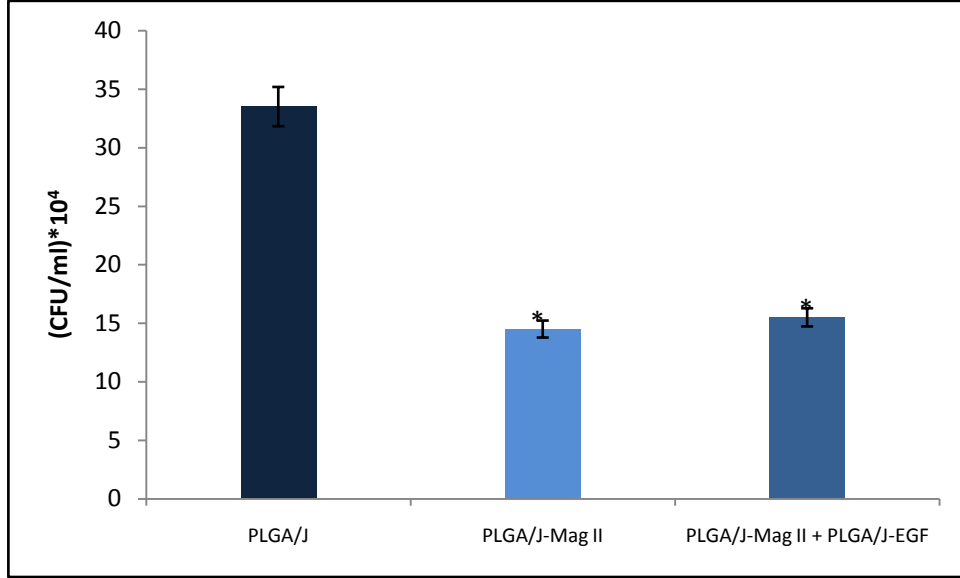


Şekil 4.17 *E.coli* suşunun **PLGA**, **PLGA-Mag II** ve **PLGA-Mag II + PLGA-EGF** nanofibröz membranlar üzerindeki yapışma değerleri (koloni sayımı yöntemi)

[İstatistiksel önem farklılığı, n=3 *p<0.001-PLGA kontrol grubudur]

Şekil 4.17 incelendiğinde, Mag II immobilize edilmiş PLGA membranlarda *E.coli* yapışmasının % ~61 oranında azaldığı görülmüştür. *E.coli* ile yürütülen çalışmalardan elde edilen sonuçlar, PLGA-Mag II+PLGA-EGF membran yüzeylerde bakteri yapışmasının EGF varlığından önemli ölçüde etkilenmediğini göstermiştir. PLGA-Mag II ile PLGA-Mag II + PLGA-EGF membranlara olan *E. coli* yapışması arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir.

PLGA/J bazlı membranlar ile yürütülen çalışmalarda da, PLGA bazlı membranlara benzer olarak, Mag II immobilizasyonunun *E.coli* yapışmasını inhibe ettiği görülmektedir. PLGA/J-Mag II membranlara *E.coli* yapışması % ~58 oranında azalmıştır. Deneysel sonuçlara bakıldığında çift tabakalı membranlarda bulunan EGF'in, *E.coli* yapışmasında herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.18).

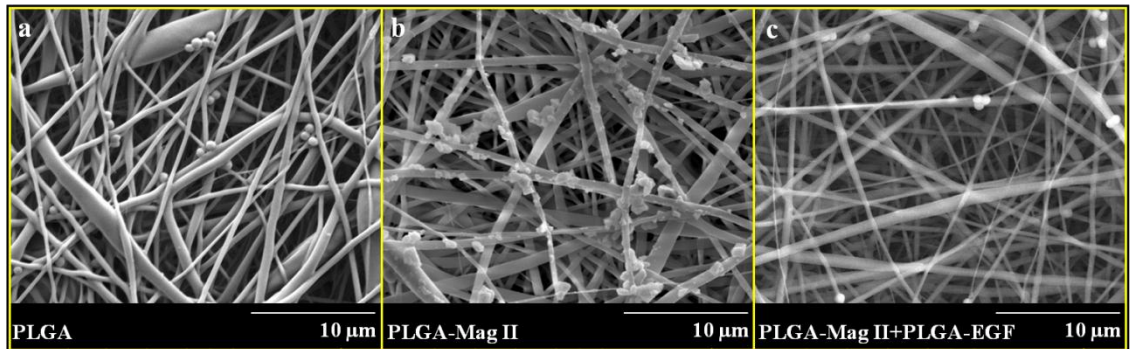


Şekil 4.18 *E.coli* suşunun **PLGA/J**, **PLGA/J-Mag II** ve **PLGA/J-Mag II + PLGA/J-EGF** nanofibröz membranlar üzerindeki yapışma değerleri (koloni sayımı yöntemi)

[İstatistiksel önem farklılığı, n=3 *p<0.001-PLGA/J kontrol grubudur]

4.9.2 Antimikrobiyal Aktivitenin SEM ile Analizi

Antimikrobiyal aktivitenin incelendiği çalışmaların ikinci grubunda Bölüm 3.10.2’de açıklanan şekilde SEM analizi gerçekleştirilmiştir. *S.aureus* suşunun **PLGA**, **PLGA-Mag II** ve **PLGA-Mag II + PLGA-EGF** membran yüzeylerdeki SEM görüntüleri şekil 4.19’da verilmiştir.

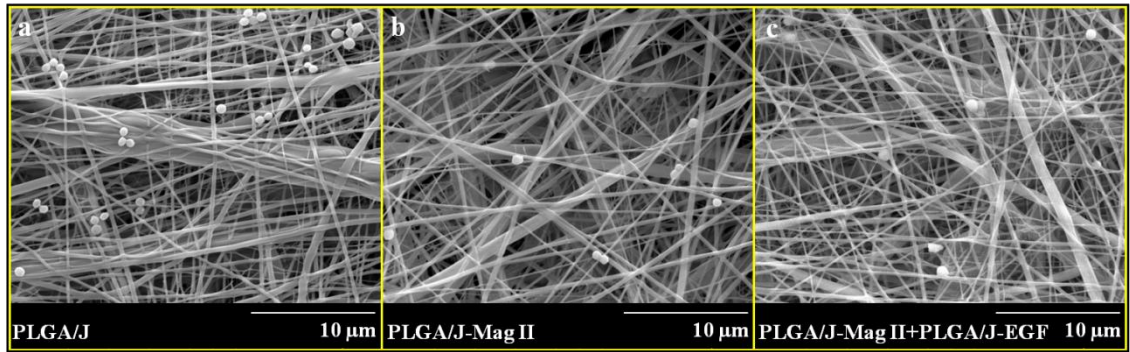


Şekil 4.19 *S. aureus* suşunun PLGA bazlı membran yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri

a. **PLGA**, b. **PLGA-Mag II**, c. **PLGA-Mag II + PLGA-EGF**, (x10000)

Şekil 4.19 incelendiğinde, PLGA bazlı yüzeylerde Mag II immobilizasyonu sonrasında bakteri yapışmasının önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Şekil 4.19 a’da bilinen küresel formdaki *S. aureus* bakterilerinin nanofibröz membranı oluşturan fiberlere tutunduğu ve morfolojik yapılarını korudukları görülmektedir. Mag II ile modifiye edilmiş membranda ise (Şekil 4.19 b) fiberlere tutunan bakteri sayısında azalma görülmektedir. Yüzeye tutunan bakteri sayısındaki bu azalma Mag II antimikrobiyal peptidinin bakteri-statik etkisini ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra, şekil 4.19 b’de PLGA-Mag II yüzeylerde bulunan bakterilerin bazılarının küresel formlarını kaybettikleri görülmektedir. Bu sonuç, bakterilerin Mag II ile etkileşimleri sonucunda membranlarının parçalandığını ve bakteri-sidal etki ile yüzey etkileşimlerinin inhibe edildiğini göstermektedir. *S. aureus* suşu için SEM analizinden elde edilen görüntüler, bölüm 4.9.1’de verilen koloni sayımı sonuçları ile uyumludur.

S.aureus suşunun PLGA/J bazlı membranlar ile etkileşiminin incelendiği SEM analizinden elde edilen görüntüler şekil 4.20’de verilmiştir. Şekil 4.20 incelendiğinde, PLGA/J-Mag II membran yüzeylerdeki *S. aureus* yoğunluğunun PLGA/J membran yüzeyine kıyasla önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. PLGA bazlı membranlarda elde edilen görüntülere paralel olarak PLGA/J membranlardaki Mag II aktivitesi de açıkça görülmektedir.

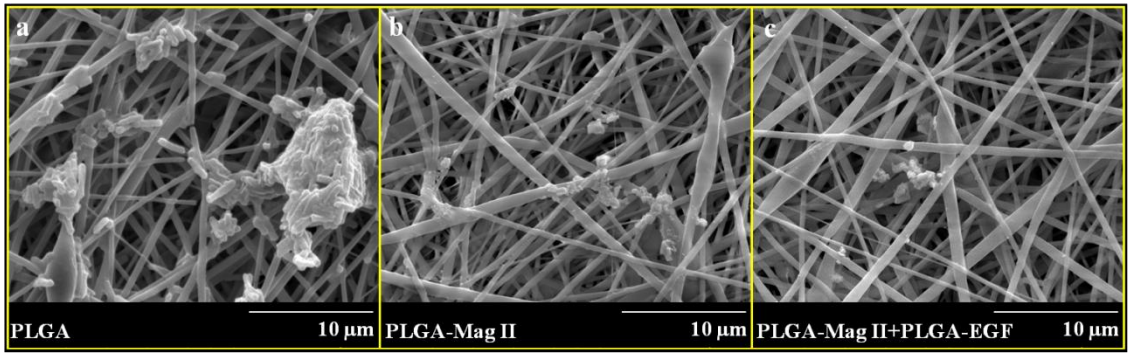


Şekil 4.20 *S. aureus* suşunun PLGA/J bazlı membran yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri

a. PLGA/J, b. PLGA/J-Mag II, c. PLGA/J-Mag II + PLGA/J-EGF, (x10000)

Şekil 4.20’de bulunan SEM görüntüleri PLGA/J bazlı membranlarda *S.aureus* için elde edilen koloni sayımı sonuçları ile uyumludur.

Antimikrobiyal aktivitenin incelenmesi amacıyla *E.coli* suşu ile yürütülen çalışmalarda alınan SEM görüntüleri şekil 4.21’de verilmiştir. Şekil 4.21 incelendiğinde PLGA bazlı yüzeylerde Mag II immobilizasyonunun etkisi açıkça görülmektedir. Şekil 4.21 a’da PLGA membranı oluşturan fiberlere tutunan ve koloni oluşturma eğiliminde olan çubuk morfolojideki *E.coli* bakterileri görülmektedir. Mag II immobilizasyonunun *E.coli* yapışmasını önemli ölçüde engellediği ve yüzeye tutunma eğiliminde olan az sayıda bakterinin membran yapılarının Mag II etkileşiminden olumsuz yönde etkilenecek çubuk morfolojilerinin bozulduğu görülmektedir (Şekil 4.21 b). Elde edilen bu sonuçların Mag II peptidinin bakteri-statik ve bakteri-sidal etkilerinin sonucu olduğu düşünülmektedir.



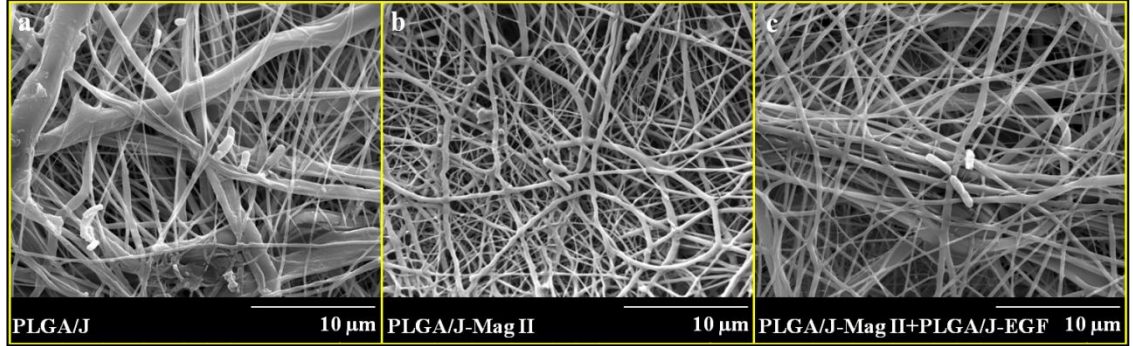
Şekil 4.21 *E.coli* suşunun PLGA bazlı membran yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri

a. PLGA, b. PLGA-Mag II, c. PLGA-Mag II + PLGA-EGF, (x10000)

Şekil 4.21 c’de bulunan PLGA-Mag II + PLGA-EGF membrana ait SEM görüntüsünde Mag II aktivitesinin EGF varlığında sürdüğü ve bakteri yapışmasının PLGA membranlara göre azaldığı görülmektedir. *E.coli* suşu için elde edilen SEM görüntüleri koloni sayımı sonuçları ile uyumludur.

PLGA/J bazlı membranların *E.coli* etkileşimi sonucunda alınan SEM görüntüleri şekil 4.22’de verilmiştir. Şekil 4.22 incelendiğinde, PLGA bazlı membranlarda elde edilen görüntülere paralel olarak PLGA/J bazlı membranlarda da Mag II aktivitesinin etkileri

görülmektedir. Yapıya katılan jelatin Mag II aktivitesi üzerinde olumsuz etki yaratmamıştır. SEM görüntüleri koloni sayım sonuçları ile uyumludur.

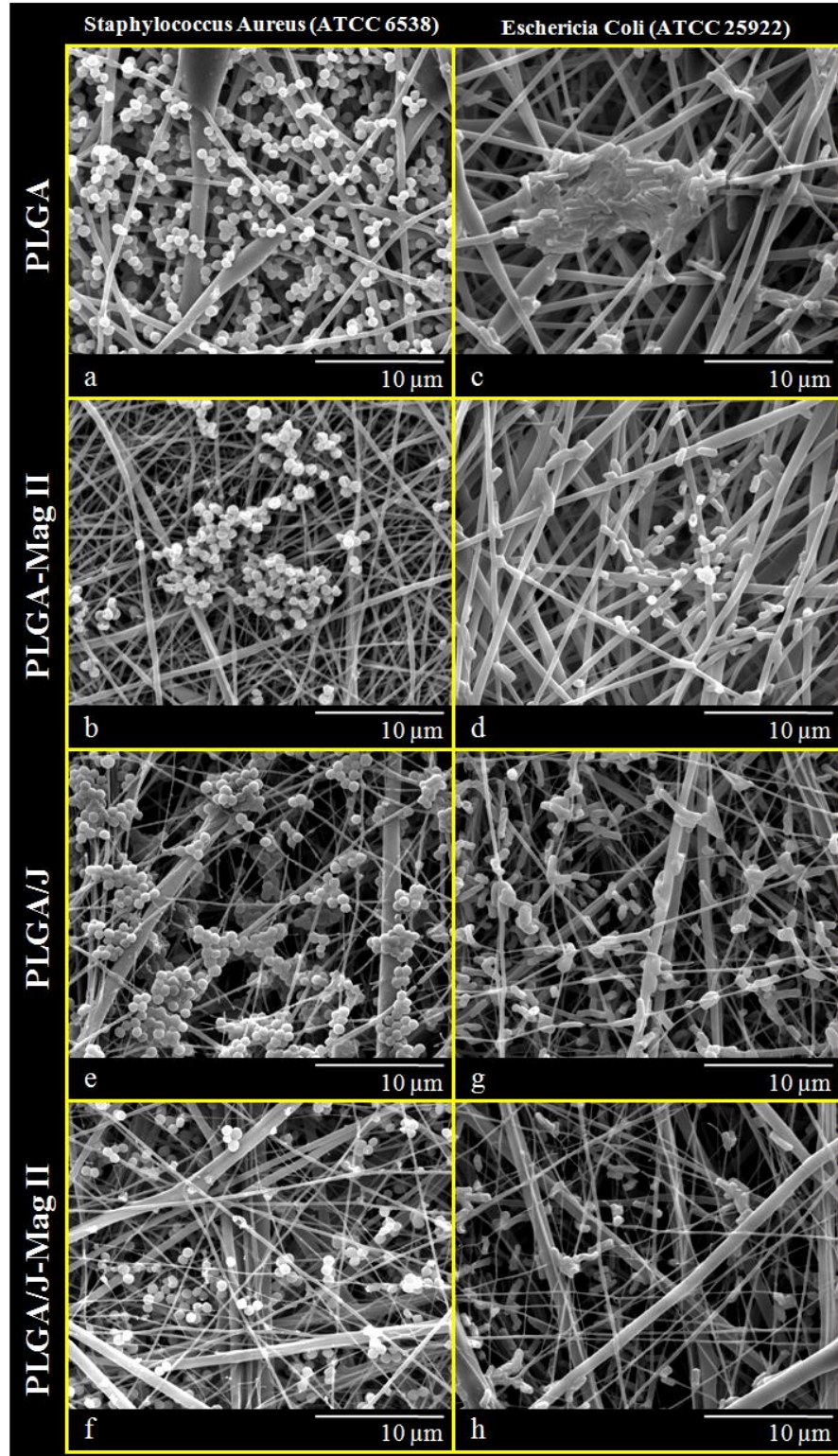


Şekil 4.22 *E.coli* suşunun PLGA/J bazlı membran yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri

a. PLGA/J, b. PLGA/J-Mag II, c. PLGA/J-Mag II + PLGA/J-EGF, (x10000)

Mag II immobilizasyonunun 24 saat sonundaki bakteri yapışması üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla nanofibröz membranlar bölüm 3.10.2’de açıklanan şekilde bakteri süspansiyonunda inkübe edilmiş ardından SEM altında incelenmiştir. 24 saat sonunda **PLGA**, **PLGA-Mag II**, **PLGA/J** ve **PLGA/J-Mag II** yüzeylere yapışan bakterilerin görüntüleri şekil 4.23’de verilmiştir.

Şekil 4.23 incelendiğinde, **PLGA** bazlı membran grubunda (Şekil 4.23 a-d) 24 saatlik inkübasyon sonrasında Mag II’nin bakteri yapışmasını önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür. Bununla birlikte, **PLGA/J** membran grubunda da (Şekil 4.23 e-h) Mag II etkisi 24 saatlik inkübasyon süresince devam etmiştir.



Şekil 4.23 *E.coli* ve *S.aureus* suşlarının PLGA ve PLGA/J bazlı membran yüzeyler üzerindeki 24 saat sonunda bakteri yapışması SEM görüntüleri

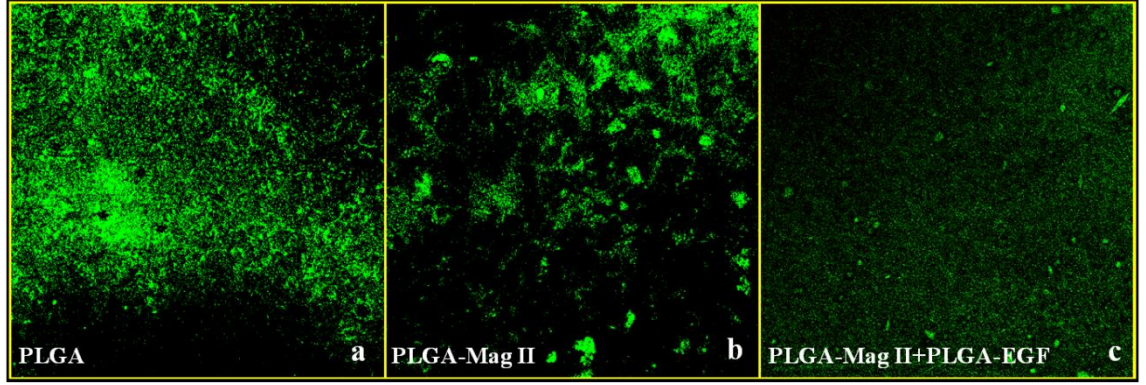
S. aureus: a. PLGA, b. PLGA-Mag II, e. PLGA/J, f. PLGA/J-Mag II (x10000)
E. coli: c. PLGA, d. PLGA-Mag II, g. PLGA/J, h. PLGA/J-Mag II

Biyomalzemelerin vücut içerisine implantasyonu sonucu malzeme yüzeyi hem bakteriler hem de sağlıklı hücreler için yapışma ve üreme ortamı oluşturmaktadır. Biyomalzeme yüzeyinin öncelikli olarak bakteriler yerine sağlıklı hücreler ile kolonize olması, implantın uzun süreli kullanımı açısından önem taşımaktadır. Mag II ile aktive edilen PLGA membranlarda ilk 4 saatte bakteri yapışmasında elde edilen azalma, yarışmalı yapışma durumunda sağlıklı hücrelerin yüzeye öncelikli tutunması ve kolonizasyonu açısından avantaj sağlayacaktır. Bununla birlikte, 24 saatlik bakteri inkübasyonundan elde edilen sonuçlar, Mag II immobilize edilmemiş membranlarda bakteri yapışmasının ve kolonizasyonunun hızlı bir şekilde ilerlediğini göstermektedir. Mag II aktivasyonu ile bakteri yapışmasının büyük ölçüde engellenmiş olması, sağlıklı hücrelerin yüzeye tutunmalarının ardından yüzeye adaptasyonu ve yüzey üzerinde yayılarak çoğalmaya başlamaları açısından önemlidir.

4.9.3 Antimikrobiyal Aktivitenin Konfokal Mikroskobu ile Analizi

Membran yüzeylere tutunan bakterilerin Bacterial Viability Kit (Live/Dead Assay) ile boyanmasının ardından konfokal mikroskobu altında görüntüleri alınmıştır. Konfokal mikroskobu ile gerçekleştirilen analizler yalnızca PLGA membran grubu ile yürütülmüştür (PLGA, PLGA-Mag II ve PLGA-Mag II + PLGA-EGF). PLGA/J bazlı membranlarda jelatinin otofloresan özelliği dolayısıyla yaptığı ışımaya sonucu görüntü almak mümkün olmamıştır.

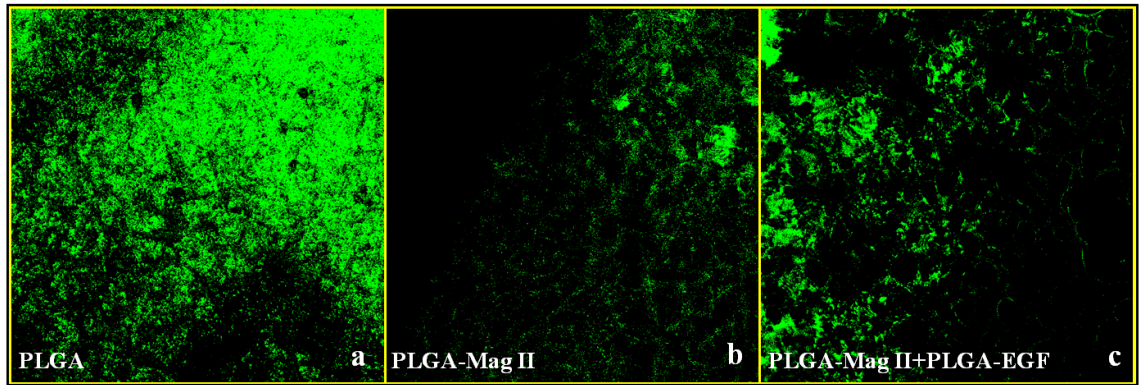
Boyama işlemlerinde kullanılan Bacterial Viability Kit, canlı bakteriler ile etkileştiğinde yeşil ışımaya yapan Syto 9 ve hasar görmüş membrana sahip veya ölü bakteriler ile etkileştiğinde kırmızı ışımaya veren propidyum iyodür (PI) boyalarından oluşmaktadır. Boya karışımında PI varlığı önemlidir. Syto 9 PI ile karıştırılmadan kullanıldığında canlı-cansız tüm bakteriler ile etkileşmektedir. Syto 9'un yalnızca canlı bakteriler ile etkileşebilmesi için PI varlığında yüzeye uygulanması ve PI boyasının Syto 9'u söndürmesi sonucu yalnızca canlı bakterilerin yeşil ışımaya vermesi sağlanmaktadır. Boyama işlemi bölüm 3.10.3'de açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir. Konfokal mikroskobu görüntüleri şekil 4.24 ve şekil 4.25'de sırasıyla *S.aureus* ve *E.coli* suşları için verilmiştir.



Şekil 4.24 PLGA bazlı membranlar üzerinde tutunan *S.aureus* bakteri suşuna ait konfokal mikroskobu görüntüleri (x20)

a. PLGA, b. PLGA-Mag II, c. PLGA-Mag II + PLGA-EGF

Şekil 4.24 incelendiğinde yeşil ışımaya yapan canlı *S.aureus* sayısının PLGA membranlarda oldukça fazla olduğu, **PLGA-Mag II** ve **PLGA-Mag II + PLGA-EGF** membranlarda ise önemli ölçüde azaldığı (Şekil 4.24 b, c) açıkça görülmektedir. Ne var ki, elde edilen konfokal görüntülerinde özellikle Mag II ile aktifleştirilmiş membranlar üzerinde kırmızı ışımaya yapan ölü ya da hasar görmüş bakteriye rastlanmamıştır. Bu durumun PI ışımaya şiddetinin Syto 9 tarafından bastırılmış olmasından ve PI ışımalarının floresan altında çok hızlı sönmeye gitmesinin yanı sıra, boyaları yapıdan uzaklaştırmak için yapılan yıkama işlemleri sırasında ölü bakterilerin yüzeyden ayrılması sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir.



Şekil 4.25 PLGA bazlı membranlar üzerinde tutunan *E. coli* bakteri suşuna ait konfokal mikroskobu görüntüleri (x20)

a. PLGA, b. PLGA-Mag II, c. PLGA-Mag II + PLGA-EGF

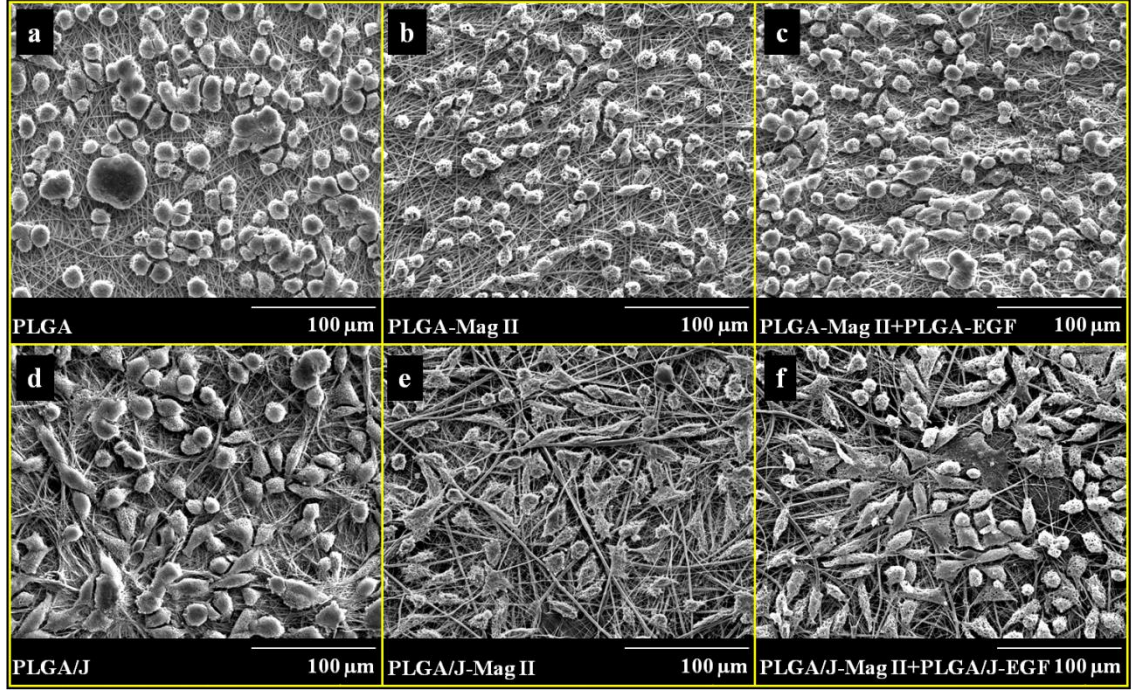
Benzer durum *E.coli* suşu ile yapılan çalışmada da görülmüştür. Şekil 4.25’de verilen konfokal görüntüleri incelendiğinde, **PLGA** bazlı yüzeylere tutunan canlı *E.coli* yoğunluğunun Mag II ile antimikrobiyal aktivite kazandırılmış olan PLGA-Mag II membranda önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. Ne var ki, SEM görüntülerinde tespit edilen membran yapısı bozulmuş bakteriler (Şekil 4.25 b, c) PI boyama ile konfokal analizi sırasında gözlenememiştir.

Biyomalzeme yüzeylerinde bakteriyel yapışma ve biyofilm oluşumunun engellenmesi için geliştirilen stratejiler, antibakteriyel bileşiklerin yüzeylere immobilizasyonu ya da salımı üzerine yoğunlaşmaktadır. Metal türevleri ve antibiyotikler gibi sentetik yaklaşımların kullanılmasıyla malzeme yüzeyleri üzerinde antibakteriyel tabakalar elde edilebilmektedir. Sentetik yaklaşımların yanı sıra bakteriyolitik enzimler (Yuan vd. 2011), bitkilerden elde edilen uçucu yağlar (Guarda vd. 2011) ve antimikrobiyal peptidler (Humblot 2009, Hequet vd. 2011 ve Costa vd. 2011) gibi doğal kaynaklı bileşiklerin kullanılmasıyla antimikrobiyal özelliğe sahip malzemelerin geliştirilmesi mümkündür. Bu doğal stratejiler geniş bir antimikrobiyal spektruma sahip olan antimikrobiyal peptidlerin kullanıldığı çalışmalar oldukça ilgi çekicidir. AMP’lerin kovalent immobilizasyonu ile uzun süreli stabilizasyonun sağlandığı, toksisitesi düşük ve aktivitesi yüksek yapıların elde edilmesi önemli bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır. Gerçekleştirilen proje çalışması kapsamında, doğal bir AMP olan Magainin II peptidi PLGA bazlı nanofibröz membranlara immobilize edilerek antimikrobiyal özelliğe sahip membranlar elde edilmiştir. Immobilizasyon işlemi EDC/NHS aktivasyonu ile gerçekleştirilmiştir (Wang vd. 2003, Nie vd. 2009). Mag II molekülleri aktif amino grupları üzerinden PLGA bazlı membranlara immobilize olmaktadır. Mag II molekülünün yan zincirleri üzerinde de amino grupları olduğu düşünüldüğünde, Mag II’nin immobilizasyon sonrası yüzey üzerinde herhangi bir oryantasyona sahip olacağı açıktır (Humblot vd. 2009). Bakteriyel yapışma çalışmalarından elde edilen sonuçlar, Mag II’nin yüzey oryantasyonuna bağlı olmaksızın aktivitesini koruduğunu göstermektedir. SEM analizinden elde edilen görüntüler hem *S. aureus* hem de *E.coli* bakterileri için Mag II’nin anti yapışma özelliğinin yanı sıra bakterisidal aktivitesini de göstermektedir. Konfokal mikroskobu

analizinde Mag II immobilize yüzeyler üzerinde canlı bakterilere ait yeşil ışımadaki azalma, SEM görüntüleri ile uyumlu sonuçlar vermektedir.

4.10 L929 Fare Fibroblastları ile Hücresel Aktivitenin İncelenmesi

Antimikrobiyal peptidlerin yüzeye immobilizasyonu sonucu bakteriyal aktivitenin engellenmesinin yanı sıra, kullanılan peptid yapıların sağlıklı hücrelerin üremesinde olumsuz bir etki oluşturmaması da önemlidir. Tez çalışması kapsamında, Mag II ile modifiye edilmiş nanofibröz membranlar ile bölüm 3.11’de açıklanan şekilde hücre kültür çalışmaları yürütülmüş ve Mag II yapısının hücre yapışması ve üremesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. L929 fare fibroblastlarının kullanıldığı çalışmalarda öncelikle 4 saat sonundaki hücre tutunması analiz edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin incelendiği çalışmalarda da bakteri yapışması 4 saat sonunda incelendiğinden, sağlıklı hücrelerin bu süre sonunda yüzey üzerinde vereceği cevap önem taşımaktadır. L929 hücrelerinin 4 saatlik inkübasyonu sonunda yüzeyler üzerinden alınan hücre süspansiyonunda yapılan hemositometrik sayım sonucunda hücrelerin tamamının yüzeylere tutunduğu görülmüştür. Eşitlik 3.2 ile yapılan hesaplama sonunda hücrelerin %100’ünün yüzeye tutunduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuç hücre kültürünün erken döneminde, Mag II peptidinin hücrelerin yüzeye tutunması üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığını göstermektedir. 4 saatlik inkübasyon sonunda nanofibröz membranlara tutunan L929 fare fibroblastlarına ait SEM görüntüleri şekil 4.26’da verilmiştir.



Şekil 4.26 L929 fare fibroblastların PLGA ve PLGA/J bazlı membran yüzeylerin üzerindeki hücre tutunması SEM görüntüleri (4. saat) (x1000)

a. PLGA, b. PLGA-Mag II, c. PLGA-Mag II + PLGA-EGF
d. PLGA/J, e. PLGA/J-Mag II, f. PLGA/J-Mag II + PLGA/J-EGF

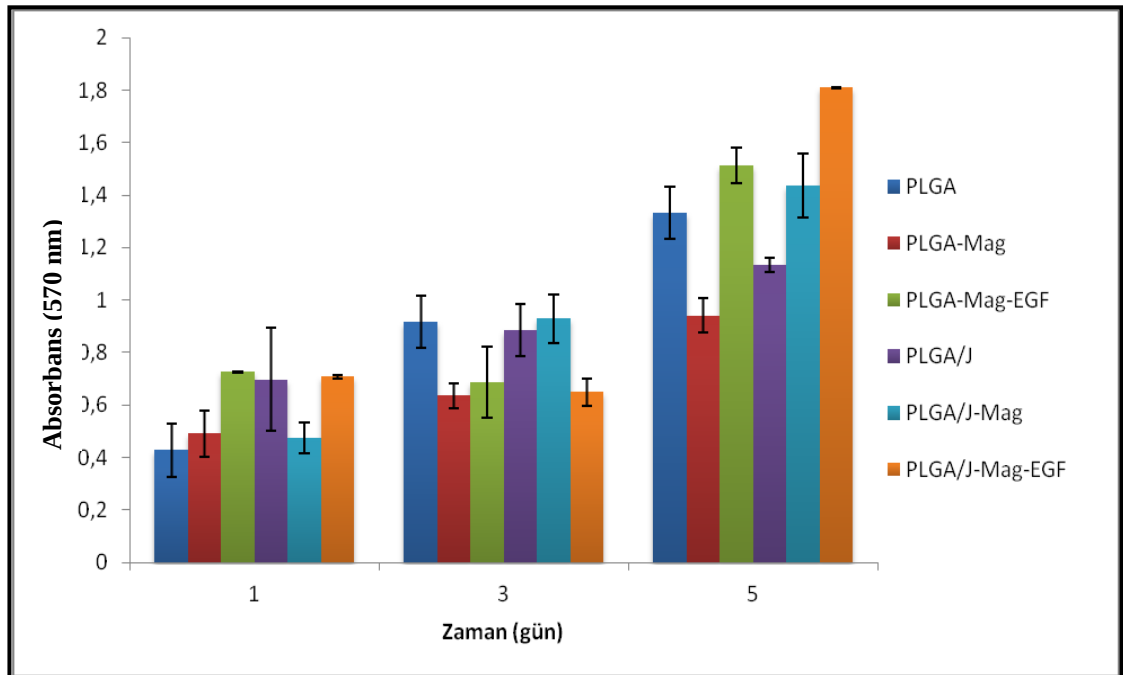
Şekil 4.26 incelendiğinde, 4 saatlik inkübasyon sonunda yüzeye tutunan hücre yoğunluklarının yaklaşık aynı olduğu, bununla birlikte EGF içeren biyoaktif membranlarda hücrelerin yayılmaya başladığı görülmektedir. EGF molekülünün erken dönemdeki bu etkisi hücrelerin membran yüzeyi ile entegrasyonu ve üremenin hızlanması açısından son derece önemlidir. Hücrelerin inkübasyonun ardından membran yüzeylerde yayılarak kuvvetli yapışma sağlaması bakterilerin yüzeye ulaşmasını ve enfeksiyon oluşumunu engellemede en önemli basamaklardan birini oluşturmaktadır.

Şekil 4.26 d-f’de **PLGA/J** bazlı membranlara ait SEM görüntüleri incelendiğinde jelatin yapısının hücre tutunması üzerindeki olumlu etkisi açıkça görülmektedir.

Hücre yapışmasının incelendiği çalışmalarda hemositometrik sayımdan elde edilen sonuçlar hücre tutunmasının %100 olduğunu göstermekle birlikte, SEM

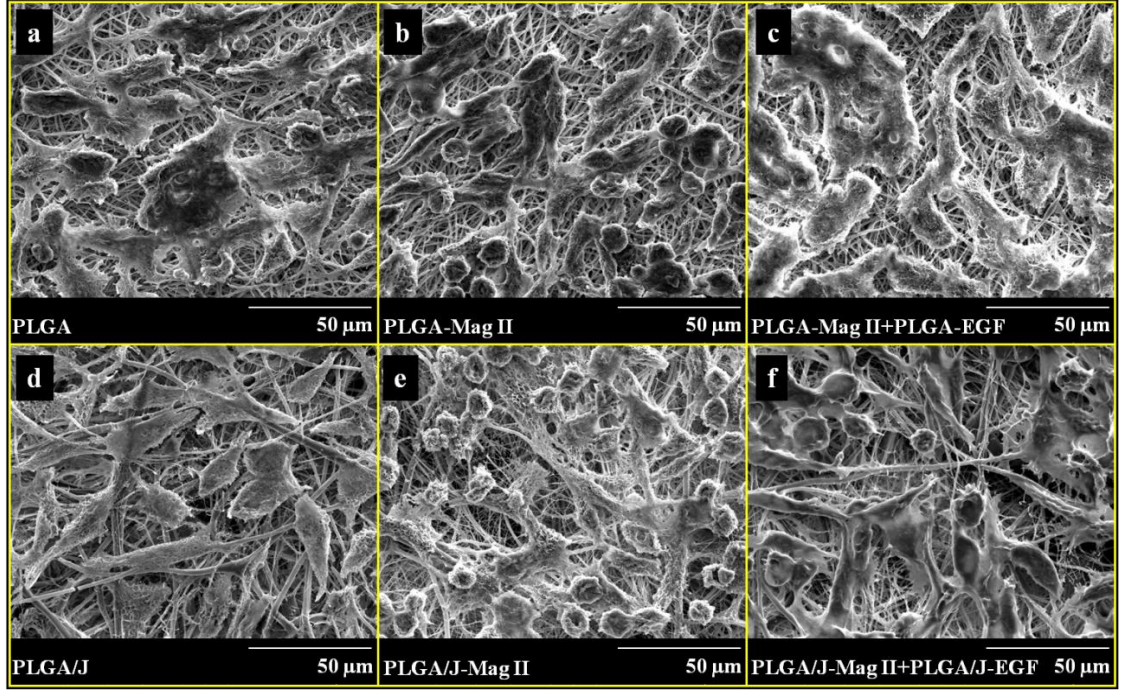
alışmalarından elde edilen sonuçlar EGF molekülünün varlığının ve **PLGA** yapısında bulunan jelatinin yüzeye tutunan hücre morfolojisi açısından önemli olduğu sonucunu ortaya koymaktadır.

Hücrel aktivitenin incelendiği çalışmaların ikinci bölümünde nanofibröz membranlar üzerindeki L929 fibroblastların üreme davranışı bölüm 3.11’de açıklanan MTT analizleri ile incelenmiştir. MTT analizlerinden elde edilen sonuçlar şekil 4.27’de verilmiştir.



Şekil 4.27 MTT analizi ile PLGA ve PLGA/J bazlı nanofibröz membranlar üzerindeki hücre canlılığının takibi

Şekil 4.27’de verilen MTT değeri incelendiğinde, 5 günlük hücre kültürü boyunca hücrelerin tüm membran yüzeylerde üremelerini sürdürdükleri görülmektedir. Bununla birlikte, EGF içeren biyoaktif tabakaya sahip olan çift tabakalı membranlarda hücre üremesi beklenen şekilde artış göstermiştir. EGF molekülün varlığı hem erken dönem hücre yapışmasında hem de hücre üremesinde etkin olmuştur.



Şekil 4.28 L929 fare fibroblastların PLGA ve PLGA/J bazlı membran yüzeylerindeki SEM görüntüleri (2. Gün) (x2000)

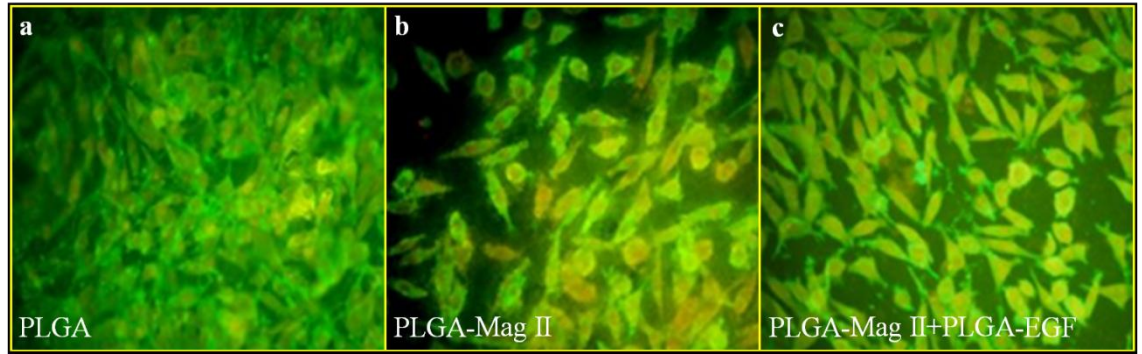
a. PLGA, b. PLGA-Mag II, c. PLGA-Mag II + PLGA-EGF
d. PLGA/J, e. PLGA/J-Mag II, f. PLGA/J-Mag II + PLGA/J-EGF

L929 fare fibroblast hücrelerinin nanofibröz membranlar üzerindeki morfolojik yapıları hücre kültürünün 2. gününde gerçekleştirilen SEM analizleri ile tayin edilmiştir. Şekil 4.28’de görünen şekilde ilk 4 saat sonunda tüm yüzeylere tutunan hücreler 2. gün sonunda nanofibröz membran yüzeylerde yayılmaya başlayarak çubuk benzeri fibroblast yapılarını kazanmaya başlamışlardır. Şekil 4.28’de verilen SEM görüntüleri incelendiğinde Mag II immobilize edilmiş yüzeyler dahil tüm membranlarda fibroblastik morfoloji açıkça görülmektedir. Bununla birlikte şekil 4.28 b’de Mag II immobilize edilmiş PLGA membran yüzeyde yayılmaya başlayan hücrelerin yanı sıra halen küresel formunu koruyan hücrelerin bulunduğu da görülmektedir. Buna karşın, EGF ile biyoaktifleştirilen ikinci tabakanın varlığı ile hücre yayılması önemli ölçüde artmış ve şekil 4.28 c’de görüldüğü şekilde tüm hücreler yüzeye yayılarak fibroblastik tabakayı oluşturmuşlardır. PLGA ile kıyaslandığında **PLGA-Mag II + PLGA-EGF** yüzeydeki hücre yoğunluğunun daha

fazla olduğu açıkça görülmektedir. Bu sonuç EGF molekülünün beklenen etkisidir ve MTT analizlerinden elde edilen sonuçlar ile uyumludur.

Şekil 4.28 d-f’de bulunan ve **PLGA/J** bazlı membranlara ait görüntüler incelendiğinde, yapıya katılan jelatinin hücre yayılmasında olumlu etki sağladığını söylemek mümkündür. Doğal bir polimer olan jelatinin yapıya katılması hücre tutunması ve yayılması açısından **PLGA** yapıya destek sağlamıştır.

L929 fare fibroblast hücrelerin **PLGA**, **PLGA-Mag II** ve **PLGA-Mag II + PLGA-EGF** membranlar üzerindeki yayılma davranışı ve fibroblastik morfolojileri floresan mikroskobu altında görüntülenmiştir. Elde edile görüntüler şekil 4.29’da sunulmuştur.



Şekil 4.29 L929 fare fibroblastların a. PLGA, b. PLGA-Mag II, c. PLGA-Mag II + PLGA-EGF membran yüzeyler üzerindeki floresan mikroskobu görüntüleri (x40) (2. gün)

Şekil 4.29 incelendiğinde, hücre yayılmasının **PLGA** nanofibröz membranlarda olduğu gibi (Şekil 4.29 a) Mag II immobilize edilmiş yüzeylerde de (Şekil 4.29 b) fibroblastik morfolojiye uygun olarak geliştiği görülmektedir. **PLGA-Mag II + PLGA-EGF** çift tabakalı membranlarda ise, EGF varlığının membran yüzeylere tutunan ve yayılan hücre sayısını önemli ölçüde arttırdığı görülmektedir (Şekil 4.29 c). Bu sonuçlar, MTT analizleri ve SEM görüntüleri ile uyumludur. Mag II hücre canlılığı üzerinde sitotoksik bir etki göstermezken, hücre morfolojisi ve fibroblastik yayılma üzerinde olumsuz bir etkiye neden olmamıştır.

5. SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasında, antimikrobiyal peptidlerin ve büyüme faktörlerinin yapıya katılmasıyla antimikrobiyal-biyoaktif membranların hazırlanmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır.

- Tez çalışması kapsamında ilk olarak elektroğirme tekniği kullanılarak gelişigüzel nanofiber PLGA ve PLGA/J (9:1) (w:w) membranları elde etmek amacıyla çalışmalar gerçekleştirilmiş ve en uygun elektroğirme koşulları **4 ml sa⁻¹** akış hızı, **18 kV** voltaj değeri ve **10 cm** toplayıcı uzaklığı olarak bulunmuştur. Elde edilen nanofiberlerin ortalama çapları PLGA ve PLGA/J membranlar için sırasıyla **715±45 nm** ve **625±225 nm** olarak hesaplanmıştır.
- Elde edilen nanofibröz membranlara Mag II'nin kovalent immobilizasyonu ile PLGA ve PLGA/J nanofibröz membran yüzeylerinde antimikrobiyal etkiye sahip bir tabaka oluşturulmuştur. Immobilizasyon işlemi sonucunda immobilizasyon verimliliğinin hesaplanması amacıyla floresan spektroskopisi ile analiz gerçekleştirilmiş ve PLGA membran üzerinde **0.2 µg/cm²** Mag II immobilize olduğu saptanmıştır.
- Mag II immobilizasyonu ile yüzeylere yapışan bakteri sayısında % ~50 oranında azalma sağlanmıştır. Böylelikle, PLGA bazlı yapılara antimikrobiyal özellik kazandırılması amacıyla antibiyotik kullanımı veya gümüş nanopartiküllerin yapıya katılması gibi sentetik yöntemlere önemli bir alternatif geliştirilmiştir. Bununla birlikte, Mag II immobilizasyonu PLGA bazlı membranların yüzeylerinde toksik etkiye neden olmamış, L929 fare fibroblast hücreleri yüzeylere yapışarak üremeye devam etmişlerdir. Sentetik bazlı yaklaşımlarda karşılaşılan toksite problemi, doğal kaynaklı Mag II varlığında gözlenmemiştir.
- Tez çalışması kapsamında çift tabakalı yapıyı oluşturmak amacıyla elektroğirme yöntemiyle EGF içeren PLGA ve PLGA/J membranın üretilmesi amacıyla çalışmalar yürütülmüştür. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda PLGA derişimi % 19.6 ve PLGA çözeltisinin EGF çözeltisine oranı **1.2 (v/v)** olarak bulunmuştur.

EGF içeren PLGA ve PLGA/J elektroegirme koşulları ise **3.5 ml sa⁻¹** akış hızı, **19 kV** voltaj değeri ve **10 cm** toplayıcı uzaklığı olarak bulunmuştur. Elde edilen nanofiberlerin ortalama çapları PLGA-EGF ve PLGA/J-EGF membranlar için sırasıyla **280±100 nm** ve **1090±90 nm** olarak hesaplanmıştır.

- PLGA ve PLGA/J membranların yapısına katılan EGF, hücre yapışması ve üremesini arttırıcı yönde etkiye neden olmuştur. Hem antimikrobiyal hem de biyoaktif özelliklerin bir arada bulunduğu çift tabakalı PLGA bazlı membranlarda, hızlı bir hücre yapışması ve üremesi gözlenirken, bakteriyel aktivitenin yavaşladığı ve yüzeylere tutunan bakteri sayısında azalma olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun yanı sıra EGF varlığının bakteri çoğalmasına herhangi bir etkisinin olması EGF varlığında yapılan çalışmalarda bakteri sayısının önemli ölçüde değişmediği sonucuna varılmıştır.
- Son olarak elde edilen çift tabakalı membran kullanılarak gerçekleştirilen EGF salım çalışması ELIZA testi kullanılarak analiz edilmiştir. Salım çalışması sonucunda EGF'in % ~45'inin hızlı salım (**burst release**) olarak salındığı ve kalan kısmının 14 günlük sürede salındığı sonucuna varılmıştır.

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında, antimikrobiyal peptid immobilizasyonu stratejisinin, hücre dışı matriks yapıya benzer yapıların elde edilebilmesi nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılan elektroegirme yöntemi ile elde edilen membran yapılarında da etkin olacağı sonucu ortaya çıkmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen bu temel sonuçlar, bakteri yapışmasının inhibe edildiği, sağlıklı hücrelerin ise aktif olduğu bifonksiyonel biyomalzemelerin geliştirilmesi için önem taşımaktadır. *In vitro* ortamlarda elde edilen bu sonuçlar, *in vivo* ortamda biyomalzeme yüzeyine doğru gerçekleşen 'yarışın' hücreler tarafından kazanılarak bakteri kolonizasyonunun ve buna bağlı enfeksiyonların önlenmesi için önemli bir model oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

(1) KİTAP

- Bilgehan, H. 2008. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Barış Yayınları, 622 s., İzmir.
- Domb, A., Kumat, N. and Ezra, A. 2011. Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development. Wiley, 752 p., New York.
- Ratner, B., Hoffman, A., Schoen, F. and Lemons, J. 2013. Biomaterials Science. Elsevier, 1573 p., New York.
- Sumbali, G. and Mehrotra, R.S. 2001. Principles of Microbiology. The McGraw-Hill Companies, 926 p., New Delhi.
- Tayar, M. ve Hecer, C. 2010. Gıda Mikrobiyolojisi. Dora Basım-Yayın-Dağıtım, 253 s., Bursa.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L. 2012. Microbiology: An Introduction. Benjamin-Cummings Publishing Company, 960 p., New York.
- Tunail, N. 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, 434 s., Ankara

(2) DERGİ

- Akman, A.C., Tıǧlı, R.S., Gümüşderelioǧlu, M. and Nohutçu, R.M. 2010. Bone Morphogenetic Protein-6-loaded Chitosan Scaffolds Enhance the Osteoblastic Characteristics of MC3T3-E1 Cells. Artificial Organs, 34; 65-74.
- Al-Bataineh, S.A., Luginbuehl, R., Textor, M. and Yan, M. 2009. Covalent immobilization of antibacterial furanones via photochemical activation of perfluorophenylazide. Langmuir, 25; 7432-7437.
- Alemdaroǧlu, C., Deǧim, Z., Çelebi, N., Zor, F., Öztürk, S. and Erdoğan, D. 2006. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. Burns, 32; 319-327.
- Ayvazyan, A., Morimoto, N., Kanda, N., Takemoto, S., Kawai, K., Sakamoto, Y., Taira, T., Suzuki, S. 2011. Collagen-Gelatin scaffold impregnated with bFGF accelerates palatal wound healing of palatal mucosa in dogs. Journal of Surgical Research, 171; 247-257.

- Bagheri, M., Beyerman, M. and Dathe, M. 2009. Immobilization reduces the activity of surface-bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53; 1132-1141.
- Bechinger, B., Zasloff, M. and Opella S.J. 1993. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Science*, 2; 2077-2084.
- Buchko C.J., Chen L.C., Shen Y. and Martin D.C. 1999. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer*, 40; 7397–7407.
- Can, C. ve Körlü, A. 2011. Antibakteriyal Tekstil Üretiminde Sıkça Kullanılan Gümüşün Etki Mekanizması Ve Toksisitesi. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5; 54-59.
- Chen, R., Cole, N., Wilcox, M., Park, J., Rasul, R., Carter, E. and Kumar, N. 2009. Synthesis, characterization and in vitro activity of a surface attached antimicrobial cationic peptide. *Biofouling*, 25; 517-524.
- Chen, G., Xia, Y., Lu, X., Zhou, X., Zhang, F. and Gu, N. 2013. Effects of surface functionalization of PLGA membranes for guided bone regeneration on proliferation and behaviour of osteoblasts. *Journal of Biomedical Research Part A*, 101; 44-53.
- Chung, D.W., Papadakis, S.E. and Yam, K.L. 2003. Evaluation of a polymer coating containing triclosan as the antimicrobial layer for packaging material. *International Journal of Food Science and Technology*, 38; 165-169.
- Costa, F., Carvalho, I.F., Montelaro, R.C., Gomes, P. and Martins M.C. 2011. Covalent immobilization of antimicrobial peptides onto biomaterial surfaces. *Acta Biomaterialia*, 7; 1431-1440.
- Darouiche, R.O. 2004. Treatment of infections associated with surgical implants. *The New England Journal of Medicine*, 350; 1422-1429.
- de Carvalho, C.C. 2007. Biofilms: recent developments on an old battle. *Recent Patents on Biotechnology*, 1; 49-57.
- Dorati, R., Colonna, C., Genta, I., Modena, T. and Conti, B. 2010. Effect of porogen on the physico-chemical properties and degradation performance on PLGA scaffolds. *Polymer Degradation and Stability*, 95; 694-701.

- Gabriel, M., Nazmi, K., Veerman, E.C., Amerongen, G. and Zentner, A. 2006. Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity. *Bioconjugate Chemistry*, 17; 548-550.
- Gallardo-Moreno, A.M., Pacha-Olivenza, M.A., Saldana, L., Perez-Giraldo, C., Bruque, J.M. and Vilaboa, N. 2009. In vitro biocompatibility and bacterial adhesion of physic-chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV radiation. *Acta Biomaterialia*, 5; 181-192.
- Gao, G., Lange, D., Hilpert, K., Kindrachuk, J., Zou, Y., Cheng, J.T.J., Kazemzadeh-Narbat, M., Yu, K., Wang, R., Straus, S.K., Brooks, D.E., Chew, B.E., Hancock, R.E.W. and Kizhakkedathu, J.N. 2011. The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides. *Biomaterials*, 32; 3899-3909.
- Glinel, K., Jonas, A.M., Jouenne, T., Leprince, J., Galas, L. and Huck, W. 2009. Antimicrobial and antifouling polymer brushes incorporating antimicrobial peptide. *Bioconjugate*, 20; 71-77.
- Glinel, K., Thebault, P., Humblot, V., Pradier, C.M. and Jouenne T. 2012. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomaterialia*, 8; 1670-1684.
- Gristina, A.G. 1987. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*, 237; 1588-1595.
- Guarda, A., Rubilar, J.F., Miltz, J. and Galotto, M.J. 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146; 144-150.
- Han, J., Lazarovici, P., Pomerantz, C., Chen, X., Wei, Y. and Lelkes, P. 2011. Co-electrospun blends of PLGA, gelatin and elastin as potential nonthrombogenic scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomacromolecules*, 12; 399-408.
- Harbers, G.M., Emoto, K., Greef, C., Metzger, S.W., Woodward, H.N. and Mascali, J.J. 2007. A functionalized poly(ethylene glycol) based bioassay surface chemistry that facilitates bio-immobilization and inhibits non-specific protein, bacterial and mammalian cell adhesion. *Chemistry of Materials*, 19; 4405-4414.

- Hardwicke, J., Schmaljohan, D., Boyce, D. and Thomas, D. 2008. Epidermal growth factor therapy and wound healing-past present and future perspectives. *Surgeon*, 1; 172-177.
- Haynie, S.L., Crum, G.A. and Doele, B.A. 1995. Antimicrobial activity of amphiphilic peptides covalently bonded to a water-insoluble resin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39; 301-307.
- Hequet, A., Humblot, V., Berjeaud, J. and Pradier C. 2011. Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84; 301-309.
- Hetrick, E.M. and Sochoenfish, M.H. 2006. Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chemical Society Reviews*, 35; 780-789.
- Hilpert, K., Elliott, M., Jenssen, H., Kindrachuk, J., Christopher, D., Körner, J., Winkler, D., Weaver, L., Henklein, P., Ulrich, A., Chiang, S., Farmer, S., Pante, N., Volkmer, R. and Hancock, R. 2009. Screening and characterization of surface-tethered cationic peptides for antimicrobial activity. *Chemistry&Biology*, 16; 58-69.
- Hong K.H. 2007. Preparation and properties of electrospun poly(vinyl alcohol)/silver fiber web as wound dressings. *Polymer Engineering and Science*, 47; 43–49.
- Humblot, V., Yala, J., Thebault, P., Boukerma, K., Hequet, A., Berjeaud, J. and Pradier, C. 2009. The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols self-assembled monolayers. *Biomaterials*, 30; 3503-3512.
- Inoguchi, H., Tanaka, T., Maehara, Y. and Matsuda, T. 2007. The effect of gradually graded shear stress on the morphological integrity of a huvec-seeded compliant small diameter vascular graft. *Biomaterials*, 28; 486-495.
- Ito, Y. and Chen, G. 2001. Gradient micropattern immobilization of EGF to investigate the effect of artificial juxtacrine stimulation. *Biomaterials*, 22; 2453-2456.
- Jose, B., Antoci, V., Zeiger, A.R., Wickstrom, E. and Hickok, N.J. 2005. Vancomycin covalently bonded to titanium beads kills *Staphylococcus aureus*. *Chemistry&Biology*, 12; 1041-1048.

- Judith, R., Nithya, M., Rose, C. and Mandal, A. 2010. Application of a PDGF-containing novel gel for cutaneous wound healing. *Life Sciences*, 87; 1-8.
- Kang, H., Tabata, Y. and Ikada, Y. 1999. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 20; 1339-1344.
- Kim, Y., Seo, S., Moon, H., Yo, M., Park, Y., Kim, B. and Cho, C. 2008. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 26; 1-21.
- Kilic, D., Agalar, C., Ozturk, E., Denkbaz, E.B., Cime, A. and Agalar, F. 2007. Antimicrobial activity of cefazolin-impregnated mesh grafts. *ANZ Journal of Surgery*, 77; 256-260.
- Li, B., Davidson, J. and Guelcher, S. 2009. The effect of the local delivery of platelet-derived growth factor from reactive two-component polyurethane scaffolds on the healing in rat skin. *Biomaterials*, 30; 3486-3494.
- Li, M., Mondrinos, M.J., Chen, X., Gandhi, M.R., Ko, F.K. and Lelkes, P.I. 2006. Co-electrospun poly(lactide-co-glycolide), gelatin and elastin blends for tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 79A; 963-973.
- Liu, S., Zhao, J., Ruan, H., Wang, W., Wu, T., Cui, W. and Fan, C. 2013. Antibacterial and anti-adhesion effects of the silver nanoparticles-loaded poly(L-lactide) fibrous membrane. *Materials Science and Engineering C*, 33; 1176-1182.
- Makadia, H.K. and Siegel S.J. 2011. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3; 1377-1397.
- Martins, M.C., Wang, D., Ji, J., Feng, L. and Barbosa, M.A. 2003. Albumin and fibrinogen adsorption on cibacron blue F3G-A immobilized onto PU-PHEMA surfaces. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 14; 439-455.
- Meng, Z., Wang, Y., Ma, C., Zheng, W., Li, L. and Zheng Y. 2010. Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, 30; 1204-1210.

- Mou, Z.L., Zhao, L., Zhang, Q., Zhang, J. and Qi Zhang Z. 2011. Preparation of porous PLGA/HA/collagen scaffolds with supercritical CO₂ and application in osteoblast cell culture. *The Journal of Supercritical Fluids*, 58; 398-406.
- Moriarty, T.F., Poulsson, A.H.C., Rochford, E.T.J. and Richards, R.G. 2011. Bacterial Adhesion and Biomaterial Surfaces. *Comprehensive Biomaterials*, 4; 75-100.
- Nie, H., Khew, S.K., Lee, Y.L., Poh, K.L., Tong, Y.W. and Wang, C.H. 2009. Lysine-based peptide functionalized PLGA foams for controlled DNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 138; 64-70.
- Reddy, K.V., Yedery, R.D. and Aranha, C. 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24; 536-547.
- Ruggeri, V., Francolini, I., Donelli, G. and Piozzi, A. 2007. Synthesis, characterization, and *in vitro* activity of antibiotic releasing polyurethanes to prevent bacterial resistance. *Journal of Biomedical Research Part A*, 81A; 287-298.
- Sahoo, S., Toh, S.L. and Goh, J.C.H. 2010. A bFGF-releasing silk/PLGA based biohybrid scaffold for ligament/tendon tissue engineering using mesencymal progenitor cells. *Biomaterials*, 31; 2990-2998.
- Said, S.S., Aloufy, A.K., El-Halfawy, O.M., Boraei, N.A. and El-Khordagui, L.K. 2011. Antimicrobial PLGA ultrafine fibers: interaction with wound bacteria. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79; 108-118.
- Sill, T. and von Recum, A.H. 2008. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29; 1989-2006.
- Simsek, M., Capkın, M., Karakeçili, A. and Gumusderelioglu, M. 2012. Chitosan and polycaprolactone membranes patterned via electrospinning: Effect of underlying chemistry and pattern characteristics on epithelial/fibroblastic cell behavior. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 100A; 3332-3343.
- Singla, A.K. and Chawla, M. 2001. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53; 1047-1067.

- Steven, M.D. and Hotchkiss, J.H. 2008. Covalent immobilization of an antimicrobial peptide on polyethylene film. *Journal of Applied Polymer Science*, 110; 2665-2670.
- Tıǧlı, S., Kazaroǧlu, M., Maviş, B. and Gümüşderelioǧlu, M. 2011. Cellular Behavior on Epidermal Growth Factor (EGF)-Immobilized PCL/Gelatin Nanofibrous Scaffolds. *Journal of Biomaterials Science*, 22; 207-223.
- Toncheva, A., Paneva, D., Maximova, V., Manolova, N. and Rashkov, I. 2012. Antibacterial fluoroquinolone antibiotic-containing fibrous materials from poly(L-lactide-co-D,L-lactide) prepared by electrospinning. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 47; 642-651.
- Van't Hof, W., Veerman, E.C., Helmerhorst, E.J. and Amerongen, A.V. 2001. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *The Journal of Biological Chemistry*, 382; 597-619.
- Vila, J., Soriano, A. and Mensa, J. 2008. Molecular basis of microbial adherence to prosthetic materials. Role of biofilms in prosthesis-associated infection. *Enfermedades Infecciosas Microbiologia Clinica*, 26; 48-54.
- Wang, Q., Huang, C., Xue, M. and Zhang, X. 2011. Expression of endogenous BMP-2 in periosteal progenitor cells is essential for bone healing. *Bone*, 48; 524-532.
- Wang, X.H., Li, D.P., Wang, W.J., Feng, Q.L., Cui, F.Z., Xu, Y.X. and Song, X.H. 2003. Covalent immobilization of chitosan heparin on PLGA surface. *International Journal of Biological Macromolecules*, 33; 95-100.
- Wilcox, M.D.P., Hume, E.B.H., Aliwarga, Y., Kumar, N. and Cole, N. 2008. A novel cationic-peptide coating for the prevention of microbial colonization on contact lenses. *Journal of Applied Microbiology*, 105; 1817-1825.
- Xie, L., Zhang, M., Dong, B., Guan, M., Lu, M., Huang, Z., Gao, H. and Li, X. 2011. Improved refractory wound healing with administration of acidic fibroblast growth factor in diabetic rats. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 93; 396-403.
- Xing, Z., Chae, W., Baek, J., Choi, M., Jung, Y. and Kang, I. 2010. In vitro assesment of antibacterial activity cytocompatibility of silver containing phbv

nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Biomacromolecules*, 11; 1248-1253.

Yallapu, M.M., Gupta, B.K., Jaggi, M. and Chauhan, S.C. 2010. Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *Journal of Colloid and Interface Science*, 351; 19-29.

Yuan, S., Wan, D., Liang B., Pehkonen, O., Ting, Y.P., Neoh, K.G. and Kang, E.T. 2011. Lysozyme-coupled poly(poly(ethylene glycol) methacrylate)-stainless steel hybrids and their antifouling and antibacterial surfaces. *Langmuir*, 27; 2761-2744.

Zahadi, P., Rezaeian, I., Saidat, S., Jafari, S. and Supaphol, P. 2010. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymer Advanced Technology*, 21; 77-95.

(3) TEZ

Karakeçili, A. 2006. Mikrodesenli Biyoaktif Malzemelerin Dizaynı, Karakterizasyonu ve Doku Mühendisliğindeki Uygulamaları. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emre YÜKSEL

Doğum Yeri : Aydın

Doğum Tarihi : 09.09.1988

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Aydın Efeler Lisesi (2002 – 2005)

Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği
Bölümü (2005 – 2010)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği
Anabilim Dalı (Şubat 2011 – Temmuz 2014)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar

1. Baştaş Başkent Çimento Sanayi ve Ticaret A.Ş (Staj; Eylül 2008)
2. 111M640 Numaralı TUBİTAK 1001 Projesi (Bursiyer, Nisan 2012 - Eylül 2013)
3. Orica-Nitro Patlayıcı Sanayi ve Ticaret A.Ş (Vardiya Mühendisi, Ocak 2014 -)

Bildiri, Sunum ve Yayınlar

1. 9. Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 24-28 Haziran 2013, Sözlü Sunum
2. 1st International Symposium on Nanoparticles/Nanomaterials and Applications, Lisbon, Portekiz, 20-22 Ocak 2014, Poster Sunumu