

**Diatom Silika İskeletleri ile Güçlendirilmiş
Polihidroksibutirat-kohidroksivalerat/Pullulan Üç Boyutlu
Doku İskelelerinin Kemik Doku Mühendisliğinde
Kullanılabilirliğinin Araştırılması**

Program Kodu: 1001

Proje No: 215M893

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Dilek KESKİN

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Ayşen TEZCANER

Prof. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ

Bursiyerler:

Ali Deniz DALGIÇ

Deniz ATİLA

Ezgi KOMAN

M. Bahadır GÜNER

ARALIK 2018

ANKARA

ÖNSÖZ

Projede, doğal olarak elde edilebilen malzemeler kullanılarak, birlikte elektroçirme yöntemiyle, hidrofilik ve hidrofobik fiberlerden oluşan, üç boyutlu, kemik doku mühendisliğine yönelik yeni bir taşıyıcı üretilmiştir. Taşıyıcının hidrofobik fazı temelde PHBV fiberler ile oluşturulup, az miktarda PCL ile desteklenirken, hidrofilik faz, pullulan (PUL) fiberleri ile oluşturulmuştur. Böylece, taşıyıcılara biyouyumluluk, biyobozunurlu, mekanik dayanım, kararlılık, değişik biyoaktif ajan/bileşen eklenebilirlik gibi farklı özellikleri birlikte kazandırabilmek amaçlanmıştır. PUL fiberlerinin fiber yapısını koruyarak çapraz bağlanabilmesi için proje kapsamında yeni bir yöntem sunulmuştur. Taşıyıcının PUL fiberlerine diatom silika kabukları (DS) hapsedilmiş ve fiber çapından daha büyük olan bu kabukların yapıyı bozmadan elektroçirilebileceği gösterilmiştir. Proje TÜBİTAK 1001 projesi (215M893) kapsamında TÜBİTAK'ın mali desteği ile yapılmıştır. Proje kapsamında, İTÜ, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde (Prof. Dr. Ayten Yazgan Karataş'ın laboratuvarı'nda) *Cupriavidus necator* bakteri suşu ile PHBV üretilmesi ve valerat yüzdesi optimize edilmiştir. Bakteriyel olarak üretilen PHBV (B-PHBV) ile hazırlanan taşıyıcının özellikleri, ticari olarak satın alınan PHBV ile üretilen taşıyıcının özellikleriyle karşılaştırılmıştır. Doğal olarak üretilen bu polimerin ülkemizde üretilip doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabileceği gösterilmiştir. Projede, farklı kompozisyonlarda taşıyıcıların üretimi, karakterizasyonu ve hücre kültürü deneyleri ODTÜ Mühendislik Bilimleri Bölümü, Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Üretilen taşıyıcıların hücre canlılığını desteklediği, fiberlere DS eklendiğinde Saos-2 hücre canlılığının arttığı ve PUL fiberlerinin L929 fibroblast canlılığını büyük ölçüde arttırdığı gözlenmiştir. Ülkemizde de kizelgur (Diatom toprağı) olarak bulunan, tek hücreli bir alg tarafından üretilen DS yapısının kemik doku mühendisliğinde kullanılabileceği de proje kapsamında gösterilmiştir. Üretilen üç boyutlu taşıyıcı ile, DS yapısının ve birlikte elektroçirme sisteminin kemik doku mühendisliğine uygun taşıyıcılar üretilebileceği kanıtlanmıştır. Doğal malzemelerle üretilen bu taşıyıcının polimer ve DS yapısının önemli kısmının ülkemizde de kaynakları olan malzemeler ile üretilmiş olması, yerli olarak üretilebilmesi açısından olumlu bir sonuçtur.

Proje kapsamında yapılan araştırmaların ulusal (BİOMEDTR 2018, poster sunumu) ve uluslararası (ISBPPB 2018, sözlü sunum) kongrelerde bildiri ile sunulmuştur. Ayrıca, projenin ilk bölümü bilimsel bir dergide özgün bilimsel yayın olarak ilk değerlendirme aşamasını geçmiş ve revizyon almıştır. Projenin 2. Kısmı ile ilgili makale hazırlanma aşamasındadır.

Proje kapsamındaki araştırmalar 1 doktora tezi araştırmalarını oluşturmaktadır. Proje, biyomalzemeler alanında yeni araştırmacıların yetişmesine olanak sağlamıştır. Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı-1001 kapsamında projemizi destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK'a) teşekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ	3
2. LİTERATÜR ÖZETİ	6
3. GEREÇ ve YÖNTEM	10
3.1 Malzemeler.....	10
3.2 Diatom Silika Kabuklarının (DS) Saflaştırma Amacıyla Geçirildiği Ön İşlemler.....	10
3.2.1 DS Kabuklarının Saflaştırılması.....	10
3.2.2 Farklı Boyutta Diatom Silika Parçacıklarının Eldesi.....	11
3.3 DS Kabuklarının Karakterizasyonu.....	12
3.3.1 Parçacık Boyut Dağılımı Analizi.....	12
3.3.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Morfolojisi Analizi.....	12
3.3.3 DS Kabuklarının Kimyasal Analiz için Elektron Spektroskopisi (ESCA).....	12
3.3.4 MTT Hücre Canlılık Deneyi.....	12
3.3.5 DS Kabuklarının Hücre Uyumluluklarının Belirlenmesi (Ekstrak Testi).....	13
3.3.6 Direkt Film Canlılık Testi.....	13
3.4. PHBV/PCL/SA:PUL/DS Taşıyıcıların Üretimi.....	14
3.5 PHBV/PCL/SA:PUL/DS Hücre Taşıyıcıların Karakterizasyonları.....	14
3.5.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi ve EDX Analizi.....	14
3.5.2 Gözeneklilik Analizi.....	15
3.5.3 Bozunma ve Su tutma Analizi.....	15
3.5.4 Biyomineralizasyon Analizi.....	15
3.5.5 Mekanik Çekme ve Basma Testi.....	16
3.5.6 Antibiyotik Yüklenme Etkinliği ve Antibiyotik Salım Profillerinin İncelenmesi.....	16
3.6 Hücre Kültürü Deneyleri.....	17
3.6.1 Alamar Mavisi Canlılık Testi.....	18
3.6.2 Alkalin Fosfataz Aktivite Testi.....	18
3.6.3 SEM ile Hücre Morfolojisi ve Tutunması Analizi.....	19
3.6.4 Konfokal Mikroskobu ile Hücre Morfolojisi ve Dağılımı Analizi.....	20
3.7 PHBV Polimerinin Bakteri Suşunda Üretimi ve Özelliklerinin İncelenmesi.....	20
3.7.1 PHBV Polimerinin Bakteri Suşunda Üretimi ve Saflaştırılması.....	20
3.7.2 Hidrojen Sıvı Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (H-NMR).....	22
3.7.3 Üretilen PHBV Polimerinin Valerat Yüzdesinin Hesaplanması.....	23

3.7.4 Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	23
3.7.5 Termogravimetrik Analizler, Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC).....	23
3.7.6 Saflaştırılan Bakteriyel PHBV Polimerinde Bakteriyel Protein Kirliliğinin BCA Testi ile Araştırılması.....	23
3.8 Bakteriyel PHBV kullanılarak B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS Taşıyıcıların Üretimi.....	23
3.9 B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS Taşıyıcıların Karakterizasyonları.....	24
3.10 İstatistiksel Analizler.....	24
4. BULGULAR ve TARTIŞMALAR.....	24
4.1 Diatom Silika Kabuklarının Saflaştırılması ile İlgili Bulgular.....	24
4.2 Diatom Silika Kabuklarının Parçalanarak Farklı Boyutta Örnekler Oluşturulması.....	25
4.3 Antibiyotik Yükleme ve Salım Ön Çalışmalarının Sonuçları.....	29
4.4 PHBV/PCL ve PUL/DS Fiberlerinin Bağımsız Olarak Üretimi.....	30
4.4.1 Elektroçirime ile DS Taşıyan Pullulan (PUL) Fiberlerinin Oluşturulmasının Optimizasyonu.....	30
4.4.2 Elektroçirime ile Üç Boyutlu PHBV/PCL Fiberlerin Oluşturulmasının Optimizasyonu.....	32
4.4.3 Elektroçirime ile PHBV/PCL Fiber ve DS Yüklü PUL Fiber İçeren Üç Boyutlu Taşıyıcıların Oluşturulması.....	37
4.5. Hücre Canlılık Ön Denemelerinin Sonuçları.....	38
4.6. Bakteriden PHBV Üretimi Ön Denemeleri ve Optimizasyonu.....	44
4.7 PHBV Polimerinin <i>Cupriavidus necator</i> Bakteri Suşunda Üretimi ve Karakterizasyonu ile İlgili Sonuçlar.....	47
4.7.1 PHBV Polimerinin <i>Cupriavidus necator</i> Bakteri Suşunda Üretimi ve Saflaştırılması Sonuçları.....	47
4.7.2. Hidrojen Sıvı Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (H-NMR) Sonuçları.....	50
4.7.3 Üretilen PHBV Polimerinin Valerat Yüzdesinin Hesaplanması ile İlgili Bulgular.....	51
4.7.4 Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Bulguları.....	51
4.7.5 Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizleri ile İlgili Bulgular.....	52
4.7.6 Saflaştırılan Bakteriyel PHBV Polimerinde Bakteriyel Protein Tayini ile İlgili Bulgular.....	53
4.7.7 Saflaştırılan Bakteriyel PHBV Polimerinin Viskozitesinin Araştırılması	54
4.8 SA Yüklü PHBV/PCL ve DS Kabukları Yüklü PUL Fiberleri İçeren	

Üç Boyutlu Taşıyıcıların Oluşturulması ile İlgili Bulgular.....	54
4.8.1 PUL Fiberlerin Çapraz Bağlanması Optimizasyonu.....	54
4.9 SA Yüklü PHBV/PCL ve DS Kabukları Yüklü PUL Fiberleri İçeren	
Üç Boyutlu Taşıyıcıların Özellikleri.....	59
4.9.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Sonuçları.....	59
4.9.2 Gözeneklilik Analizi Sonuçları.....	60
4.9.3. Bozunma ve Su Tutma Analizi Sonuçları.....	62
4.9.4. Biyomineralizasyon Analizi Sonuçları.....	63
4.9.5. Mekanik Çekme ve Basma Testi Sonuçları.....	64
4.9.6. B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS Grubu Antibiyotik Yüklenme	
Etkinliğinin ve Antibiyotik Salım Profilinin İncelenmesi.....	66
4.10 Hücre Kültürü Deneyleri ile İlgili Bulgular.....	67
4.10.1 Taşıyıcılar Üzerinde Hücre Canlılığı ve Çoğalması Bulguları.....	67
4.10.2 Taşıyıcılar Üzerinde Hücre Tutunması ve Morfolojisi Bulguları.....	70
4.10.3 Taşıyıcılar Üzerinde Hücre Farklılaşması Analizleri ile İlgili Bulgular.....	72
4.10.4 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu ile Hücre Morfolojisi	
ve Dağılımı Analizi Sonuçları.....	74
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	75
6. KAYNAKÇA.....	77

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1.** Yüzey element kompozisyonu (%).....29
- Tablo 2.** PUL fiberlerinin çapraz bağlanması sırasında yapılan işlemler. Tabloda yer alan kısaltmalar: PBS = PBS içerisinde bekleterek bozunma seviyesinin ölçümü; 24°C = Oda sıcaklığında kurutma işlemi; L = Liyofilizasyon işlemi; 60°C = in situ GTA çapraz bağlama işleminin yüksek sıcaklıkta gerçekleşen kısmının tamamlanması; GTA = GTA ile çapraz bağlama işlemi. Tablodaki gruplar ilk aşamada GTA (1-9 arası gruplar) veya STMP (10-15 arası gruplar) ile çapraz bağlanmalarına göre ikiye ayrılmıştır ve ilk kolonda belirtilmiştir. Bu ilk çapraz bağlama sonrasında takip eden işlemler tabloda işaretlenmiştir.....56
- Tablo 3.** Çekme kuvveti testine tabi tutulan taşıyıcıların Young Modülü ve nihai çekme dayanımı değerleri. α : PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS gruplarının Young Modülü değerlerinin diğer gruplara göre istatistiksel anlamlı farkları. $p<0.05$; β : PHBV/PCL grubunun nihai çekme dayanımının PHBV/PCL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS gruplarının nihai çekme dayanımından istatistiksel anlamlı farkı ($p<0.05$).....65
- Tablo 4.** Basma kuvveti testine tabi tutulan taşıyıcıların Young Modülü ve % 70 oranında basma sonrasında basma dayanımı değerleri α : B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubunun Young Modülü değerlerinin diğer gruplara göre istatistiksel anlamlı farkı. β : B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubunun nihai çekme dayanımının PHBV/PCL ve PHBV/PCL/DS gruplarının nihai çekme dayanımından istatistiksel anlamlı farkı ($p<0.05$).....66

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Farklı türde diatom silika kabuklarının ışık mikroskopuyla çekilmiş görüntüsü (Resim Faull, 2015, yazısından alınmıştır).....	3
Şekil 2. PHBV ve PUL polimerlerinin kimyasal formülleri (Weng vd., 2010; Ferreira vd., 2015).....	11
Şekil 3. Safılaştırma işlemine tabi tutulmuş kizelgur'un 5000x (sol) ve 50000x (sağ) büyütme ile SEM görüntüleri.....	24
Şekil 4. Satın alınan tatlı su DS kabuklarının başlangıç(sol) ve safılaştırma işlemi sonrasında (sağ) ışık mikroskobu görüntüsü.....	25
Şekil 5. Bazik (NaOH ile) parçalama işlemine tabi tutulmuş DS kabuklarının 10000x (sol) ve 100 000x (sağ) büyütme ile SEM görüntüleri.....	25
Şekil 6. Öğütülme işlemi öncesi (sol) ve 15 dakika öğütülme işlemi sonrasında (sağ) DS kabuklarının SEM görüntüleri.....	26
Şekil 7. Agat öğütücü ile 1 (a), 5 (b), 10 (c) ve 15 (d) dakika öğütülmüş DS kabuk numunelerinin ışık mikroskobu görüntüleri (10X). Öğütme sonrası ortalama parça boyutları, $\approx 12 \mu\text{m}$ (a), $\approx 8 \mu\text{m}$ (b), $\approx 4 \mu\text{m}$ (c) ve $\approx 3 \mu\text{m}$ (d) şeklindedir.....	27
Şekil 8. DS kabuklarının 6000x (sol) ve 24000x (sağ) büyütme ile SEM görüntüleri.....	27
Şekil 9. DS kabuklarının EDX sonucundaki element dağılım grafiği (Sol) ve element oranı analiz tablosu (Sağ).....	28
Şekil 10. DS kabuklarının 1 (a), 5 (b), 10 (c) ve 15 dk (d) öğütme sonrasında parçacık boyut dağılımları.....	28
Şekil 11. Sefuroksime aksetil için hazırlanan kalibrasyon eğrisi.....	29
Şekil 12. Sefuroksim'in DS kabukları ve PHBV:PCL fiber taşıyıcılardan salım profili.....	30
Şekil 13. Elektroeğrilmiş PUL/DS (5/1) yapıların 1000X (sol) ve 4000X (sağ) büyütme ile SEM görüntüleri.....	31
Şekil 14. PUL fiberler içine hapsedilmiş DS kabuklarının EDX analizi sonucunda element dağılım grafiği (Sol) ve element oranı analiz tablosu (Sağ).....	32
Şekil 15. Serpme yöntemi kullanılarak elektroeğrilmiş PUL/DS (5/1) yapıların 4000X (sol) ve 1000X (sağ) büyütme ile SEM görüntüleri.....	32
Şekil 16. Kloroform çözücüsü kullanılarak kuru (sol) ve ıslak (sağ) elektroeğirme yöntemleri ile üretilmiş PHBV yapıların SEM görüntüleri.....	33
Şekil 17. Kloroform/asetik asit (1/1) çözücüsü kullanılarak kuru (sol) ve kloroform/HFIP (1/1) kullanılarak (sağ) elektroeğirme yöntemleri ile üretilmiş PHBV yapıların SEM görüntüleri.....	33
Şekil 18. Yapraksı halde (sol) ve toz halde (sağ) PHBV kaynakları kullanılarak üretilen elektroeğrilmiş fiberlerin SEM görüntüleri.....	34

Şekil 19. Farklı fiziksel yapıdaki ve farklı saflaştırma aşamalarının uygulandığı PHBV'lerin H-NMR görüntüsü; yapraksı halde PHBV(a), toz halde PHBV (b), kloroform ile kaynatılarak saflaştırma işlemi uygulanmış yapraksı haldeki PHBV (c) ve klorit ile yıkandıktan sonra kloroform ile kaynatılarak saflaştırma işlemi uygulanmış yapraksı haldeki PHBV (d).....	35
Şekil 20. Yapraksı haldeki PHBV (a), toz haldeki PHBV (b), sadece kloroform ile kaynatılarak saflaştırılan yapraksı PHBV (c) ve klor ile yıkandıktan sonra kloroform ile kaynatılarak saflaştırılan PHBV'nin (d) DSC grafikleri.....	36
Şekil 21. PHBV ve PCL ile farklı oranlarda hazırlanmış elektroğrılmış taşıyıcı yapılarının SEM görüntüleri; PHBV:PCL oranı 9:1 (sol), 8:2 (orta) ve 7:3 (sağ).....	37
Şekil 22. Birlikte eğirme yöntemi kullanılarak elektroğrılmış PHBV/PCL:PUL/DS taşıyıcıların 1000X (sol) ve 5000X (sağ) büyütme ile SEM görüntüleri.....	38
Şekil 23. Yapraksı (Pulsu) ve toz yapıdaki PHBV'lerin alamar mavisi canlılık deney sonuçları. Hücre canlılık yüzdeleri sadece hücre olan kontrol grubuna göre hesaplanmıştır.....	38
Şekil 24. DS kabuklarının farklı konsantrasyonlarının, 1 gün (sol) ve 2 gün (sağ) inkübasyon sonunda, hücre canlılığı üzerindeki etkisinin MTT ile incelenmesi sonucunda sadece hücre içeren kontrol grubuna göre hesaplanmış canlılık yüzdeleri. İstatistiksel olarak farklı gruplar α , β , γ olarak belirtilmiştir ($p < 0.05$, $n=5$).....	39
Şekil 25. Bütün haldeki DS kabuklarının (üst) ve öğütülmüş DS kabuklarının (alt) MTT ile belirlenmiş hücre canlılığı grafikleri. Canlılık yüzdeleri sadece hücre içeren kontrol grubuna oranla hesaplanmıştır.....	40
Şekil 26. Bütün haldeki DS kabuklarının (üst) ve öğütülmüş DS kabuklarının (alt) ekstraktları ile büyütülen hücrelerin, MTT ile belirlenmiş canlılık grafikleri. Canlılık yüzdeleri, sadece hücre olan kontrol grubuna oranla hesaplanmıştır.....	42
Şekil 27. Farklı oranlarda bütün haldeki DS kabuk yapısı katkılı, PHBV (üst) ve PHBV/PCL (alt) filmlerin alamar mavisi indirgenme oranlarıyla hücre canlılık testi grafikleri. α : PHBV/PCL/DS (12 $\mu\text{g/ml}$) ve PHBV/PCL/DS (25 $\mu\text{g/ml}$) gruplarının kontrol grubu ile arasındaki anlamlı istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$).....	43
Şekil 28. Farklı oranlarda öğütülmüş DS kabuk yapısı içeren, PHBV (üst) ve PHBV/PCL (alt) filmlerin alamar mavisi indirgenme oranlarıyla hücre canlılık testi grafikleri. α : 7. gün ve 1. gün grupları arası anlamlı istatistiksel farkı, β : 4 gün inkübasyona bırakılmış PHBV/PCL/DS (3 $\mu\text{g/ml}$) grubunun diğer gruplardan anlamlı istatistiksel farkını belirtmektedir ($p < 0.05$).....	44
Şekil 29. Nutrient agar plak yüzeyinde büyütülmüş, Sudan Black B boyası ile boyanmış DSM 36.....	45
Şekil 30. Polimer üreten DSM 36 beyaz hücreleri (40X büyütme).....	46
Şekil 31. Bakteri kültüründe üretilen polimerin saflaştırıldıktan sonra yapılmış H-NMR analiz sonucu (sol), literatürden alınmış PHBV H-NMR analiz sonucu (sağ) (Tao vd., 2009).....	46
Şekil 32. Polimer üreten Cupriavidus necator hücreleri (100x büyütme).....	47

Şekil 33. Polimer üreten <i>C. necator</i> hücreleri 400x büyütme.....	48
Şekil 34. Polimer üreten <i>C. necator</i> hücreleri 1000x büyütme.....	49
Şekil 35. <i>Cupriavidus necator</i> bakterisi suşu kullanılarak ön deneme olarak üretilen polimerlerin saflaştırıldıktan sonra yapılan H-NMR analiz sonucu.....	50
Şekil 36. <i>Cupriavidus necator</i> bakterisi suşu kullanılarak üretilen PHBV kopolimerinin saflaştırıldıktan sonra yapılan H-NMR analiz sonucu. Mavi oklar sadece valerata ait olan karakteristik tepe noktalarını göstermektedir.....	51
Şekil 37. <i>Cupriavidus necator</i> bakterisi suşu kullanılarak üretilen PHBV kopolimerinin saflaştırıldıktan sonra yapılan FTIR analiz sonucu.....	52
Şekil 38. <i>Cupriavidus necator</i> bakterisi suşu kullanılarak üretilen PHBV kopolimerinin saflaştırıldıktan sonra yapılan DSC analiz sonucu.....	53
Şekil 39. PUL çapraz bağlama çalışmalarında bozunmayan grupların (Tablo 2. 2-9 ve 14) SEM görüntüleri. Her bir numaralı görüntünün sağında yer alan görüntü, aynı deney grubunun DMF kullanılarak üretilen versiyonudur. (Tüm ölçek çubukları: 100 µm).....	57
Şekil 40. PHBV/PCL (a) B-PHBV/PCL (b) PHBV/PCL/SA:PUL/DS (c) ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS (d) taşıyıcı gruplarının SEM görüntüleri.....	60
Şekil 41. Üretilen PHBV/PCL, PHBV/PCL/DS, PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcıların gözeneklilik boyut dağılımı ve taşıyıcıların % gözeneklilik sonuçları. Şekildeki ok, diğer gruplara kıyasla B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcıda yoğunluğu azalan düşük gözenek çaplarını gösteriyor.....	61
Şekil 42. PHBV/PCL, PHBV/PCL/DS, PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS gruplarının, (üst) bozunma analizi ve (alt) su tutma analizi sonuçları.....	63
Şekil 43. Simüle edilmiş vücut sıvısı (SBF) içerisinde bekleyen taşıyıcıların, 7 ve 14 günlük inkübasyon sonrasında taşıyıcı üzerinde biriken kalsiyum miktarları. * PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubu ile diğer gruplar arası istatistiksel farklılık ($P < 0.05$). **PHBV/PCL grubu ve diğer gruplar arası istatistiksel farklılık ($P < 0.05$).....	64
Şekil 44. Taşıyıcı gruplardaki PHBV/PCL polimer fiberlerden, tek başına DS kabuklarından ve SA yüklü DS kabukları katkılı polimer fiberlerden (PHBV/PCL/DS) elde edilen 21 günlük SA salım profilleri.....	67
Şekil 45. Hücre taşıyıcı grupların üzerinde çoğaltılan Saos-2 (Üst) ve L929 (Alt) hücrelerinin inkübasyon süreleri sonunda alamar mavisi indirgeme aktiviteleri. α : İnkübasyonun 4. günü sonunda PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grupları ile PHBV/PCL ve PHBV/PCL/SA grupları arasındaki istatistiksel fark $p < 0.05$. β : İnkübasyonun 7. günü sonunda PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grupları ile PHBV/PCL/SA grubu arasındaki istatistiksel fark $p < 0.05$. θ : İnkübasyonun 7. ve 14. günü sonunda PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grupları ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark ($p < 0.05$).....	69

- Şekil 46.** Taşıyıcılar üzerinde 7 gün boyunca çoğaltıldıktan sonra sabitlemeye tabi tutulan hücrelerin SEM ile alınmış görüntüleri. Taşıyıcı grupları, (a) PHBV/PCL, (b) PHBV/PCL/DS, (c) PHBV/PCL/SA ve (d) PHBV/PCL/SA:PUL/DS. Görüntülerdeki ölçek çubuğu 40 µm'dir.....71
- Şekil 47.** B-PHBV/PCL (a ve b) ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS (c ve d) gruplarının üzerinde 7 gün boyunca çoğalan Saos-2 hücrelerinin SEM görüntüleri. (Oklar: Fiber üzerindeki hücreler). Görüntülerdeki ölçek çubuğu 20 µm'dir.....71
- Şekil 48.** Farklı konsantrasyonda DS içeren PHBV/PCL taşıyıcıların ve kontrol grubu olarak taşıyıcı olmadan çoğaltılan hücrelerin 7 ve 14 günlük inkübasyon sonucunda Saos-2 hücrelerinin ALP aktiviteleri (a). Taşıyıcı:DS oranı 20:1 olan veya DS içermeyen farklı kompozisyonlardaki hücre taşıyıcı grupların 7 ve 14 günlük inkübasyon sonucunda Saos-2 hücrelerinin ALP aktiviteleri (b). ALP aktivite deneyi sonucunda taşıyıcı:DS oranı 20:1 olan farklı kompozisyonlardaki hücre taşıyıcı gruplarda Sao-2 hücrelerinin hücre içi kalsiyum miktarları (c).....73
- Şekil 49.** B-PHBV/PCL (a), B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS (b), PHBV/PCL (c), PHBV/PCL/DS (d), PHBV/PCL/SA (e) ve PHBV/PCL/SA:PUL/DS (f) taşıyıcılar üzerinde 7 gün boyunca çoğaltılan Saos-2 hücrelerinin lazer taramalı konfokal mikroskobu görüntüleri. (a ve b) Tespit işlemi sonrasında hücre sitoplazmaları FTIC (Yeşil) ve çekirdekleri Draç5 (Kırmızı) floresan boya ile işaretlenmiştir (CSLM, Leica DM2500, Almanya). (c-f) Tespit işlemi sonrasında hücre sitoplazmaları FTIC (Yeşil) ve çekirdekleri PI (Kırmızı) floresan boya ile işaretlenmiştir (Zeiss LSM 510, Almanya).....75

ÖZET

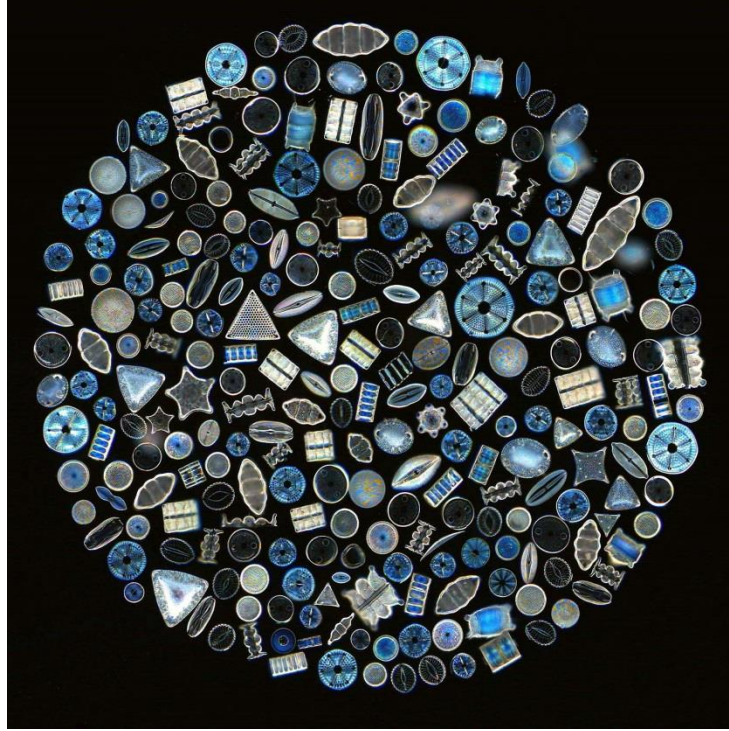
Kemik dokusu kayıplarının tedavisinde kullanılan greft yaklaşımlarında donör kısıtlılığı, bulaşıcı hastalık ve immün reaksiyon riski ile karşılaşmaktadır. Doku mühendisliği amacıyla geliştirilen hücre taşıyıcıları bu sorunların önüne geçmektedir. Projede, kemik doku rejenerasyonunu destekleyecek, temelde doğal malzemelerden oluşan üç boyutlu yeni bir taşıyıcı geliştirilmiştir. Birlikte elektroğirme yöntemiyle hazırlanan taşıyıcının birinci fiber yapısı temelde bakteriden üretilebilen Poli(3-hidroksibütrat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV) ve yapıyı desteklemek için az miktarda Polikaprolakton (PCL) polimerinden, ikinci fiber ise pullulan (PUL) polimeri ve tek-hücreli bir alg olan diatomun silika kabuklarından (DS) oluşmaktadır. DS parçacıkları taşıyıcıya eklenmeden önce saflaştırılmış, hücre canlılığını destekleyen konsantrasyon ve boyut özellikleri belirlenmiş ve elektroğirme sırasında fiberler içerisine başarıyla hapsedilebildiği gösterilmiştir. Projede öncelikle ticari olarak satın alınan (yurt dışı kaynaklı) PHBV ile taşıyıcının hazırlanma koşulları ve özellikleri araştırılmış, daha sonra proje kapsamında *Cupriavidus necator* bakteri suşu'ndan PHBV üretimi ve valerat yüzdesi optimize edilip bu polimerle taşıyıcılar hazırlanmış ve özellikleri karşılaştırılmıştır. İki fiberli hücre taşıyıcı yapı olarak PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubu üretilmiş ve PUL fiberlerinin elektroğirme sırasında çapraz bağlanması için yeni bir yöntem sunulmuştur. Projede ayrıca, Sefuroksim aksetil (SA) antibiyotigi, hidrofobik olan PHBV fiberlerine elektroğirme sırasında hapsedilmiştir. Geliştirilen bu yeni taşıyıcının yavaş hızda bozunduğu, çok az su alarak yapısını koruduğu, kontrollü antibiyotik salımını desteklediği, içerdiği DS ve çift fiber yapısı sayesinde daha yüksek basma dayanımına sahip olduğu görülmüştür. Saos-2 hücreleriyle yapılan in vitro deneylerde DS içeren grupların daha yüksek hücre canlılığı sağladığı ve L929 hücreleri ile yapılan deneylerde hidrofilik PUL fiberleri varlığı sayesinde birlikte elektroğirilmiş taşıyıcıların canlılığı daha iyi desteklediği sonucu elde edilmiştir. SEM ve lazer taramalı konfokal mikroskobu analizlerinde, hücrelerin taşıyıcı içinde yayıldığı, sağlıklı morfolojide olduğu görülmüştür. Projede üretilen PHBV ile hazırlanan taşıyıcılar aynı karakterizasyon aşamalarına tabi tutulmuştur ve hücre canlılığını aynı şekilde desteklediği görülmüştür. Projede, kemik doku kayıplarının tedavisi için ürüne dönüşme potansiyeli bulunan ve tüm malzemeleri ülkemiz kaynaklarından elde edilebilecek veya üretilebilecek yeni bir 3 boyutlu hücre taşıyıcı geliştirilmiştir.

ABSTRACT

Graft therapy is used to treat bone tissue loss, which has drawbacks; donor scarcity, risk of disease transmission and immune reaction. Tissue engineering scaffolds can overcome these drawbacks. In this project, 3D scaffold that will support tissue regeneration at defect site was developed using mainly natural materials. Scaffolds that were produced by co-electrospinning had the first fiber structure from a bacterial origin polymer, Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV), and a small amount of Polycaprolactone (PCL) polymer to supported the fiber structure; the second fiber, however, was formed by pullulan (PUL) polymer and diatom silica shells (DS) from single cell algae origin. DS particles were purified, investigated for their concentration and particle size properties to support cell viability and then were shown to be successfully incorporated into fiber structure during electrospinning. In the project, firstly, scaffold preparation conditions and scaffold characterizations were carried out using a commercial (obtained from abroad) PHBV source. Then, in the project studies, PHBV production by *Cupriavidus necator* bacterial strain and optimization of its valerate percentage was done for its use in scaffolds. These new scaffolds were characterized and compared with scaffold groups produced before. PHBV/PCL/CA:PUL/DS scaffold group was produced as scaffold with double fiber structure and a new crosslinking method for PUL fibers through electrospinning was developed. Cefuroxime Axetil (CA) antibiotic was loaded into hydrophobic PHBV fibers through electrospinning. Characterization studies revealed that, in aqueous environment scaffold degrade slowly, take less water and has stable structure, support controlled release of antibiotic and improved compressive strength due to incorporated DS and double fiber structure. In vitro studies revealed that DS bearing groups improved Saos-2 cell viability and co-electrospun groups that have hydrophilic PUL fibers supported L929 cell viability. SEM and confocal microscopy analyses showed that cells distributed through scaffold with healthy morphology. Scaffolds developed using bacterial PHBV that was produced in the project were also characterized with same methods and they were found to support cell viability in similar way. In the project, a new 3D scaffold whose all materials can be obtained or produced from sources of our country and that has potential to be a product for treatment of bone tissue losses was developed.

1. GİRİŞ

Diatom algleri, tüm sucul ortamlarda yaşayabilen tek hücreli ökaryotik organizmalardır; okyanuslardaki biyosilika üretiminin büyük bir kısmında rol oynarlar (Dimas ve Buehler, 2011). Biyoyumlu ve biyoçözünür olan diatom silika kabuk (DS) yapısı ile literatürde kontrollü ilaç salım sistemleri oluşturulmuş ve özellikleri tartışılmıştır (Dolatabadi ve de la Guardia, 2011). DS, amorf silikadan yapılmış, simetrik ve düzenli nano boyutta gözenekler içeren, farklı boyutlarda olabilen düzgün geometrik bir yapıdır (Şekil 1). Bu özellikleri sayesinde diatomların doğal yollarla ve normal koşullarda sentezlediği biyosilika yapılar ön plana çıkmaktadır (Aw vd., 2011). Projede, kemik doku mühendisliği amacıyla geliştirilen üç boyutlu hücre taşıyıcısı içerisinde mineral katkı malzemesi olarak diatom silika kabuğu kullanılması ve bu katkı maddesinin etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.



Şekil 1. Farklı türde diatom silika kabuklarının ışık mikroskopuyla çekilmiş görüntüsü (Resim Faull, 2015, yazısından alınmıştır).

Doğal kökenli olan ve sağlık endüstrisinde potansiyel malzemeler olarak görülen Polihidroksi-alkanoatlar (PHA'lar) arasında, Poli-3-hidroksibütrat (PHB) ve hidroksivalerat (HV) ile çeşitli oranlardaki kopolimerleri olan Polihidroksibütrat-ko-hidroksivalerat (PHBV) in vitro ve in vivo çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra PHB'nin HV ile kopolimerizasyonu sonucunda polimerin kristalinitesi düşürülebilmekte, camsı geçiş ve erime

sıcaklıkları azaltılabilmekte, esnekliği artırılabilen, dolayısıyla PHBV formunda daha kolay işlenebilir bir malzeme haline getirilebilmektedir (Lü vd., 2012; Suwantong vd., 2007).

PCL, kemik doku mühendisliğinde doku rejenarasyonuna yönelik üretilen taşıyıcılarda kullanılan başlıca sentetik polimerlerdendir (Wong vd., 2014; Song vd., 2007). PCL'in bozunum hızı düşüktür ve bu özelliği polimerin mekanik dayanımını artırır. Vücut ortamında bozunum ve yüksek biyouyumluluk özelliğine sahiptir. Projede, ilk deneylerde elektroğrılmış PHBV fiberlerin kırıklar oluşturduğu ve kırılabilir bir yapıda olduğu görülmüş ve bunun in vitro in vivo stabilite, mekanik özellikler gibi önemli özellikler açısından olumsuz olacağı ve örnekler arası varyasyonu arttıracığı değerlendirilmiştir. Bu nedenle, projenin gelişme raporlarında belirtildiği üzere PHBV fiber yapısına biraz daha esneklik ve dayanım kazandırmak için taşıyıcılara PHBV ile birlikte PCL polimeri de eklenmiştir.

Literatürde PHBV ve benzeri polimerler ve bunların çeşitli kompozitleri ile hazırlanan fibröz hücre taşıyıcıları ile ilgili araştırmalar çoğunlukla 2 boyutta, membran yapısındadır (Bai vd., 2015; Sajesh vd., 2016; Zou vd., 2016; Kouhi vd., 2018). Bu yapıların kemik doku mühendisliğine yönelik 3 boyutta taşıyıcılara dönüştürülmesi elektroğrılmış membranların üstüste katlanması gibi yöntemlerle sonradan sağlanabilmektedir. Projede, ıslak eğirme ve birlikte elektroğirme yöntemiyle daha önce birlikte kullanılmamış olan PHBV/PCL ve PUL polimerleri ile doğrudan 3 boyutlu yapılar hazırlanabilmiştir.

PUL bir mantar türü olan *Aureobasidium pullulans* tarafından hücre dışına salgılanan nötr bir polisakarittir (Mishra vd., 2011; Cheng vd., 2011). Doku mühendisliği ve ilaç salımı gibi alanlarda geniş çapta kullanılmakta olan bu doğal polimer toksik, immunojenik, mutajenik ve karsinojenik hiçbir yan etkisinin bulunmaması ve suda yüksek çözünürlük, biyobozunurluk, ince transparan film oluşturabilme, yüzeylere yapışabilme v.b. özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir (Mishra vd., 2011; Cheng vd., 2011; Svensson vd., 2005). Literatürde polisakaritler elektroğirilebilme özelliklerine göre üç gruba ayrılmaktadırlar; i) jet ve fiber oluşturabilenler, ii) jet oluşturup fiber oluşturamayanlar, iii) ne jet, ne fiber oluşturabilenler. Deneyler sonucunda PUL'un, yüksek elektroğirilebilme özelliğiyle ilk grupta yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca, çözücü olarak sadece su kullanılarak bile elektroğirme işlemine tabi tutulabildiği bilinmektedir (Stijnman vd., 2011; Islam vd., 2010). Bunlara ek olarak, elektroğirme ile kalın fiberlere dönüşebilen PUL'un, elektroğrılmış fiber yapının kalınlığını arttırdığı ve yapıya 3 boyut kazandırdığı daha önce yapılan çalışmalarda görülmüştür (Atilla vd., 2016). Hücre taşıyıcılarında kullanılacak olan PUL fiberleri nedeniyle yapının çok hızlı bozulmamasını sağlamak için proje önerisinde STMP ile çapraz bağlama metodu önerilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda STMP ile çapraz bağlama methodu ile istenilen sonuca ulaşılammıştır. Literatürde PUL yapıların çapraz bağlanmasında gluteraldehitin de kullanıldığı görülmüştür (Chen vd., 2017). Literatürde PUL film yapmak için kullanılan bu

yöntem ilk defa proje kapsamında elektroğirme sırasında çapraz bağlanmış fiber oluşturmak için kullanılmıştır.

Sefuroksim Aksetil (SA) birçok bakteriye karşı etkili bir antibiyotiktir. SA'nın *E. coli*, *S. aureus*, *H. influenza*, *Salmonella* gibi bakteriler için minimum engelleyici konsantrasyonları (MIC90) 4 µg/mL'den azdır. Ancak, kısa serum yarı ömrü (1.3 saat) ve düşük oral emilimi nedeniyle dokularda biriken konsantrasyonları azdır ve in vivo koşullarda etkisini hızla kaybetmektedir (Scott vd. 2001, Finn vd. 1987). Projede, bu antibiyotiğin hücre taşıyıcısından lokal antibiyotik salımı ile yan etkilerin azaltılması ve implant bölgesindeki etkinliğinin büyük ölçüde artırılması hedeflenmiştir.

Bu projede, temel olarak kemik doku rejenerasyonuna yönelik DS katkılı, elektroğirilmiş üç boyutlu hücre taşıyıcılar üretmek, karakterize etmek ve hücre kültüründe özelliklerini araştırmak amaçlanmıştır. Hücre taşıyıcılarını oluşturmak için PHBV, PCL ve PUL polimerleri kullanılmıştır. PHBV fiberlerini daha dayanıklı hale getirmek için PCL polimeri (PHBV/PCL, 7/3) PHBV fiber yapısına eklenmiştir. Üç Boyutlu taşıyıcı yapısındaki PHBV/PCL fiberlerine hidrofobik bir yapıda olan SA antibiyotiği yüklenmesi ve kontrollü salım potansiyelinin araştırılması gerçekleştirilmiştir. Kemik doku hücre taşıyıcılarından antibiyotik salımı, operasyon sonrası enfeksiyonu önleyici veya enfeksiyona bağlı kemik doku kayıplarında doku iskelesi ile birlikte tedavi edici bir etmen olarak kullanılmaktadır. DS silika yapısının, taşıyıcıların kemik doku mühendisliği amaca yönelik özelliklerine katkı sağlayacağı hipotezi ile DS parçacıkları PUL fiberleri içinde olacak şekilde PUL çözeltisi ile birlikte elektroğirilmiştir. Projede, birlikte elektroğirme yöntemi ile hazırlanan polimer çözeltileri aynı toplayıcı ortamında toplanarak iki farklı polimer fiberinin karışımı olan ve hem antibiyotik hem de DS içeren üç boyutlu taşıyıcı üretilmiştir. Proje kapsamında, ayrıca, PHBV polimeri *Cupriavidus necator* bakteri suşu ile üretilmiş (B-PHBV) ve bu polimer ile hazırlanan taşıyıcılar, ticari olarak (yurt dışı kaynaklarca üretilmiş) PHBV ile oluşturulan taşıyıcılar ile birlikte karakterize edilmiştir. Bu polimerin projede ticari satın alınan ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi ile proje kapsamında ülkemizdeki bir araştırma laboratuvarında kemik doku mühendisliği (ve benzeri pek çok araştırmada kullanılabilecek) önemli bir biyoyumlu ve biyobozunur polimerin istenilen kopolimer kompozisyonunda üretilmesi için bilgi ve tecrübe kazanılmıştır. Projeye sonradan eklenen PCL polimerinin çeşitli formlarda sentezlenebilirliği araştırma grubumuzca yürütölen başka projelerde gösterilmiştir. Bu nedenle, geliştirilen 3 boyutlu kemik doku mühendisliği amaçlı taşıyıcıların ülkemizdeki bilgi ve imkanlarla üretilebileceği değerlendirilmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Kemik doku tedavisi yaklaşımlarından biri kaybedilen doku yerine, başka bir bölgedeki kemikten veya donörden kemik dokusu almaktır. Hastaya allograft ve otograft olarak iki şekilde kemik doku nakli yapılabilir. Allograft ile tedavi, başka bir bireyden alınan kemik dokunun nakli anlamına gelir. Nakil yapıldığında hasarlı bölge yeni kemik dokusuyla mekanik olarak desteklenir ve kemik onarımı başlatılır. Bu yöntem ile hasta sadece tek bir operasyon geçirerek, iyileşme sürecine girer. Ancak allograft tedavi negatif sonuçlar doğurabilir. Genetik olarak farklı bir dokunun hastaya verilmesi hastada bağışıklık sistemi tepkisine neden olabilir. Ayrıca başka bir bireyden doku nakledilmesi beraberinde hastalıkların taşınmasına da neden olabilmektedir. Donör sayısının az olması da allograft tedavisinde bir başka sorundur. Bu sorunların önüne geçebilmek için otograft tedavi tercih edilebilir. Otograft tedavide hastanın hasarlı bölgesine nakledilmek için kendisinden doku alınır; böylece dokuyu reddetme riski ortadan kalkmış olur. Bu işlem hastada ikinci bir kemik doku hasarı yaratacak ve ikinci bir operasyon gerektirmenin yanında fazladan kan kaybı ve sinir hasarı da oluşturabilmektedir (Samorezov ve Alsberg, 2015).

Doku mühendisliği, geleneksel tedavi yöntemlerinden farklı yaklaşımlarla doku kaybı olan durumlarda doku görevini yerine getirecek veya zarar görmüş doku ve organların rejenerasyonunu sağlayacak disiplinlerarası yaklaşımları bir araya getirir (Meijer vd., 2007). Kemik doku mühendisliğinde de tedavi amaçlı, doku benzeri hücre taşıyıcıları kullanılmakta ve kemik dokunun özelliklerine yakın özellikte ve/veya kemik rejenerasyonunu destekleyecek nitelikte biyomalzemeler geliştirilmesi istenmektedir. Birçok yeni gelişme kaydedilmesine rağmen, biyouyumlu, biyoaktif bileşen içeren, implantasyon sonrasında, gerekli desteği sunarken doku rejenerasyonuna uyumlu bir şekilde bozunabilen, yeni üç boyutlu hücre taşıyıcılarına ihtiyaç vardır (Uppal ve Ramaswamy, 2011; Lim vd., 2010).

Diatom algleri tüm akuatik ortamlarda yaşayabilen tek hücreli ökaryotik organizmalardır; okyanuslardaki biyosilika üretiminin büyük bir kısmında rol oynarlar. Diatomların hücre çeperleri amorf silika yapısından oluşur; koruma amaçlı oluşturulduğu tahmin edilen bu silika kabuk, benzersiz geometrisi sayesinde yüksek mekanik dayanım göstermektedir. Doğada, her biri farklı şekilde olan, bilinen 100 000 farklı diatom türü bulunmaktadır (Dimas ve Buehler, 2011). Diatom algleri hücre sitoplazmasında silisik asit ile silika nano-parçacıkları üretir ve hücre dışı kabuk yapısına katılması için hücre dışına çıkarır (Nassif ve Livage, 2011). Diatomlar günümüzde petrol aramalarında, zehirlilik testinde, biyolojik silika eldesinde kullanılmaktadır. Diatomlar, sahip oldukları benzersiz silika geometrisi sayesinde birçok endüstriyel alanda da kullanılmaktadır; su ve gıda filtresi, yapı malzemesi ve kromatografi malzemesi olarak kullanılırlar (Jamali vd., 2012). Nanobiyoteknoloji alanında diatomlar

biyotanıma, ilaç salım sistemi, moleküler seçici ayırım gibi konularda kullanılmaktadır (Dolatabadi ve de la Guardia, 2011). Diatomların geniş yüzey alanı, optik olarak aktif geometrisi, nano boyutta yüzeyini kaplayan gözenekleri, yüksek erime noktası ve mekanik dayanımı, biyomalzeme olarak birçok alanda kullanılabilmesini desteklemektedir. Silika yapının yüzeyinde bulunan Si-OH grupları kimyasal reaksiyonlar için aktif noktalar ve kolayca kimyasal değişime uğrayabilen bir yüzey yaratırlar. Antikor ile modifiye edilmiş diatom biyosilika yapıları literatürdeki çalışmalarda biyosensor olarak kullanılmıştır (De Stefano vd., 2009; Bismuto vd., 2008; Dolatabadi ve de la Guardia, 2011). Biyouyumlu ve biyoçözünür olan diatom silika yapısı ile kontrollü ilaç salım sistemleri oluşturulmuş ve özellikleri tartışılmıştır (Dolatabadi ve de la Guardia, 2011). Diatom silika kabukları, amorf silikadan yapılmış, simetrik ve düzenli nano boyutta gözenekler içeren, farklı boyutlarda olabilen düzgün geometrik bir yapıdır. Günümüzde ülkemizde de üretilen, kizelgur adıyla da bilinen diatom toprağı, yıllar boyunca yaşam döngüsünü tamamlamış diatomların akuatik ortamların zeminine çöküp fosilleşmesi ile oluşmaktadır. Bu düzgün, üç boyutlu silika yapılar, kizelgurun saflaştırılmasıyla kolay, ucuz ve yüksek miktarda elde edilebilmektedir. Son yıllarda, silika bazlı nano boyutta parçacıkların sentetik olarak üretimi ve bu parçacıklar ile nano veya mikro boyutlarda ilaç salım sistemi oluşturulması literatürde çalışılmaktadır (Bharti vd., 2015; Brunella vd., 2016; Butler vd., 2016). Sentetik silika parçacıklarının ilaç çözünürlüğü üzerindeki pozitif etkisi, biyouyumlu ve biyoçözünür özellikleri bu sentetik malzemeleri öne çıkarmış olsa da, üretim aşamasının uzun sürmesi, yüksek maliyeti ve üretimde toksik malzemelerin kullanılması dezavantaj yaratmaktadır. Bu nedenlerden dolayı diatomların doğal yollarla ve normal koşullarda sentezlendiği biyosilika yapılar ön plana çıkmaktadır (Aw vd., 2011). Diatomlar basit bir akvaryum ortamında kolayca kültür edilebilir. Çok kısa bir sürede çoğalabilen diatomlar kullanım için süzülerek akvaryumdan toplanabilmektedir. Buna rağmen hazır olarak satın alınan diatom toprağı, silika yapıların elde edilmesi için en ucuz ve zahmetsiz yol olmaktadır. Literatürde en çok rastlanan, diatom biyosilika yapılarının kontrollü ilaç salım özelliği çalışmalarıdır. Aw vd. (2011) çalışmasında, anti-inflamatuar bir ilaç olan indomethasin'in diatom silika yapısına hapsedilmesi ve salım özellikleri araştırılmıştır. Çalışmalarında hidrofobik olan indomethacin'nin, hidrofilik ortamda kullanılabilirliğini başarıyla arttırmışlardır (Aw vd., 2011). Bir başka çalışmada ise diatom silika yapılarının yüzeyi hidrofilik ve hidrofobik olmak üzere iki farklı şekilde modifiye edilmiş ve farklı özellikteki ilaçların yüklenmesi ve salımları incelenmiştir. Hidrofilik ilaçların hapsedilme oranları ve kontrollü salımları hidrofobik diatom yüzeyi ile daha başarılı iken, hidrofobik ilaçların hapsedilme oranları ve kontrollü salımı, diatomların yüzeyi hidrofilik olduğunda daha başarılı olmuştur (Bariana vd., 2013). Silika kabuk yapılarının en küçük boyutları ortalama olarak 10 mikron civarındadır, bu nedenle diatom kontrollü ilaç salım sistemleri genel olarak oral yoldan ilaç alımına veya lokal implantasyona uygun olarak

çalışılmaktadır. Zhang vd. (2013) yaptıkları çalışmada, mesalamin ve prednison adlı gastrointestinal ilaçların diatom yapısına ayrı olarak hapsedilmesini incelemiştir. Diatom kabuk yapısına hapsedilmiş ilaçların biyouyumluluğunun ve hedef hücrelerin ilaç geçirgenliğinin arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca silika bazlı diatom kabuklarının Caco-2, HT-29, HCT-116 hücre hatlarında bir toksisite yaratmadığı görülmüştür (Zhang vd., 2013).

Sefuroksim birçok bakteriye karşı etkili bir antibiyotiktir. Kısa serum yarı ömrü (1.3 saat) ve düşük oral emilimi nedeniyle dokularda biriken konsantrasyonları azdır. Kemik doku tedavisinde kullanılan silika bazlı lokal ilaç salım tekniği, antibiyotiklerin, büyüme faktörlerinin, antiinflamatuvar ve antikanser ilaçların, kontrollü ve uzun süreli salımlarını kapsamaktadır (Simovic vd., 2011). Silikanın kemik hücreleriyle olan etkileşimi Lopez-Alvarez vd. (2009) çalışmasında, silika ve hidroksiapatit (HA) bazlı kaplama üzerinde incelenmiştir. Çalışmada sadece HA kaplı yüzey ile Silika/HA kaplı yüzeyin, hücreler ile etkileşiminde farklılıklar olduğu ve yapıya katılan silikanın osteoblast benzeri kabul edilen Saos-2 hücrelerinin yüzeye tutunmasını ve çoğalmasını arttırdığı görülmüştür. Bu etkinin silika yapısındaki silikon sayesinde gerçekleştiği belirtilmektedir. Çalışmada silikon içeren, sentetik silika ve diatom toprağı (kizelgur) iki farklı silikon kaynağı olarak kullanılmıştır. Diatom/HA yüzey kaplamasının, sentetik silika/HA yüzey kaplamasına göre hücre tutunması ve çoğalmasını arttırdığı rapor edilmiştir. Bu çalışma sonuçları da diatomun kemik doku mühendisliği uygulamalarında kompozit polimerik taşıyıcılarda kullanılma potansiyelini göstermektedir. Diatom veya silika yapısından salınan az miktardaki silikonun bu etkiye neden olduğu düşünülmektedir ve silika diatom kabuklarının, sadece silikadan farklı olarak, osteoblastik hücre davranışını daha çok tetiklemesinin nedeninin yapısında az miktarda bulunan diğer temel elementlerin varlığı olduğu söylenmiştir (Lopez-Alvarez vd., 2009).

Son yıllarda diatom silika kabuklarının (DS) kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanımı fikri literatürde daha fazla yer bulmaya başlamıştır. Le vd. (2018) çalışmasında DS'lerin hücrelerle uyumunu araştırmıştır (Le vd., 2018). Bugüne kadar sadece birkaç çalışma DS'lerin kemik doku için üretilen taşıyıcılarda kullanımını araştırmıştır. Diatom kabuk parçalarını veya kizelgur içeren çalışmalarda bu taşıyıcılar ve biyomalzemeler, silk fibroin taşıyıcı (Le vd., 2018), kitosan membran (Tamburaci ve Tihminlioglu, 2017; 2018) ve kemik çimentosu (Zhang vd., 2018) çalışmalarıdır. Bu çalışmalarda taşıyıcı yapısına eklenen DS'lerin ana rolü silisyumun doğal kaynağı olmaları olarak gösterilmiş ve silisyumun kemik sağlığına faydaları belirtilmiştir. Silisyumun kemik hücrelerinin kemik oluşturmaya katkısı, kemik hücrelerinin proliferasyonunu, alkalin fosfataz aktivitesini, kemik matrisi oluşumunu ve osteokalsin üretimini arttırmasıyla açıklanmaktadır (Jugdaohsingh, 2007).

Elektroçirme, doku mühendisliği hücre taşıyıcıları üretmek için yaygın olarak kullanılan ve çok yönlü bir yöntemdir. Elektroçirme yapılırken uygulanan voltajla olan yük transferi temel olarak kolektöre doğru oluşan polimer jet akışı kaynaklıdır ve şırınga ucundan polimerin

akışının kütlesi, akımın artırılması veya azaltılmasına bağlıdır (Canton vd., 2010; Blackwood vd., 2008). Elektroeğrilmış yapıların iki önemli özelliği doku mühendisliği uygulamalarına uygunluklarını ve dolayısıyla en tercih edilen taşıyıcılardan olmalarını açıklamaktadır; ilk olarak elektroeğirme ile elde edilen fiberler vücutta bulunan hücre dışı matrikslerin çoğunda bulunan rastgele konumlanmış nanometre çapında kollajen fiberlerine benzer yapıdadır; ikincisi elektroeğrilmış yapıların sağladığı yüksek gözeneklilik, hem hücre ekimi ve göçü için, hem de besin ve hücre atık transferi için uygun yapı oluşturmaktadır (Meng vd., 2008).

Poli-hidroksialkanoatlar (PHA) toprak bakterileri, mavi yeşil alg ve bazı genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar tarafından hücre içi enerji ve karbon deposu olarak üretilen biyobozunur ve biyoyumlu termoplastik poliesterlerdir (Sombatmankhong vd., 2007; Suwantong vd., 2007). Doğal kökenli olmaları nedeniyle PHA'lar, sağlık endüstrisinde potansiyel malzeme olarak görülmektedir. PHA'lar arasında, Poli-3-hidroksibütrat (PHB) ve hidroksivalerat (HV) ile çeşitli oranlardaki ko-polimerleri (PHBV) in vitro ve in vivo çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. PHB, kan ve dokularda doğal bir molekül olan d,l-β-hidroksibütratu oluşturacak şekilde kendiliğinden ve tamamen bozunmaktadır (Suwantong vd., 2007). Bunun yanı sıra PHB'nin HV ile ko-polimerizasyonu sonucunda polimerin kristalinitesi düşürülebilmekte, camsı geçiş ve erime sıcaklıkları azaltılabilmekte, esnekliği artırılabilen, dolayısıyla PHBV formda daha kolay işlenebilir bir malzeme haline getirilebilmektedir (Lü vd., 2012; Suwantong vd., 2007). Literatürde film-dökme ve çözünen-süzdürme yöntemleri ile üretilen PHBV hücre taşıyıcıların biyoyumlulukları in vitro çalışmalarda osteoblastlar, epiteller, ovin kondrositler dahil olmak üzere bir çok hücre hattı ile raporlanmıştır (Lü vd., 2012; Sombatmankhong vd., 2007; Suwantong vd., 2007). Özellikle kemik doku araştırmalarında çözücü uçurma ve çözünen filtreleme yöntemleriyle üretilmiş PHBV köpüklerde osteoblast çoğalması gözlemlenmiştir (Torun Köse vd., 2003). PHBV kompozit hücre taşıyıcılar, fiziksel ve kimyasal özelliklerini geliştirmek amacıyla, hidroksiapatit, jelatin, kollajen gibi diğer malzemelerle karıştırılmaktadır. Ayrıca, yüzey modifikasyonları ile yüzey özellikleri değiştirilebilen PHBV hücre taşıyıcılarının hücre tutunma ve çoğalma özellikleri geliştirilmeye çalışılmaktadır (Lü vd., 2012). Literatürde PHBV ve benzeri polimerler ve bunların çeşitli kompozitleri ile hazırlanan fibröz yapıdaki hücre taşıyıcılar çoğunlukla 2 boyutta, membran yapısında ürünlerdir (Bai vd., 2015; Sajesh vd., 2016; Zou vd., 2016; Kouhi vd., 2018).

Yapılan incelemeler PUL'un genç farelerde kalsiyum emilimini ve kemik mineral içeriğini etkilemediğini ve dolayısıyla engellemediğini göstermiştir (Imerson, 2010). Kemik doku mühendisliği araştırmalarında çapraz bağlı PUL üç boyutlu gözenekli taşıyıcı yapımında bir diğer polisakkarit olan dekstranla birlikte kullanılmış ve gözenekliliğinin kemik dokusunun büyümesine olanak sağlayacak şekilde olduğu rapor edilmiştir. Daha öncesinde de, bu üç boyutlu yapılarda insan adipoz doku kaynaklı kök hücrelerinin osteojenik farklılaşma

gösterdiği gözlemlenmiştir (Lalande vd., 2011). Ayrıca nanohidroksiapatit yüklü PUL kompozit matrikslerin in vivo çalışmalarda dokuda yüksek mineralizasyonu ve matriksle direkt temas halinde olan bölgelerde kemik rejenerasyonunu tetiklediği görülmüştür (Fricain vd., 2013). Dolayısıyla PUL yapıların, ortopedi ve maksifasial cerrahi uygulamalarında hastanın mezenkimal kök hücrelerinde kemik doku farklılaşması ve kemik doku oluşumu için önerilen bir malzeme olduğu belirtilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Malzemeler

Hücre taşıyıcıların hazırlanmasında ticari formda Poly(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV) ve poly(ϵ -caprolactone) (PCL) kullanılmıştır. PHBV (8 mol %) polimeri Aldrich'ten (Missouri, ABD) alınmıştır (Şekil 2, üst). (PUL) (200 kDa) ise Kale Kimya Şirketinden temin edilmiştir (Şekil 2, alt). Destekleyici polimer olarak kullanılan PCL (Mn:80000) polimeri, PUL fiberlerin çağraz bağlanmasında kullanılan gluteraldehit, DMSO, Triton x-100, LB besiyeri, Bacteriological agar, maya ekstresi, sitrik asit ve glikoz solüsyonu Sigma'dan alınmıştır (Missouri, ABD). Bakteriyel PHBV, İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Ayten Karataş Yazgan'ın laboratuvarında üretilmiştir. Polimer *Cupriavidus necator* (DSMZ 428) bakteri suşu ile üretildikten sonra ODTÜ Mühendislik Bilimleri Bölümü laboratuvarına kargo ile ulaştırılmış ve burada saflaştırılmıştır. Hücre kültürü için kullanılan, Dulbecco's modified eagle medium, DMEM besiyeri (yüksek şekerli), Tripsin-EDTA, penisilin streptomisin, L-askorbik asit, L-glutamin ve fetal sığır serumu Biowest markalı ürünlerdir.

3.2 Diatom Silika Kabuklarının (DS) Saflaştırma Amacıyla Geçirildiği Ön İşlemler

3.2.1 DS Kabuklarının Saflaştırılması

DS eldesi için ilk olarak kaya halinde bulunan kizelgur satın alınmış ve bu topraktan DS saflaştırma çalışmaları yapılmıştır. Uygulanan saflaştırma protokolü kısaca şu şekildedir: Kizelgur kaya parçaları toplu öğütücüde (Retsch, mm 200, Almanya) 2 saat boyunca öğütülmüştür. Ardından 4 defa su içinde 10 dakika sonikasyon sonrasında 30 dakika çöktürme işlemi uygulanmıştır. Sırasıyla sülfirik asit ve su ile yıkandıktan sonra vakum fırınında kurutulmuştur. Ancak sonuçlar bölümünde belirtilen nedenlerden dolayı DS için kizelgur dışında bir kaynak kullanılmasına karar verilmiştir.

kariştiricida düzenli olarak kariştirilmiş ve DS kabuklarının boyutlarının daha küçülmesi sağlanmiştir (Suroy vd., 2014).

İkinci yöntemde DS kabuklarının farklı boyutta parçalanabilmesi için ODTÜ Merkez Laboratuvarında bulunan ağat ğtc (RETSCH RS-200 Diskli Ağat ğtc, Almanya) kullanılmıştır. Farklı boyut aralıkları elde edilmek için numuneler 1, 5, 10 ve 15 dk boyunca cihazda ğtlmştir.

3.3 DS Kabuklarının Karakterizasyonu

3.3.1 Parçacık Boyut Dağılımı Analizi

DS kabuklarının öğütülme işleminden sonra parçacık boyut dağılımı, parçacık boyutu dağılım analizi, Zeta sizer cihazı (Nano ZS90, Malvern Instruments, ODTÜ Merkez Laboratuvarı) ile lazer saçılımı yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

3.3.2 Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile Yüzey Morfolojisi Analizi

DS kabuklarının çap boyutları ve morfolojileri, taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile incelenmiştir. Taşıyıcılar hassas aşındırma kaplama sistemini (682 PECS, Gatan, Inc., ABD) kullanarak, çok ince (10 nm) bir altın tabakası ile kaplandıktan sonra SEM (FEI, Nova Nano SEM 430, ABD) ile görüntülenmiştir.

3.3.3 DS Kabuklarının Kimyasal Analiz için Elektron Spektroskopisi (ESCA)

DS kabuklarının X-Ray Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) - Kimyasal analiz için elektron spektroskopisi (ESCA) analizi, ODTÜ MERLAB'da yapılmıştır. DS kabuklarının yüzey kimyasal yapısı PHI 5000 VersaProbe aparatı ile incelenmiştir. X-ışın kaynağı olarak Al K α anot kullanılmış, 26 W gücünde, 200 μ m ışın genişliği ile çalışılmıştır. Bütün lmler 45 derecelik başlangıç açısıyla yapılmıştır. lm sırasında yk oluşturmak için 187.85 eV elektron bulutu ateşleyici kullanılmıştır. Önceden cihaz için belirlenen hassasiyet faktörleri kullanılarak element kompozisyonu belirlenmiştir.

3.3.4 MTT Hücre Canlılık Deneyi

DS kabuklarının tek başına hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) testi (Sigma Aldrich, ABD) ile araştırılmıştır. Bu test sarı tetrazolyum tuzunun metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerinden salgılanan dehidrojenaz enzimi tarafından mor formazan kristallerine indirgenmesine dayanmaktadır. Dolayısıyla mor renk miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılı artmaktadır (Abed vd., 2011). Bu test aynı zamanda hücre çoğalmasını önleyen ve hücreleri öldürebilecek olası toksik

maddelerin varlığının tespiti için de uygulanan bir analizdir. Hücre kültür vasatları steril polistiren hücre kültür kuyucukları içinde inkübe edilmiştir ve 1., 4. ve 7. günlerde örnekler 37°C'de %5 karbondioksit içeren inkübatörde 4'er saat, fenol kırmızısı içermeyen DMEM ile %10'a seyreltilmiş MTT (5 mg/ml) solüsyonu ile bekletilmiştir. Hücre içinde çözünmeyen formazan kristalleri DMSO ile çözünür hale getirilmiş ve serbest salım sağlanmıştır (Ma vd., 2011). Örneklerin optik yoğunlukları spektrofotometre cihazı (μ QuantTM microplate spectrophotometer, Biotek Instruments Inc., ABD) ile 570nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.3.5 DS Kabuklarının Hücre Uyumluluklarının Belirlenmesi (Ekstrak Testi)

Tüm DS kabuk grupları 200°C'de steril edilmiştir. Deney 96 kuyucuklu plakada çalışılmış ve her bir kuyucuğa 3000 hücre ekilmiştir. Öğütülmüş ve öğütülmemiş DS ile besiyeri içerisinde 50 mg/ml'lık stok solüsyonları hazırlanmıştır ve bu solüsyon 1, 3 ve 7 gün boyunca 37°C'de bekletilmiştir. DS kabuklarına maruz bırakılan besiyeri, 3.12, 6.25, 12.5 ve 25 mg/ml DS kabuk konsantrasyonlarına denk gelecek şekilde, normal besiyeri ile seyreltikten sonra, hücre ekilmiş kuyucuklara dağıtılmış ve deney başlatılmıştır. Devam eden deney gruplarının besiyeri hergün aynı sürede DS kabuklarına maruz kalmış besiyeri ile yenilenmiştir. Deney sonunda hücre canlılıkları MTT analizi ile incelenmiştir.

3.3.6 Direkt Film Canlılık Testi

Hücre taşıyıcıların üretiminin optimizasyonu aşamalarında uygun dozu belirlemek için gerekli bir ön çalışma olarak ayrıca, taşıyıcılarda kullanılacak PHBV, PCL ve bu polimerler ile birlikte DS kabukları kullanıldığında hücre canlılığına olan etkisinin araştırılması için direkt film sitotoksitesite deneyleri yapılmıştır. Direkt film canlılık testinde, 48 kuyucuklu hücre plakaları içine, HFIP ile çözülen polimer ve DS kabuk süspansiyon örnekleri koyulmuş ve kurumaya bırakılmıştır. HFIP solüsyonu buharlaştırıldıktan sonra kuyucukların dibinde oluşan polimer filmler ilk önce 2 saatlik etanol ile ve daha sonra yarım saat UV ışık ile steril edilmiştir. Daha sonra bu gruplar üzerinde alamar mavisi canlılık testi ile hücre canlılığı 1, 4 ve 7 günlük inkübasyonlar ile çalışılmıştır. Bu test, hücrelerin iç-metabolik aktivitelerinin 7-Hidroksi-3H-fenoksazin-3-on-10-oksid'in (Invitrogen, ABD) kimyasal olarak indirgenmesi temeline dayanmaktadır. Devam eden hücre çoğalması indirgenme ortamını sabitlerken büyümenin inhibisyonu oksidize ortamı sabitler. Buradaki indirgenme redoks indikatörünün okside olmuş floresan olmayan mavi formundan indirgenmiş floresan olan kırmızı formuna dönüşmesine neden olur. Bu nedenle renk değişimi hücre büyümesi ile ilişkilendirilir. Hazırlanan polimer filmlerin, hücre ekiminden önce DMEM ile ıslanmaları sağlanmış ve 24 saat beklendikten sonra her bir film üzerinde 30 000 hücre ve kuyucukta 0.5 ml besiyeri olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Saos-2 proliferasyonu 7-Hidroksi-3H-fenoksazin-3-on-10-oksid (Alamar blue assay, Invitrogen, ABD) ile inkübasyonun 1., 4. ve 7. günlerinde belirlenmiştir (Mishra

vd., 2011). Her bir periyottan sonra örnekler nazikçe PBS (pH 7.2) ile yıkanmış ve her bir 0.5 ml'lik DMEM çözeltisi 50 µL alamar mavisi çözeltisi (5 mg/mL) içerecek şekilde kuyucuklara yüklenmiş ve 4 saat boyunca 37°C'de, karbondioksit inkübatörde bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda alamar mavisi çözeltisi yeni kuyucuklara transfer edilmiş ve optik yoğunluk (O.D.) değerleri mikropilaka okuyucu (μ OuantTM microplate spectrophotometer, Biotek Instruments Inc., ABD) ile 570 ve 600 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar kullanılarak grupların indirgenme yüzdeleri hesaplanmıştır.

3.4. PHBV/PCL/SA:PUL/DS Taşıyıcıların Üretimi

Birlikte elektroegirme yöntemi, yapılan optimizasyon çalışmaları sonrasında en verimli haline getirilmiştir. Islak elektroegirme deneyleri sırasında sistem dikey konumda kurulmuş ve iki ayrı polimer çözeltisinden oluşan fiberler, elektronik döner stant üzerine sabitlenmiş olan %100 etanol banyosunda toplanmıştır. Çapraz bağlama için gereken kimyasallar etanol banyosu içine aşağıda anlatıldığı gibi eklenmiştir.

Birinci polimer çözeltisi olarak, deiyonize su içerisinde %15 konsantrasyonunda hazırlanmış PUL polimeri kullanılmıştır. PUL çözeltisi içine PUL/DS oranı ağırlıkça 20/1 olacak şekilde DS kabukları eklenmiştir. Fiber oluşumu sırasında PUL fiber içi çapraz bağlamanın başlaması için PUL çözeltisine % 5 oranında (a/h) gluteraldehit eklenmiştir ve ayrıca PUL çözeltisi içine % 0.1 (v/g) p-toluen sülfonik asit eklenmiştir. Etanol içerisine toplanan fiberlerdeki gluteraldehit ve p-toluen sülfonik asit'in etanol içerisine dağılarak konsantrasyonlarının değişmemesi için, toplama banyosuna da hacimsel olarak aynı oranda gluteraldehit ve p-toluen sülfonik asit eklenmiştir. Elektroegirme öncesinde, çapraz bağlama işleminin başlatılması için yukarıda anlatılan gluteraldehit ve p-toluen sülfonik asit içeren PUL çözeltisi 1 saat boyunca 60°C'de karıştırılmış ve ardından DS kabukları çözücüye eklenip elektroegirme işlemi başlatılmıştır.

İkinci polimer çözeltisi olarak, HFIP içerisinde %14 konsantrasyonunda hazırlanmış PHBV/PCL (7/3, g/g) polimer karışımı kullanılmıştır. Antibiyotik yüklü fiberlerin üretilmesi için, PHBV/PCL polimer çözeltisi içerisine SA eklenmiştir ve bu çözelti de aynı toplama ortamına elektroegirilmiştir. Çözeltiler 13-15 Kv altında ve yaklaşık 18 cm uzaklıkta bulunan toplama standındaki etanol banyosuna toplanmıştır.

3.5 PHBV/PCL/SA:PUL/DS Hücre Taşıyıcıların Karakterizasyonları

3.5.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi ve EDX Analizi

Üretilen hücre taşıyıcıların fiber morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Analiz öncesinde, taşıyıcılar hassas aşındırma kaplama sistemi (682 PECS,

Gatan, Inc., ABD) kullanarak, çok ince (10 nm) bir altın/paladyum tabakası ile kaplanmıştır ve ardından SEM (FEI, Nova Nano SEM 430, ABD) ile görüntülenmiştir. SEM ile görüntüleme sırasında bölgesel olarak yüzey elementlerinin belirlenebilmesi için EDX analizi yapılmıştır.

3.5.2 Gözeneklilik Analizi

Hücre taşıyıcılarındaki gözenek dağılımı ve gözeneklilik boyutlarının analizi, düşük basınçta (200–4 µm çapa, 0–50 psi olacak şekilde) Coremaster 60 Mercury Porosimeter (Quantochrome Corporation, Florida, ABD) ve Helyum Ultrapiknometre 1000 (Quantochrome Corporation, Florida, ABD) kullanılarak, ODTÜ Merkez Laboratuvarında (Ankara, Türkiye) gerçekleştirilmiştir.

3.5.3 Bozunma ve Su tutma Analizi

Bozunma analizi için, dört tekrarlı olarak, hücre taşıyıcı grupları eşit ağırlıkta kesilmiştir. Kesilen parçaların herbiri, PBS (0.1 M, pH 7.2) içerisinde, 37 °C'lik çalkalamalı su banyosunda (Nüve Bath NB 5, Türkiye), 30 gün boyunca bekletilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında örneklerin ıslak ağırlıkları tartılmış ve ardından örnekler distile su ile yıkandıktan sonra liyofilizasyon yöntemi ile kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin kuru ağırlıkları belirlenmiş, kaybedilen yüzde ağırlık ve su tutma oranları, örneklerin ilk ağırlıkları ile kıyaslanarak hesaplanmıştır. Bozunma ve su tutma hesaplamasında kullanılan formüller şu şekildedir;

$$\text{Bozunma (\%)} = \frac{\text{Başlangıç kuru ağırlığı} - \text{Son kuru ağırlığı}}{\text{Başlangıç kuru ağırlığı}} \times 100$$

$$\text{Su tutma (\%)} = \frac{\text{Islak ağırlık} - \text{Kuru ağırlık}}{\text{Kuru ağırlık}} \times 100$$

3.5.4 Biyomineralizasyon Analizi

Hücre taşıyıcılar üzerindeki apatit oluşumu biyomineralizasyon analizi ile araştırılmıştır. Hücre taşıyıcılar eşit ağırlıkta ve benzer şekilde kesilmiş, ardından içerisinde 3 ml simüle edilmiş vücut sıvısı (Simulated body fluid, SBF) (Na⁺ 142.0, K⁺ 5.0, Mg²⁺ 1.5, Ca²⁺ 2.5, Cl⁻ 148.8, HCO₃⁻ 4.2, HPO₄²⁻ 1.0, SO₄²⁻ 0.5 mM) bulunan falkonlarda, 37°C'lik su banyosunda bekletilmiştir. Taşıyıcıların dışındaki SBF ortamından, 7. ve 14. günlerde örnekler alınarak kalsiyum tayini yapılmıştır. SBF içerisindeki kalsiyum miktarlarının ilk gündekine göre azalma oranı baz alınarak, taşıyıcılar üzerine kalsiyum çökme miktarları karşılaştırılmıştır. Ayrıca, 7. ve 14. günlerde, taşıyıcılar distile su ile yıkandıktan sonra, liyofilizasyon yöntemi ile kurutulmuş, ve üzerinde oluşan mineral çökeltinin yapısı SEM ile incelenmiştir.

3.5.5 Mekanik Çekme ve Basma Testi

Hücre taşıyıcıların mekanik dayanımı, tek eksenli çekme ve basma testi ile incelenmiştir. Çekme ve basma testi için, bilgisayar programı ile kontrol edilebilen, Univert biyomalzeme mekanik test cihazı (Cell scale, Kanada) 10 N'luk yük hücresi ile kullanılmıştır. Çekme testi için örnekler 25mm×10mm×0.2mm: uzunluk×genişlik×kalınlık ölçülerinde kesilerek hazırlanmış, deney için ön yükleme değeri 0.1 N olarak seçilmiş ve çekme hızı 0.5 mm/s olarak ayarlanmıştır. Basma testi için silindirik (Çap: 9-9.5 mm, yükseklik: 8-10 mm) örnekler, üretilen elektroegrilmiş taşıyıcıların 48 kuyucuklu hücre plakası kuyucukları içerisinde dondur-kurut yöntemi ile liyofilizatörde (Labconco, Freezone 6, ABD) -80°C'de kurutulması ile hazırlanmıştır. Basma testinde örnekler, 0.1 N ön yükleme değeri seçilerek, 5 mm/dk hızında başlangıç yüksekliğinin % 70'ine kadar basılmıştır. Çekme ve basma testi sonucu toplanan veriler ile gerilim-gerinim grafikleri çizilmiş ve Young's Modülleri hesaplanmıştır.

3.5.6 Antibiyotik Yükleme Etkinliği ve Antibiyotik Salım Profillerinin İncelenmesi

SA, kloroform çözeltisi içerisinde çözüldüğünde, UV spektrofotometre (Hitachi U-2800, Japonya) ile 281.5 nm dalga boyunda tayin edilebilmiştir. İlk olarak, bilinen miktarlarda antibiyotik içeren kloroform solüsyonlarının optik yoğunluğu 281.5nm dalga boyunda ölçülerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Antibiyotikğin saptama çalışmaları optimize edildikten sonra ilaç yükleme ve salım çalışmalarına başlanmıştır.

Parçalanmış DS kabuklarına antibiyotik yüklemek için, 0.1g DS kabuğu tartılıp 2 ml kloroform içinde dağıtıldıktan sonra DS kabuklarının gözeneklerinin kloroform ile ıslatılması için 2 saat boyunca sonikasyon (Bandelin sonorex, Almanya) uygulanmıştır. Antibiyotik (0.03 g) kloroform içinde çözülmüş ve DS kabukları üzerine antibiyotik solüsyonu damlatılarak eklenmiştir. Kurutulan DS kabuklarına ilaç yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Yükleme verimliliği ölçümü için, belirli miktardaki antibiyotik yüklü DS kabuk örnekleri kloroform içinde bekletilmiş ve 10 dakika boyunca sonikasyona tabi tutulmuştur. Sonikasyon ile DS kabuklarından dışarı çıkan antibiyotik miktarı, DS kabuklarını santrifüj ile çöktürdükten sonra süpernatantın UV spektrofotometrede ölçümüyle belirlenmiştir. Bu işlem DS kabukları içinde hiç antibiyotik kalmayınca kadar tekrarlanmıştır. Toplam antibiyotik yükleme miktarı, ölçümlerin toplamı olarak belirlenmiştir.

$$\text{Antibiyotik (SA)yükleme Etkinliği (\%)} = \frac{\text{Yüklenen SA Ağırlığı (mg)}}{\text{Başlangıç ta eklenen SA ağırlığı (mg)}} \times 100$$

$$\text{Antibiyotik (SA)yükleme miktarı (\%)} = \frac{\text{Yüklenen SA Ağırlığı (mg)}}{\text{Yükleme yapılan DS kabuk ağırlığı (mg)}} \times 100$$

DS kabuklarından sefuroksim (SA) salım çalışması için DS kabukları (80 mg) diyaliz torbası içerisinde 4 ml PBS (pH: 7.4, 0.01M) içeren tüplerde salıma bırakılmıştır. Salım örnekleri, dış ortamdan 2, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168. saatte 1'er ml alınarak toplanmış ve yerine tekrar 1'er ml PBS eklenmiştir. PBS'e salınan antibiyotik miktarlarının UV spektrofotometrede okunabilmesi için örnekler vakum fırında kurutulmuş ve kurutulan örnekler kloroform içinde vorteks ile çözülmüştür. PBS uçurulduktan sonra geriye kalan ve kloroform içinde dağılan tuzlar dakikada 14 000 devirde 5 dk santrifüj yapılarak çöktürülmüştür. Örneklerin kloroform kısmı UV spektrofotometrede 281.5nm dalga boyunda okunarak, antibiyotik miktarı belirlenmiştir.

SA'nın üretilen fiberler içerisine yüklenme oranı, elektroegirme sırasında fiberlerin içerisine toplandığı etanol banyosundan örnek alınarak belirlenmiştir. Bu nedenle SA'nın etanol içerisinde en yüksek değerde okuma verdiği 270 nm dalga boyu seçilerek, etanol çözücüsü için ayrıca bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Etanol banyosuna dağılmış olan SA miktarı, polimer çözeltisine başlangıçta eklenen SA miktarından çıkarılarak yükleme oranı belirlenmiştir.

$$\text{Antibiyotik (SA) yükleme (\%)} = \frac{\text{İlk eklenen SA ağırlığı} - \text{Etanoldeki SA ağırlığı}}{\text{İlk eklenen SA ağırlığı}} \times 100$$

Hücre taşıyıcılardan ve DS kabuklarından SA salım çalışması için taşıyıcılar ya da DS kabukları (80 mg) diyaliz torbası içerisinde PBS (pH: 7.4, 0.01 M, 4 ml) içeren tüplerde salıma bırakılmıştır. Salım örneklerinin içerisinde bekletildiği dış sıvı ortamdan 2, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168. saatte 1'er ml alınmış ve yerine tekrar 1'er ml PBS eklenmiştir. PBS'e salınan antibiyotik miktarlarının optik yoğunluğunun (O.D.) UV spektrofotometrede belirlenmesi için örnekler vakum fırında kurutulmuş ve kurutulan örnekler kloroform içinde vorteks ile çözülmüştür. PBS uçurulduktan sonra geriye kalan ve kloroform içinde dağılan tuzlar dakikada 14 000 devirde 5 dk santrifüj yapılarak çöktürülmüştür. Örneklerin kloroform kısmı UV spektrofotometrede 281.5 nm dalga boyunda ölçülerek, salımı gerçekleşen antibiyotik miktarı belirlenmiştir.

3.6 Hücre Kültürü Deneyleri

Hücre taşıyıcılar ile başlatılan hücre canlılığı deneyinde alamar mavisi canlılık testi kullanılmıştır. Taşıyıcıların, ekilen hücrelerinde kemik doku mühendisliğine yönelik rejeneratif etkisini değerlendirmek üzere osteoblast hücrelerinin erken dönem osteoblastik farklılaşma işareti olarak bilinen alkalen fosfataz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Hücre kültüründe kullanılan taşıyıcılar, deney öncesinde UV (30 dk) ve etanole (2 saat) maruz bırakılarak steril edilmiştir. Daha sonra bu örnekler 37 °C'de serum içeren DMEM vasatında 1 gün boyunca bekletildikten sonra hücre ekimi için kullanılmıştır. Hücre taşıyıcıların hücre canlılığı

araştırmalarında Saos-2 ve L929 hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler, içine fetal sığır serum (FBS, %10, v/v) ve penisilin/streptomisin (%1) eklenmiş DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM high glucose-Glutamine, Biochrom, Almanya) besi ortamında 37°C'de %5 karbondioksit ve %95 nemli hava içeren inkübatörde (5215, Shel Lab, ABD) kültive edilmiştir. Hücreler, en az % 80-90 konfluensiye ulaştıklarında, pasajlama için %0.1 tripsin-EDTA ile tripsinize edilmiştir.

3.6.1 Alamar Mavisi Canlılık Testi

Bu test, hücrelerin i-metabolik aktivitelerinin 7-Hidroksi-3H-fenoksazin-3-on-10-oksidi'nin (Invitrogen, ABD) kimyasal olarak indirgenmesi temeline dayanmaktadır. Devam eden hücre çoğalması indirgenme ortamını sabitlerken büyümenin inhibisyonu oksidize ortamı sabitler. Buradaki indirgenme redoks indikatörünün okside olmuş floresan olmayan mavi formundan indirgenmiş floresan olan kırmızı formuna dönüşmesine neden olur. Bu nedenle renk değişimi hücre büyümesi ile ilişkilendirilir. Öncelikle, 7mm×7mm×2mm (en×boy×yükseklik) boyutlarında kesilen taşıyıcıların hücre ekiminden önce DMEM ile ıslanmaları sağlanmış ve 24 saat beklendikten sonra her bir hücre taşıyıcı üzerinde 30 000 hücre ve kuyucukta 0.5 ml besiyeri olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Saos-2 proliferasyonu, inkübasyonun 1., 4. ve 7. Günlerinde, 7-Hidroksi-3H-fenoksazin-3-on-10-oksidi (alamar blue assay, Invitrogen, ABD) ile belirlenmiştir (Mishra vd., 2011). Her bir periyottan sonra örnekler nazikçe PBS (pH 7.2) ile yıkanmış ve yeni bir 48 kuyucuklu plakaya aktarılmıştır. Her bir 0.5 ml'lik DMEM özeltisi 50 µL alamar mavisi çözeltisi (5 mg/mL) içerecek şekilde kuyucuklara yüklenmiş ve 4 saat boyunca 37°C'de, karbondioksit inkübatörde bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda alamar mavisi çözeltisi yeni kuyucuklara transfer edilmiş ve optik yoğunluk (O.D.) değerleri mikropilaka okuyucu (µOuant™ microplate spectrophotometer, Biotek Instruments Inc., ABD) ile 570 ve 600 nm'de ölçölmüştür. Elde edilen sonuçlar kullanılarak grupların indirgenme yüzdeleri hesaplanmıştır. Birlikte elektroğirme ile üretilen taşıyıcı (PHBV/PCL/SA:PUL/DS) ile karşılaştırmak üzere üç kontrol grubu çalışılmıştır. Bu gruplar, PHBV/PCL, DS kabukları eklenmiş PHBV/PCL ve SA yüklenmiş PHBV/PCL fiberli taşıyıcılardır. Ayrıca bu taşıyıcı grupları (PHBV/PCL/DS, PHBV/PCL/SA ve PHBV/PCL/SA:PUL/DS) ile karşılaştırılmak üzere bakteriyel PHBV kullanılarak üretilen taşıyıcı (B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS) için birlikte canlılık testi tekrarlanmıştır.

3.6.2 Alkalen Fosfataz Aktivite Testi

Hücre taşıyıcılar üzerine ekilen Saos-2 hücrelerinin alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi 7 ve 14 günlük inkübasyon süreleri sonunda ölçölmüştür. İnkübasyon süreleri sonunda taşıyıcılar üzerindeki besiyeri çekilerek taşıyıcılar PBS ile yıkanmıştır. PBS çekildikten sonra, taşıyıcılar üzerindeki hücreleri patlatmak ve hücre sitoplazma içeriğine ulaşmak için, taşıyıcılar önce 20

dakika boyunca -80 °C'de daha sonra 20 dakika boyunca 37 °C'de bekletilmiş ardından taşıyıcılar üzerine PBS eklenmiş ve taşıyıcılar tekrar 20 dakika boyunca -80 °C'de, 20 dakika boyunca 37 °C'de bekletilmiştir. Bu sayede patlatılmış hücre içeriği PBS içerisinde çözülmüş olarak elde edilmiştir. Grupların ALP aktivitesi ölçülmesi için 96 kuyucuklu plaka içerisinde her gruptan 75 µL hücre içeriği ve 75 µL p-nitrofenil fosfat (pNPP) substrat eklenmiştir. Reaksiyonu hızlandırmak için katalist olarak MgCl₂ solüsyonu (10 mM) kullanılmıştır. Plaka 1 saat boyunca 37 °C'de karanlıkta bekletildikten sonra kuyucuklarda optik yoğunluk ölçümü 405 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu (Biotek Instruments Inc., µQuant™, ABD) ile yapılmıştır. ALP aktivitesinin hesaplanması için kalibrasyon eğrisi bilinen p-nitrofenol miktarları ile hazırlanmıştır. Hücre yoğunluğu ile ALP aktivitesi sonuçlarının dengelenmesi için spesifik ALP aktivite hesabı yapılmıştır. Bu hesap için kuyucuklardaki protein miktarı bicinchoninic asit (BCA) testi ile hesaplanmıştır. BCA solüsyonunu hazırlamak için bakır sülfat solüsyonu (0.1 g/mL) 1:50 hacimsel oranında BCA ile karıştırılmıştır. Test için 96 Kuyucuklu plaka içerisinde 125 µL BCA solüsyonu 75 µL hücre içeriğine eklendikten sonra plaka 15 dakika boyunca 60 °C'de bekletilmiştir. Ardından kuyucukların optik yoğunluğu 562 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda ölçülmüştür. BCA testi için kalibrasyon eğrisi bilinen miktardaki siğir serum albumin ile hazırlanmıştır. Sonuçlar spesifik enzim aktivitesi (nmol/µg protein/dakika) olarak verilmiştir. Hücrelerin ALP aktivitesini artıracak optimum diatom konsantrasyonu, farklı miktarlarda DS (64:1, 32:1, 16:1, 8:1 ve 4:1; PHBV/PCL:DS) içeren PHBV/PCL taşıyıcıların ALP aktivitesi karşılaştırılarak bulunmuştur.

3.6.3 SEM ile Hücre Morfolojisi ve Tutunması Analizi

Hücre taşıyıcılar üzerinde çoğalan hücrelerin morfolojisini gözlemlemek için, taşıyıcılar üzerindeki hücrelere tespit işlemi uygulanmıştır. Hücreler 7 gün boyunca taşıyıcı üzerinde çoğaltıldıktan sonra, yeni 48 kuyucuklu plakalara alınmış ve PBS ile yıkanmıştır. Ardından taşıyıcılar üzerine 0.5 ml %4'lük paraformaldehid çözeltisi eklenmiş ve 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra taşıyıcılar tekrar PBS ile yıkanmış ve taşıyıcılarda kalan suyun uzaklaştırılması için örnekler artan etanol konsantrasyonlarına (%30, %50, %70, %80, %90, %100) maruz bırakılmıştır. Her bir etanol çözeltisi 0.5 ml olarak kuyucuklara eklenmiş ve taşıyıcılar her bir etanol konsantrasyonunda 10'ar dakika bekletilmiştir. Fazla etanol uzaklaştırıldıktan sonra taşıyıcılar, üzerlerine eklenen hekzametildisilezana (0.5 ml) 15 dakika boyunca maruz bırakılmıştır. Son olarak fazla hekzametildisilezan uzaklaştırılmış ve taşıyıcılar 30 dakika çeker ocak altında geride kalan hekzametildisilezanın uçması için bekletilmiştir. Sabitleme işlemine tabi tutulmuş hücre taşıyıcılar, 4°C'de SEM analizine kadar saklanmıştır.

3.6.4 Konfokal Mikroskopu ile Hücre Morfolojisi ve Dağılımı Analizi

Hücrelerin taşıyıcı içerisindeki dağılımları, 7 gün inkübasyon sonunda, konfokal lazer taramalı mikroskopisi ile incelenmiştir. Taşıyıcı üzerinde büyütülen hücreler sabitlemeye tabi tutulduktan sonra, hücre iskeletini oluşturan F-aktin'lere bağlanan Fluorescein isothiocyanate (FITC)-phalloidin boyası (Invitrogen, ABD) ve DNA'ya bağlanan Propidium iodide-(PI) boyası (Invitrogen, ABD) kullanılarak boyama işlemi yapılmıştır. Boyanan örneklerin floresan ışımaya görüntüleri, Argon (458–477–488–514 nm), HeNe/1 (543 nm), ve HeNe/2 (633 nm) lazerleriyle çalışan, konfokal lazer taramalı mikroskopi (Zeiss LSM 510, Almanya) ile görüntülenmiştir (ODTÜ, MERLAB).

Hücrelerin B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcı içerisindeki dağılımları, 7 gün inkübasyon sonunda, konfokal lazer taramalı mikroskop ile incelenmiştir. Taşıyıcı üzerinde büyütülen hücreler sabitlemeye tabi tutulduktan sonra, hücre iskeletini oluşturan F-aktin'lere bağlanan Fluorescein isothiocyanate (FITC)-phalloidin boyası (Invitrogen, ABD) ve DNA'ya bağlanan Draq5 boyası (Invitrogen, ABD) kullanılarak boyama işlemi yapılmıştır. Boyanan örneklerin floresan ışımaya görüntüleri, konfokal lazer taramalı mikroskop (CSLM, Leica DM2500, Almanya) ile görüntülenmiştir (ODTÜ, BİOMATEN).

3.7 PHBV Polimerinin Bakteri Suşunda Üretimi ve Özelliklerinin İncelenmesi

3.7.1 PHBV Polimerinin Bakteri Suşunda Üretimi ve Saflaştırılması

Yurt dışından liyofilize olarak temin edilen *Haloferax mediterranei* (ATCC 33500) suşu, bu bakteri türü için önerilen besiyerine (g/L: NaCl, 156; MgCl₂.6H₂O, 13; MgSO₄.7H₂O, 20; CaCl₂.6H₂O, 1; KCl, 4; NaHCO₃, 0.2; NaBr, 0.5; maya özütü, 5; glikoz 1. pH 7.0) aktarılarak canlandırılma işlemlerine başlanmıştır. Önerildiği gibi 37°C de 72 saat dakikada 150 devirde çalkalanarak 2 gün inkübe edilmiş, daha sonra %5'lik inokül alınarak besiyeri ölçeği büyütülmüş, aynı şartlarda 3 gün inkübe edilmiştir. Akabinde tüm hücreler toplanarak -80 °C stokları hazırlanmıştır. PHBV üretimi için, ilk etapta Lu vd. (2008) çalışmasında kullandığı büyüme ortamı ve şartları tatbik edilmiştir. Buna göre AS-168 (NaCl, 200g/L; MgSO₄.7H₂O, 20g/L; KCl, 2g/L; trisodyum sitrat, 3 g/L; sodyum glutamat, 1 g/L; FeSO₄.4H₂O, 50 mg/L; MnCl₂.4H₂O, 0.36 mg/L; Bacto Casamino Asit, 5 g/L; maya özütü, 5 g/L. pH 7.2.) AS-168 ortamında 37°C de 48 saat inkübe edilip, ardından MST ortamına (NaCl, 200 g/L; MgSO₄.7H₂O, 20 g/L; KCl, 2 g/L; sodyum glutamat, 1 g/L; KH₂PO₄, 37.5 mg/L; FeSO₄.7H₂O, 50 mg/L; MnCl₂.4H₂O, 0.36 mg/L; maya özütü, 1 g/L; nişasta, 10 g/L ve pH 7.2) aktarılması planlanmıştır, fakat AS-168 ortamına ekilen hücrelerde büyüme gözlenmemiştir.

Literatür araştırması genişletilmiş, *Haloferax mediterranei* için kullanılan diğer bir büyüme ortamı olan SW-25 (g/L: NaCl, 202.5 (240); MgCl₂, 17.5 (30); MgSO₄, 24 (35); CaCl₂, 0.9

(0.5); KCl, 5 (7) ; NaHCO₃, 0.15; NaBr, 0.065; ve maya özütü, 5 ve pH 7.2) denenmiş, inokül büyüklüğü değişimi (5% , 10%), büyüme sıcaklığı (37°C ve 40°C) inkübasyon süresi (2 gün, 7 gün, 14 gün) değişimleri denenmesine rağmen belirgin bir büyüme gözlenmemiştir.

PHBV üretim potansiyelini öngörmek amacıyla *Bacillus polymyxa* DSM36 suşu, besi agarı içeren petri plak üzerine ekilerek 37°C'de bir gece inkübe edilmiş, % 0.003'lük Sudan Black B boyası uygulanmış ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş, ardından %96'lık etanol ile hücreler yıkanmıştır.

Bacillus polymyxa DSM36 suşu, Güngörmedi vd. (2014) tarafından kullanılan sıvı polimer üretim besiyerinde (sükroz, 20 g/L; K₂HPO₄, 1.5 g/L; Na₂HPO₄.2H₂O, 4.7 g/L; MgSO₄.7H₂O, 0.2 g/L; CaCl₂.2H₂O, 0.01 g/L; sitrik asit, 0.1 g/L; eser element solüsyonu, 1 ml. Eser element solüsyonu: FeSO₄.7H₂O, 0.2 g/L; H₃BO₃, 0.3 g/L; CoCl₂.6H₂O, 0.2 g/L; ZnSO₄.7H₂O, 0.03 g/L; MnCl₂.4H₂O, 0.03 g/L; (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 0.03 g/L; NiSO₄.7H₂O, 0.03 g/L; CuSO₄.5H₂O, 0.01 g/L) 30°C'de, dakikada 150 devir çevrim hızında 48 saat büyütülmüştür. Bakteri ile beraber üretilen polimerin toplanması için sıvı besiyerinde 30°C'de 48 saat büyütülen hücrelerden %5'lik inokülüm alınarak polimer ortamına ekim yapılmıştır. İki litre olan polimer ortamında da 30°C'de 48 saat inkübe edilmiş, ardından dakikada 6000 devirde 20 dakika santrifüj edilerek tüm hücreler toplanmıştır. Hücreler steril distile su ile yıkandıktan sonra, 80°C'de 2 gün kurumaya bırakılmış, 2 gün daha desikatörde bekletilerek tamamen kurutulmuştur. Kuru kütle ölçümleri 0.31 g, 0.06 g, 0.11 g, 0.09 g olarak bulunmuştur. Daha sonra polimer saflaştırılması ve ilgili analizlerin yapılması için ODTÜ'ye gönderilmiştir.

Bakteri peleti serum fizyolojik solüsyonu ile yıkandıktan sonra, bakteriler eşit hacimde konulan sodyum hipoklorit (% 5.5 aktif klorin) içerisinde süspanse edilerek 45°C'de 60 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra, dakikada 8000 devirde 20 dk santrifüj ile elde edilen pelet önce distile su, sonrasında iki defa etanol:aseton karışımı (2:1) ile yıkanmış ve dakikada 8000 devirde 20 dk santrifüj ile bakteri hücre içi fragmanları ve polimer karışımından oluşan pelet elde edilmiştir. PHBV ekstraksiyonu için, pelet kloroform içerisinde 30-40 dk kaynatılıp geri dönüşlü kondensör içerisinde bekletilerek, soğuduktan sonra kloroform içerisinde çözülen polimer bakteri kütlelerinden ayrılmıştır. Polimer kloroform içerisinde etanol eklenmesi ile çöktürülerek elde edilmiş ve kloroform içerisinde çözme ve etanolde çöktürme basamakları tekrarlanarak saflaştırılmıştır (Williamson ve Wilkinson, 1958; Rambo vd., 2012; Shishatskaya ve Volova, 2004). Pelet başına elde edilen polimer verimliliği 0.09 g/g olarak hesaplanmıştır.

Cupriavidus necator (DSMZ 428) ile, El-Sayed vd. (2009) tarafından rapor edildiği gibi PHB polimer üretim potansiyeli analiz edilmiştir. Bu amaçla, *C. necator*, sıvı besiyerinde dakikada 150 devir çalkalanarak ve agar plağı üzerine çizilerek 30°C de 48 saat büyütülmüştür. Sıvı besiyerinde büyüyen hücrelerden %5 inokül olacak şekilde alınarak polimer üretim besiyerinde (glikoz, 10 g/L; (NH₄)₂SO₄, 1 g/L; KH₂PO₄, 1.5 g/L; Na₂HPO₄.12H₂O, 9 g/L;

MgSO₄·7H₂O, 0.2 g/L; eser element solüsyonu, 1 ml. 10 mg/L ZnSO₄·7H₂O; 3 mg/L MnCl₂·4H₂O; 30 mg/L H₃BO₃; 20 mg/L CoCl₂·6H₂O; 1 mg/L CuCl₂·6H₂O; 2 mg/L NiCl₂·6H₂O; 3 mg/L NaMo₇O₄·2H₂O), dakikada 150 devirde 30 °C'de 48 saat inkübe edilmiş, daha sonra ortamdan örnek alınmış ve hücreler dakikada 13 000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Hücreler, polimer oluşumunun görülebilmesi için % 0.003'lük Sudan Black B ile boyanmıştır.

Cupriavidus necator (DSMZ 428) suşunda tespit edilen polimerik yapının belirlenmesi için, 2 L. polimer üretim besiyerinde büyütülen *Cupriavidus necator* (DSMZ 428) hücreleri, santrifüjle toplanmış, steril distile suyla yıkanmış, 80 °C'de 2 gün etüvde, ardından desikatörde 2 gün bekletilerek tamamen kurutulmuştur. Kuru kütle ağırlığı 0.33 g olan hücre kütlesi elde edilmiş ve ODTÜ'ye incelenmek üzere gönderilmiştir.

PHBV polimeri üretilmesi için ticari olarak satın alınan *Cupriavidus necator* (DSMZ 428) suşuyla, PHBV üretim besiyeri olan Berezina (2012) kullandığı mineral ortamı kullanılarak, PHBV üretimi başarıyla sağlanmıştır; Mineral Medium: 6.7 g/L Na₂HPO₄·2H₂O; 1.5 g/L KH₂PO₄; 1 g/L (NH₄)₂SO₄; 0.2 g/L MgSO₄·7H₂O; 0.01 g/L CaCl₂·2H₂O; 0.06 g/L Fe(NH₄)₂(SO₄)₂; 1 ml/L eser element çözeltisi. Eser element çözeltisi : 0.3 g/L H₃BO₃; 0.2 g/L CoCl₂; 0.1 g/L ZnSO₄·7H₂O; 0.03 g/L MnCl₂·4H₂O; 0.02 g/L NaMoO₄·2H₂O; 0.02 g/L NiCl₂·6H₂O; 0.01 g/L CuSO₄·5H₂O. Öncelikle nutrient agar plağa çizilmiş olan *C. necator* içinde ekstrasdan 10 g/L glikoz ve 10 g/L glutamat bulunan 100 ml zengin mineral ortama ekilerek 24 saat, 30 °C de, 150 dakikada devir sayısında çalkalanmıştır. Daha sonra %5 inokül olacak şekilde alınarak içinde 1 g/L sodyum propiyonat olan mineral ortama ekim yapılmış ve 48 saat 30°C de inkübe edilmiştir. *Cupriavidus necator* (DSMZ 428) suşunda tespit edilen polimerik yapının belirlenmesi için, *Cupriavidus necator* (DSMZ 428) hücreleri, 5000 dakikada devir sayısında 30 dakika santrifüjle toplanmış, steril distile suyla yıkanmış, 80 °C de 2 gün etüvde ve yine ardından desikatörde 2 gün bekletilerek tamamen kurutulmuştur. Kuru kütle ağırlığı 2.6 g olan hücre kütlesi elde edilmiş ve polimer analizleri için ODTÜ'ye gönderilmiştir.

3.7.2 Hidrojen Sıvı Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (H-NMR)

PHBV polimerinin yapısal düzeni hakkında bilgiler, H-NMR analizleri ile elde edilmiştir. Deney yüksek performanslı aktif siperli süper iletken mıknatıs (Ultrashield™ 300 MHz), 5 mm BBO 1H prob ve 300 MHz yüksek çözünürlükte dijital H-NMR spektrometre cihazı (Bruker Biospin, ABD) ile ODTÜ MERLAB'da yapılmıştır. PHBV polimer örnekleri (40 mg) Döteryum Kloroform (CDCl₃) içinde çözülerek çözelti grupları hazırlanmış ve analiz edilmiştir.

3.7.3 Üretilen PHBV Polimerinin Valerat Yüzdesinin Hesaplanması

H-NMR analizi sonucu elde edilen grafik kullanılarak PHBV polimeri içindeki valerat kopolimer yüzdesi hesaplanmıştır. İzlenen yol ana basamaklarıyla şu şekildedir: Valerat gruplarının göreceli mol sayısını bulmak için grafikteki valerat grubuna özgü tepe noktasının integral değeri, gruptaki protonların sayısına bölünmüştür. Aynı işlem bütrat integralleri için de yapılmıştır. Valerat kopolimerinin mol yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Valerat polimerinin mol miktarı (\%)} = \frac{\text{Valeratin göreceli mol değeri}}{(\text{Valerat} + \text{Bütrat})\text{göreceli mol değeri}} \times 100$$

3.7.4 Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR analizi PerkinElmer L1050002 serisi spektrofotometre (PerkinElmer, Inc., İngiltere) ile yapılmıştır. Yazılım programı iletim modunda, 100/100 N spektrumunda çalışılmıştır. Analiz 4000–400 cm⁻¹ dalga-sayısı aralığında, 4 cm⁻¹ çözünürlükte, toplamda örnek başına 50 tarama yapılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler havan ile dövülerek toz haline getirilmiş ve KBr ile 1:10 oranında karıştırılarak ölçüm alınmıştır. Örneğin spektrumu arka plan ve atmosfere göre düzeltilmiştir.

3.7.5 Termogravimetrik Analizler, Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

Sentezlenen ve ticari olarak satın alınan PHBV örneklerinin termogravimetrik analizleri ODTÜ Merkez laboratuvarında bulunan DSC cihazında (Perkin Elmer DSC Diamond, ABD) - 20°C ile 240°C sıcaklık aralığında, 10°C/dk ısıtma hızında yapılmıştır.

3.7.6 Saflaştırılan Bakteriyel PHBV Polimerinde Bakteriyel Protein Kirliliğinin BCA Testi ile Araştırılması

Bakteri suşu ile üretilen PHBV polimerinde saflaştırıldıktan sonra bakteriyel protein kirliliğinin olup olmadığı BCA testi ile incelenmiştir ve ticari PHBV sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. BCA solüsyonunu hazırlamak için bakır sülfat solüsyonu (0.1 g/mL) 1:50 hacimsel oranında BCA ile karıştırılmıştır. PHBV örnekleri 48 kuyucuklu plaka içerisine yerleştirilmiştir ve kuyucuklara 500 µL BCA solüsyonu eklendikten sonra plaka 15 dakika boyunca 60 °C'de bekletilmiştir. Ardından kuyucukların optik yoğunluğu 562 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda ölçülmüştür. BCA testi için kalibrasyon eğrisi bilinen miktardaki sığır serum albumin ile hazırlanmıştır. Bakteriyel PHBV'de protein kirliliği olup olmadığı kontrol olarak kullanılan ticari PHBV ve boş kuyucuk ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.8 Bakteriyel PHBV kullanılarak B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS Taşıyıcıların Üretimi

Yukarıda (3.4. PHBV/PCL/SA:PUL/DS Taşıyıcıların Üretimi kısmında) anlatılan yöntemle iki fiberli SA ve DS içeren üç boyutlu taşıyıcılar ticari PHBV yerine proje kapsamında bakteri

suşu ile üretilip karakterize edilen B-PHBV ile tekrar hazırlanmıştır. Birinci polimer çözeltisi yine aynı polimer ve DS bileşenleri ve oranları kullanılarak hazırlanmıştır. İkinci polimer çözeltisi olarak, HFIP içerisinde % 10 konsantrasyonunda hazırlanmış B-PHBV/PCL (7/3, g/g) polimer karışımı kullanılmıştır. Antibiyotik yüklü fiberlerin üretilmesi için, B-PHBV/PCL polimer çözeltisi içerisinde SA eklenmiştir ve bu çözelti de aynı toplama ortamına aynı koşullarda elektroçirime işlemi uygulanarak elde edilmiştir.

3.9 B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS Taşıyıcıların Karakterizasyonları

B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS hücre taşıyıcıların karakterizasyonu için diğer gruplar için belirtilen karakterizasyon metodları uygulanmıştır ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

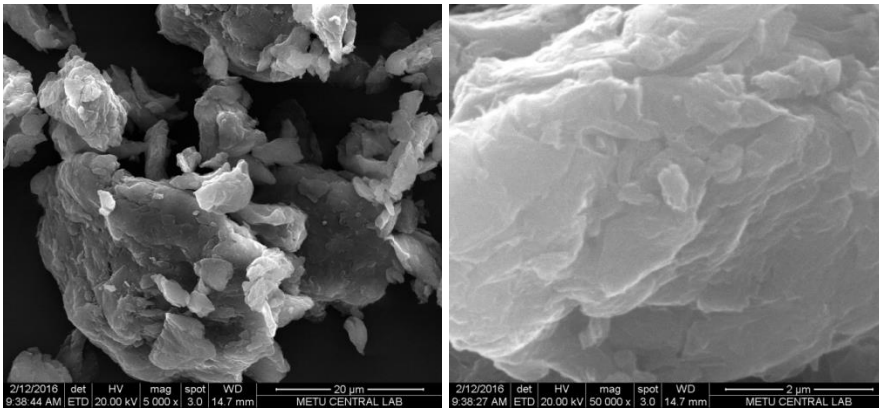
3.10 İstatistiksel Analizler

Bütün verilerin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmış ve varyans analizlerinde kullanılan tek yönlü ANOVA testi için SPSS 22 Software (SPSS Inc.) programı kullanılmıştır. Bunun yanı sıra Tukey çoklu karşılaştırma analizi yapılarak $p < 0.05$ anlamlılık değerleri için gruplar arasında bir fark olup olmadığı incelenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMALAR

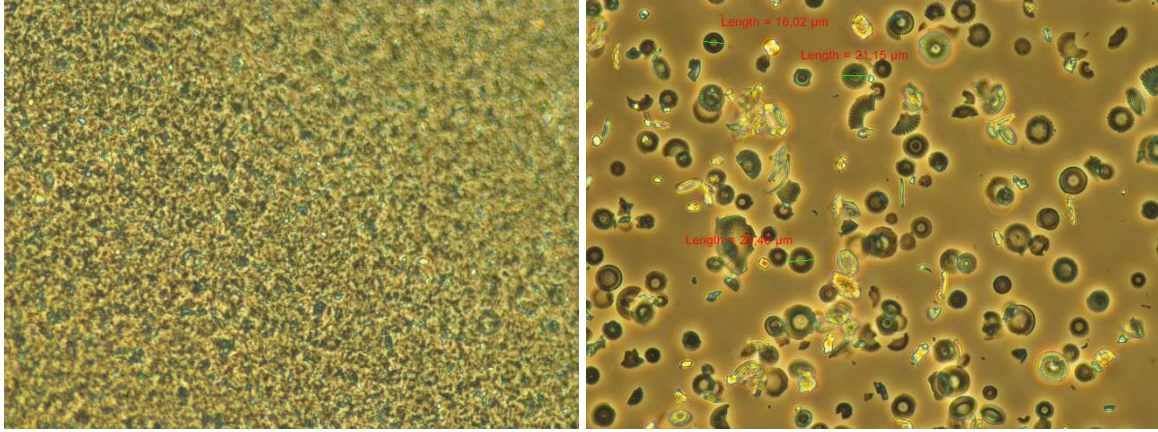
4.1 Diatom Silika Kabuklarının Saflaştırılması ile İlgili Bulgular

Projede, DS kabuk kaynağı olarak ilk satın alınan kizelgur (Diatom toprağı), saflaştırma işlemlerine tabi tutulmuştur. Ancak saflaştırma sonrası alınan SEM görüntülerinde DS kabukları gözlenememiştir (Şekil 3). Bu nedenle projede kullanılmak üzere tatlı su diatom toprağı satın alınmıştır.



Şekil 3. Saflaştırma işlemine tabi tutulmuş kizelgur'un 5000x (sol) ve 50000x (sağ) büyütme ile SEM görüntüleri.

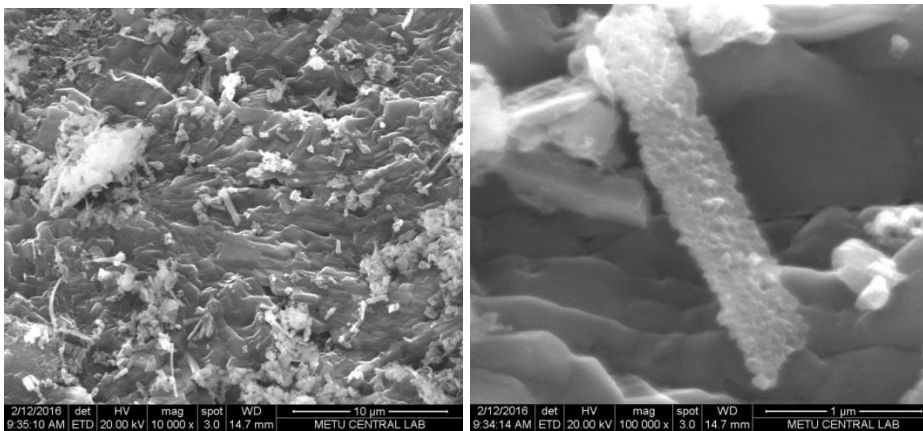
İkinci olarak alınan DS kabukları de yine çöktürme ve yıkama metodu ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma öncesi ve sonrası ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 4'de görülmektedir. Saflaştırma işlemi sonrasında kırık DS kabuk parçaları ve muhtemel yabancı maddeler uzaklaştırılabilmiş ve DS kabukları tekil olacak şekilde, büyük ölçüde homojen yapıda bir başlangıç grubu elde edilebilmiştir.



Şekil 4. Satın alınan tatlı su DS kabuklarının başlangıç (sol) ve saflaştırma işlemi sonrasında (sağ) ışık mikroskobu görüntüsü.

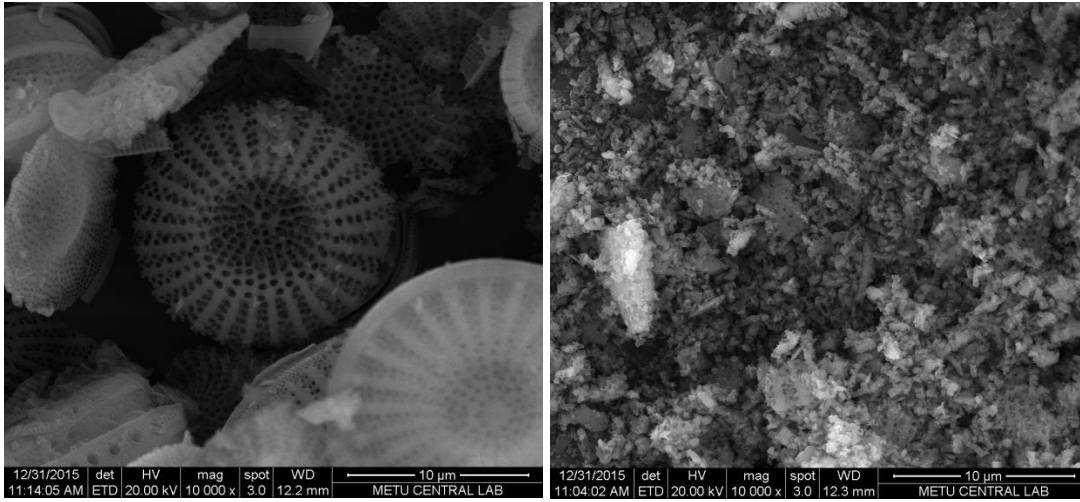
4.2 Diatom Silika Kabuklarının Parçalanarak Farklı Boyutta Örnekler Oluşturulması

Farklı boyutta DS kabuklarının eldesi için farklı yöntemler denenmiştir. Bunlardan ilki bazik (NaOH ile) parçalama işlemidir; bu işlemden sonra DS kabuklarının parçalanıp en küçüğü 1 mikron eninde olan plakalara ayrıldığı SEM görüntüleri ile belirlenmiştir (Şekil 5). Bununla birlikte, DS parçalarının birbirine yapıştığı ve daha büyük kütleler oluştuğu gözlenmiştir. Bu yöntem sonucunda elde edilen DS parçalarının homojen dağılmaması ve çok az miktarda DS parçacığı elde edilebilmesi nedeniyle bu protokol daha sonraki çalışmalarda kullanılmamıştır.



Şekil 5. Bazik (NaOH ile) parçalama işlemine tabi tutulmuş DS kabuklarının 10 000x (sol) ve 100 000x (sağ) büyütme ile SEM görüntüleri.

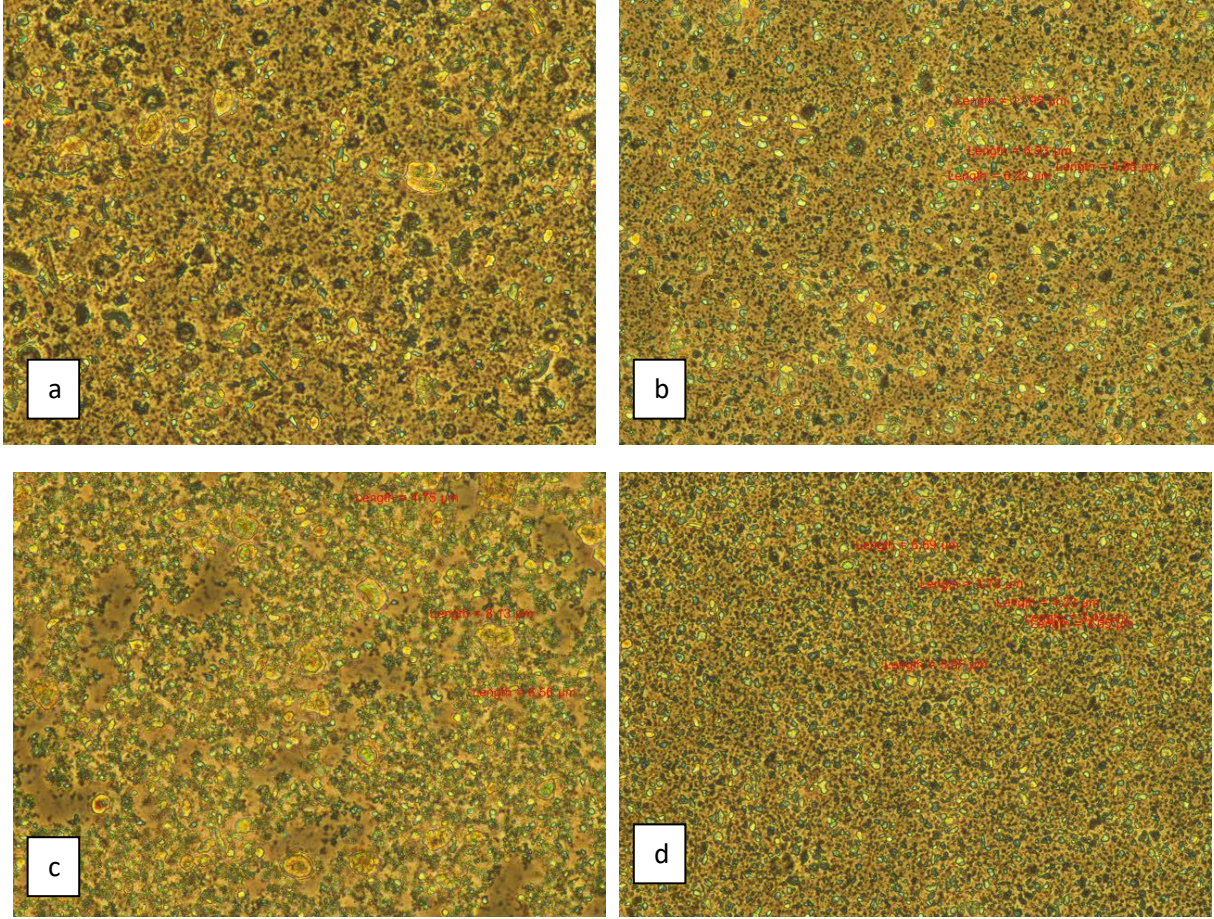
İkinci yöntemde, agat öğütücü ile kabuklar parçalanmıştır; öğütülen DS kabuklarının SEM görüntüsü ve ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 6 ve 7’de sunulmuştur. Öğütülme süresi arttıkça DS kabuk parça boyutlarının daha da küçüldüğü gözlenmiştir. Kısa süreli (1dk’lık) öğütme işleminden sonra DS kabuklarının büyük ölçüde parçalandığı ancak halen bütün halde (15-25 mikron) DS kabuklarının kaldığı görülmüştür. Orta süreli (5 dk’lık) öğütme işleminden sonra bütün halde DS kabuğu kalmadığı ve parçalanan DS kabuklarının en büyüklerinin 11 mikron civarında olduğu gözlenmiştir. Uzun süreli (10 dk’lık ve 15 dk’lık) öğütmeler sonrasında en büyük parçacık boyutu sırasıyla 6 mikron ve 4 mikron civarına düşmüştür.



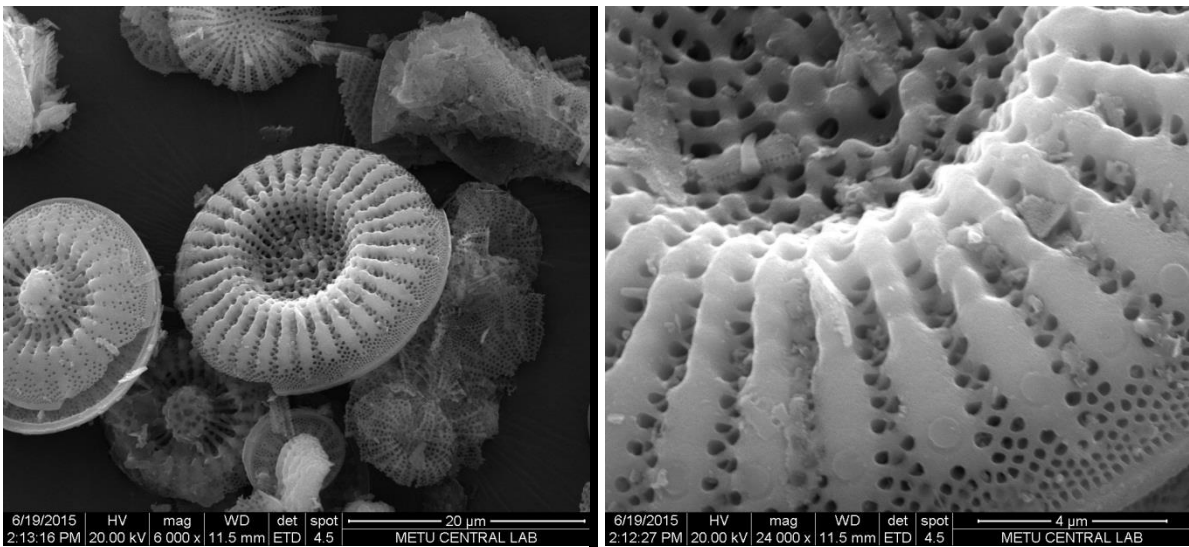
Şekil 6. Öğütülme işlemi öncesi (sol) ve 15 dakika öğütülme işlemi sonrasında (sağ) DS kabuklarının SEM görüntüleri.

Satın alınan tatlı su DS kabuklarının SEM görüntüsü Şekil 8’de gösterilmiştir. SEM görüntülerinde DS kabuklarının mikro ve nano boyuttaki desenli gözenekli yapıları ve özgün yüzey morfolojisi net olarak görülmektedir.

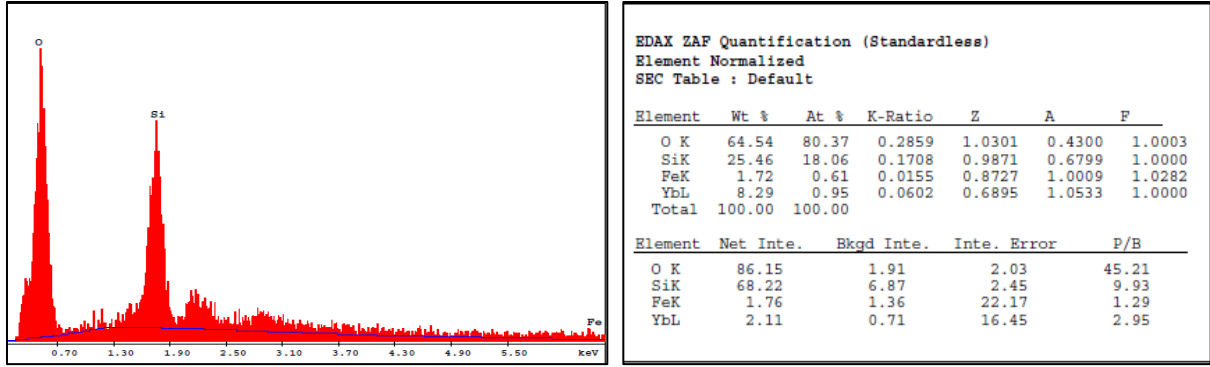
SEM görüntüleme anında uygulanan EDX analizi ile DS kabuklarının elemental analizi de yapılmıştır. Kabuk yapıda ağırlık olarak %64.54 oksijen ve %25.46 silikon tespit edilmiştir. Böylece DS kabuk yapısının beklendiği gibi temel olarak silika yapısında olduğu ve kirletici başka maddelerin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 9).



Şekil 7. Agat öğütücü ile 1 (a), 5 (b), 10 (c) ve 15 (d) dakika öğütülmüş DS kabuk numunelerinin ışık mikroskobu görüntüleri (10X). Öğütme sonrası ortalama parça boyutları, $\approx 12 \mu\text{m}$ (a), $\approx 8 \mu\text{m}$ (b), $\approx 4 \mu\text{m}$ (c) ve $\approx 3 \mu\text{m}$ (d) şeklindedir.

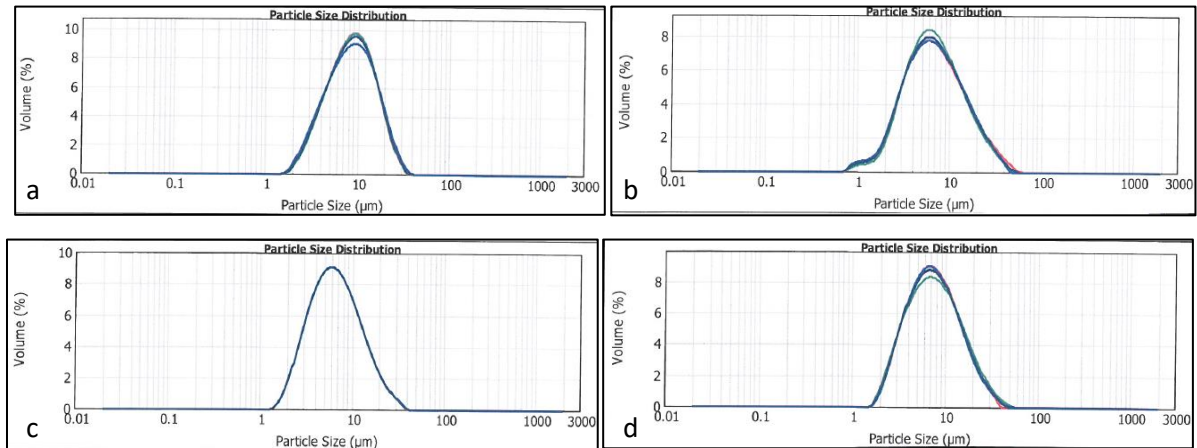


Şekil 8. DS kabuklarının 6000x (sol) ve 24000x (sağ) büyütme ile SEM görüntüleri.



Şekil 9. DS kabuklarının EDX sonucundaki element dağılım grafiği (Sol) ve element oranı analiz tablosu (Sağ).

Agat öğütücü ile parçalanmış DS kabuklarının boyut dağılımı, parçacık boyut analizi ile incelenmiştir. Yapılan analizde 1, 5, 10 ve 15 dk öğütülen DS kabuklarının boyut dağılımı karşılaştırıldığında aralarında çok büyük bir farka rastlanmamıştır (Şekil 10).



Şekil 10. DS kabuklarının 1 (a), 5 (b), 10 (c) ve 15 dk (d) öğütme sonrasında parçacık boyut dağılımları.

Bu sonuç ışık mikroskobu görüntülerindeki boyut farklılığı ile çelişmektedir (Şekil 7). Agat öğütücüde öğütme süresi arttıkça düşen parçacık boyutu ışık mikroskobu görüntülerinde farkedilmektedir. Parçacık boyut dağılımı analizinde DS kabuk parça boyutlarının benzer çıkmasının nedeninin, analiz esnasında oluşan agregasyon olduğu düşünülmektedir.

Projede hücre taşıyıcılarda kullanılması planlanan DS kaynağı olarak DS kabuk yapısı ve kizelgur'un element içeriğinin karşılaştırılması da X-Ray fotoelektron Spektroskopisi veya Kimyasal analiz için elektron spektroskopisi (ESCA) analizi ile yapılmıştır. Analiz sonucundaki element yüzdeleri Tablo 1'de gösterilmektedir. Yapılan analiz sonucunda

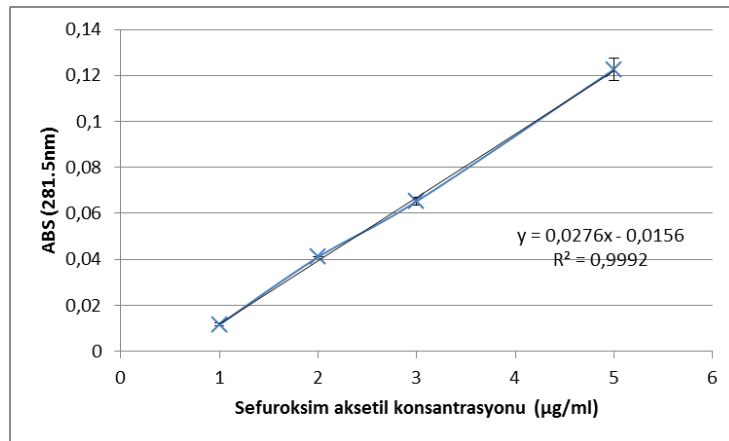
kizelgur içerisinde fazladan demir ve magnezyum elementleri olduğu görülmüştür. Ayrıca alüminyum kirliliği de, DS kabuk yapısı formunda kizelgura kıyasla daha azdır. ESCA analizinde iki grupta da yüksek miktarda karbon olduğu görülmektedir, bu karbon örneklerden bağımsız olarak analiz sırasında oluşan, harici karbon olarak bilinen bir film yapısıdır. XPS analizlerinde vakumlu ortamda örnekler üzerinde ince bir karbon filmi oluşabilmektedir; DS kabuk örnekleriyle bir bağlantısı bulunmadığı düşünülmektedir (Greczynski ve Hultman, 2017). Kizelgur içerisinde bütün halde diatom kabuklarına rastlanmamıştır. Yapılan, DS in vitro hücre toksisite deneyleri sonucunda kabukların bütün halde olmasının daha biyoyumlu olduğu gösterilmiştir (Şekil 26). Bu nedenlerden dolayı, projenin devamında hazırlanan hücre taşıyıcılarda, kizelgur yerine, bütün halde DS içeren tatlı su kaynaklı diatom kabukları kullanılmıştır.

Tablo 1. Yüzey element kompozisyonu (%)

	O	Si	C	Al	Ca	Fe	Mg
DS Kabukları	63.2	23.1	11.1	1.9	0.7	-	-
Kizelgur	63.2	21.9	10.1	2.6	0.8	0.9	0.5

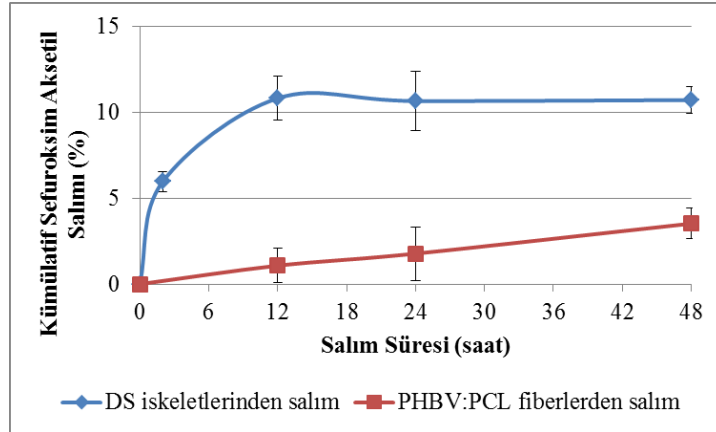
4.3 Antibiyotik Yükleme ve Salım Ön Çalışmalarının Sonuçları

Antibiyotik yükleme ve salım çalışmalarından önce, sefuroksim için tayin ölçümleri yapılmıştır. İlacın çözücüsü olarak kloroform içerisinde UV spektrofotometre’de yapılan dalga boyu taraması sonucunda, antibiyotiğin 281.5nm dalga boyunda belirgin bir emilim tepe noktası olduğu görülmüştür. Yükleme ve salım için antibiyotik tayini bu dalga boyunda yapılmıştır. Bilinen, farklı antibiyotik konsantrasyonları ile kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 11).



Şekil 11. Sefuroksime aksetil için hazırlanan kalibrasyon eğrisi.

Projede, serbest haldeki DS kabuklarından, fibere yüklenmiş DS kabuklarından ve PHBV/PCL fiberlerinden antibiyotik salımı karşılaştırılmıştır. Literatürde DS kabuklarına ilaç yükleme çalışmaları mevcuttur (Aw vd., 2012). İlk aşama olarak sefuroksim, DS kabuklarına veya PHBV:PCL fiberlere ayrı ayrı yüklenerek salım profilleri incelenmiştir (Şekil 12). DS kabuklarına antibiotik yükleme yüzdesi %66 olarak, PHBV:PCL fiberlere yükleme oranı ise %92 olarak hesaplanmıştır. SA yüklü DS kabuklarının ve tek tip fiberden oluşan taşıyıcıların 48 saatlik antibiyotik salımı profili elde edilmiştir. DS kabuklarından, yüklenen antibiyotiğin 17.26 ± 0.92 'sinin, fiber yapılardan ise 3.5 ± 0.95 'inin salındığı ve dolayısıyla fiberlerden salımın daha kontrollü olduğu görülmüştür (Şekil 12). Sefuroksim aksetil hidrofobik bir ilaçtır, bu nedenle ilaç salımının yavaş olması beklenen bir sonuçtur. DS kabuklarından salımda ilk 12 saat sonunda %11 civarında bir başlangıç hızlı salımı sonrasında salımın yavaşladığı görülmüştür. PHBV:PCL fiberlerde ise 48 saat boyunca daha yavaş ve sabit bir oranda salım gözlenmiştir. Bunun nedeni polimer fiberlerinin bu süreçte bozunmasının beklenmemesi ve hidrofobik olan antibiyotiğin hidrofobik karakterdeki iki polimerden oluşan fiber yapıdan daha yavaş uzaklaşması olarak yorumlanmıştır.



Şekil 12. Sefuroksim'in DS kabukları ve PHBV:PCL fiber taşıyıcılardan salım profili.

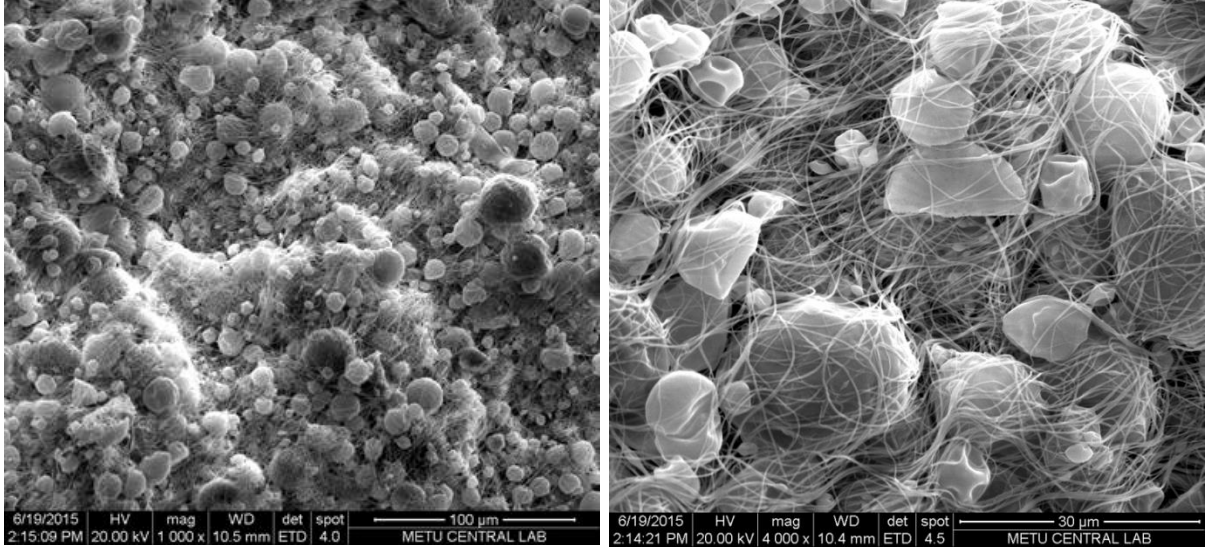
4.4 PHBV/PCL ve PUL/DS Fiberlerinin Bağımsız Olarak Üretimi

İki farklı fiber yapının birlikte elektroğirilmesi deneylerinden önce her iki fiber yapının ayrı ayrı (tek başına elektroğirilerek) oluşturulması ile ön optimizasyon deneyleri yürütülmüş ve tek tip fiberli taşıyıcı yapılar elde edilmiştir.

4.4.1 Elektroğirme ile DS Taşıyan Pullulan (PUL) Fiberlerinin Oluşturulmasının Optimizasyonu

Öncelikle DS kabuklarının bütün halinde elektroğirilebilme özelliğini görebilmek için, parçalanmamış DS kabukları PUL ile beraber su içinde karıştırılarak elektroğirme deneyi gerçekleştirilmiştir. Yapılan denemelerde farklı DS kabuk oranları (%5, %10, %15 ve %20)

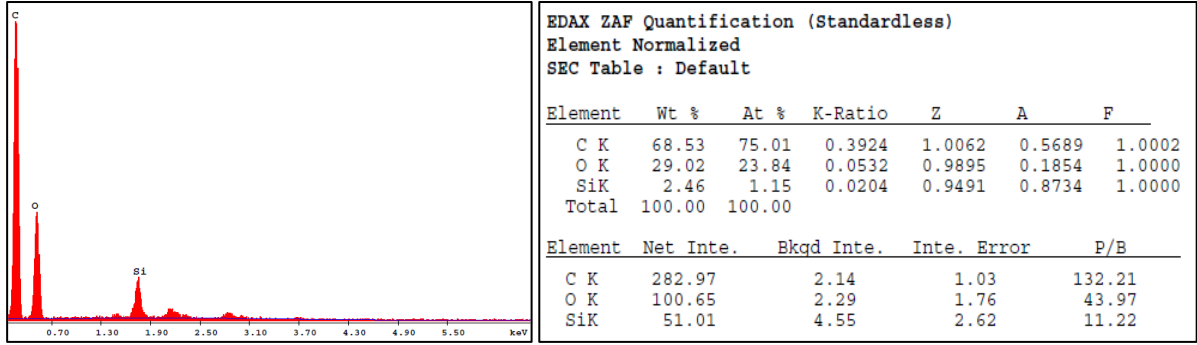
denenmiş ve denemelerde en homojen fiber yapısına sahip ve DS kabuk oranı en yüksek olan grup, PUL/DS: 5/1 (%20) oranında DS kabuk yapısı içeren grup olarak belirlenmiştir. DS kabuklarının (15-25 µm) başarılı bir şekilde PUL ile birlikte elektroğirilip, hedeflendiği gibi PUL fiberleri içinde kaldığı SEM ile görülmüştür (Şekil 13). DS kabukları literatürde ilk kez, bir elektroğirme işleminde polimer ile birlikte, proje kapsamında elektroğirilmiştir. Ayrıca, fiber yapı içinde tutulan DS kabuklarının oldukça yoğun miktarı nedeniyle 3 boyutlu yapıyı destekleyecek şekilde dolgu malzemesi olarak da değerlendirilebileceği gösterilmiştir.



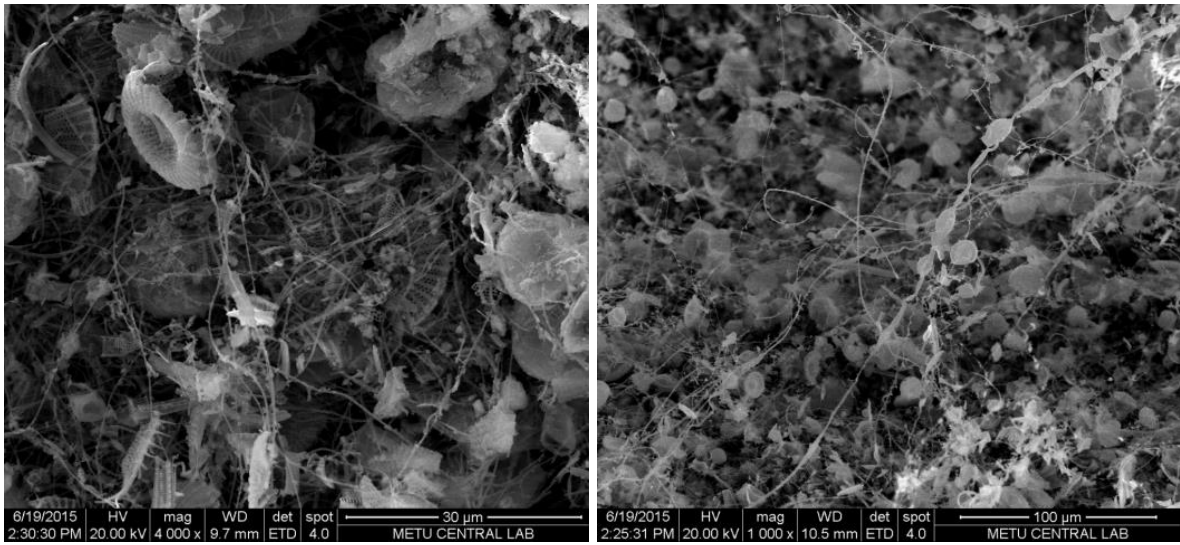
Şekil 13. Elektroğirilmiş PUL/DS (5/1) yapıların 1000X (sol) ve 4000X (sağ) büyütme ile SEM görüntüleri.

SEM analizi yapılan örneklerde SiO₂ kimyasal yapısına sahip DS kabuklarının varlığı Si ve O elementlerinin ölçümü ile desteklenmiştir. EDX analizi sonucunda %29.02 Si ve %68.53 O element oranları tespit edilmiş ve beklenen yüzdeler elde edilmiştir (Şekil 14).

DS kabuklarını elektroğirilmiş PUL fiberli katmanları arasına daha yoğun dağıtmak için ek olarak DS kabuklarını elektroğirme sırasında ara ara toplayıcı ekrana ekleme (serpme) yöntemi de denenmiştir. Bu deneylerin SEM görüntüleri Şekil 15'de sunulmaktadır. DS kabuklarının yüzeyleri net bir şekilde görüntülenebildiği için yüzey analizi yapılmamıştır. PUL polimeri ile kaplanmayan DS kabuklarının, bu yöntemle taşıyıcı yapılara girmiş olduğu, fakat stabilize bir yapı oluşturmadığı değerlendirilmiştir. DS kabuklarının polimer fiberleri içinde elektroğirilebilmesi ve sonuçların serpme yöntemine göre daha homojen görünmesi nedeniyle ilerleyen çalışmalarda serpme yöntemi kullanılmamıştır.



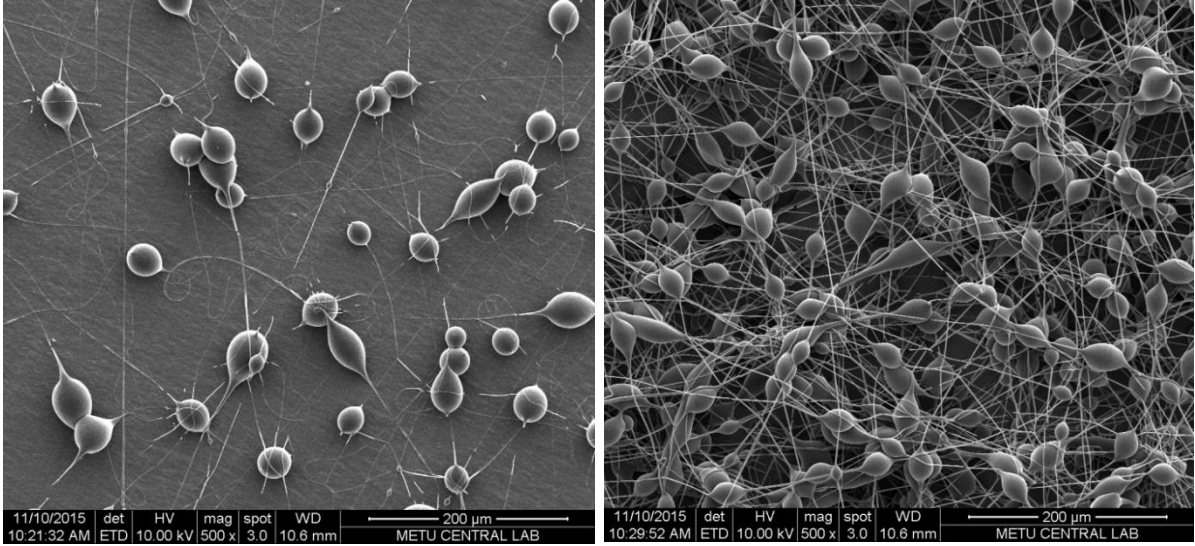
Şekil 14. PUL fiberler içine hapsedilmiş DS kabuklarının EDX analizi sonucunda element dağılım grafiği (Sol) ve element oranı analiz tablosu (Sağ).



Şekil 15. Serpme yöntemi kullanılarak elektroğirilmiş PUL/DS (5/1) yapıların 4000X (sol) ve 1000X (sağ) büyütme ile SEM görüntüleri.

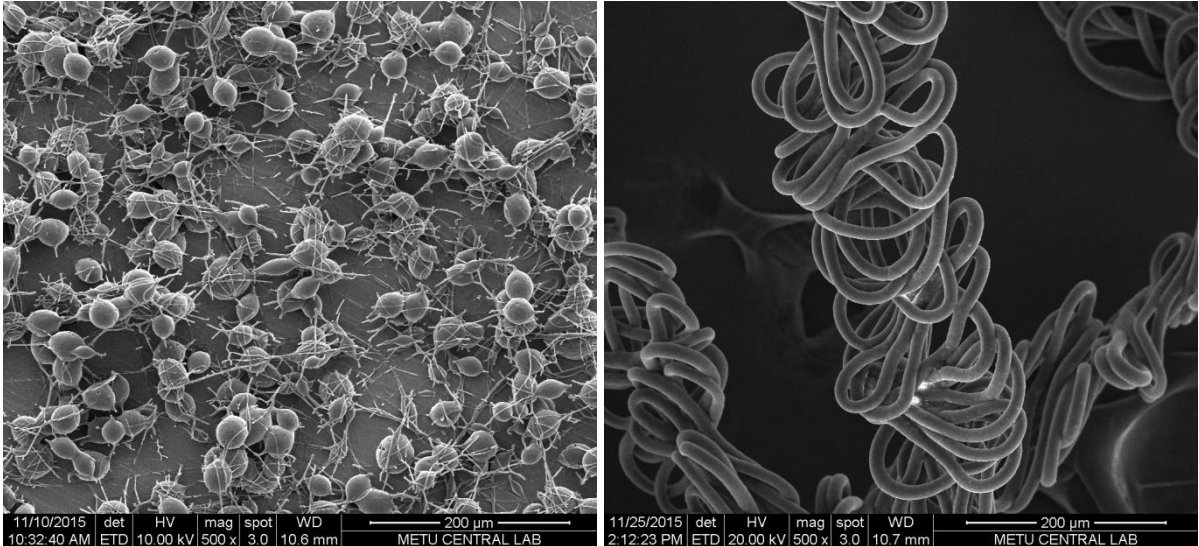
4.4.2 Elektroğirme ile Üç Boyutlu PHBV/PCL Fiberlerin Oluşturulmasının Optimizasyonu

Projenin ilk aşamalarında kloroform çözücüsü ile yapılan PHBV elektroğirme denemeleri sırasında hem geleneksel (kuru) hem de ıslak elektroğirme yöntemleri denenmiştir. Elde edilen taşıyıcıların yapısal özellikleri SEM ile incelenmiştir (Şekil 16). Kuru toplayıcı ekran ile daha geniş alana yayılarak daha çok iki boyutta bir yapı oluşturan PHBV fiberleri, ıslak elektroğirme ile etanol havuz içerisinde daha küçük odaklı ve 3 boyutlu yapı oluşturacak şekilde toplanmıştır. Ancak PHBV fiberlerinin boncuklu bir yapıda olduğu görülmüştür (Şekil 16).



Şekil 16. Kloroform çözücüsü kullanılarak kuru (sol) ve ıslak (sağ) elektroçizme yöntemleri ile üretilmiş PHBV yapıların SEM görüntüleri.

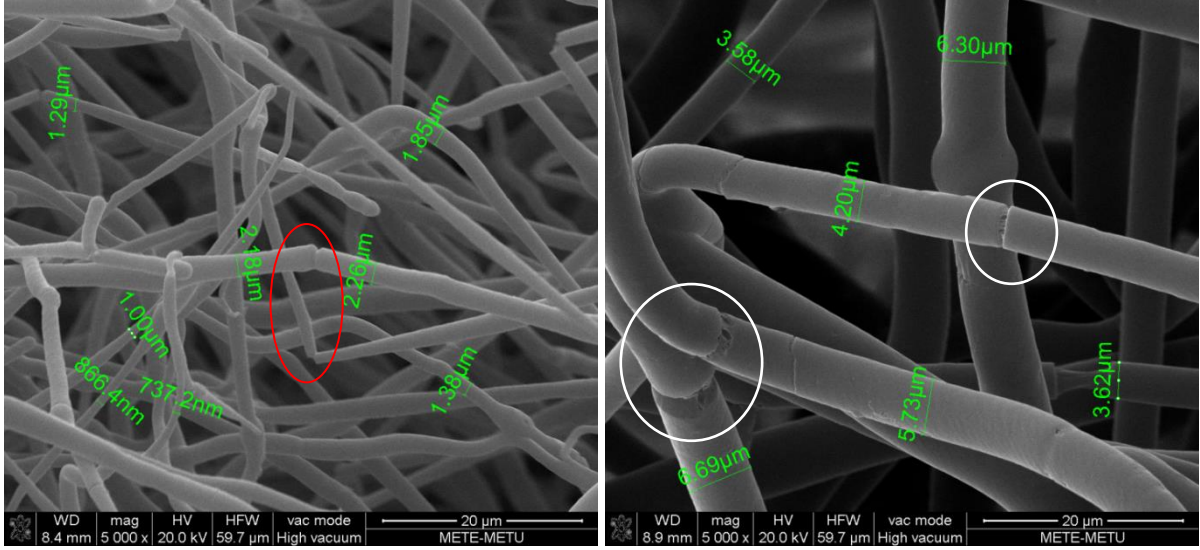
Bu nedenle çeşitli çözücüler denenmiştir. Kloroform/asetik asit ve kloroform/HFIP gibi ikili çözücüler ile denenilen elektroçizme sonucunda yine istenilen yapıda fiberler elde edilememiştir (Şekil 17). Fiberlerdeki boncuklanma ilkinde giderilemezken, ikincisinde ise üst üste dizilmiş, burgusal ve ayrı ayrı gruplar şeklinde duran fiber blokları gözlenmiştir. İkisinin de hücre taşıyıcısı olarak hedeflenen fibröz yapıya benzer olmadığı değerlendirilmiştir.



Şekil 17. Kloroform/asetik asit (1/1) çözücüsü kullanılarak kuru (sol) ve kloroform/HFIP (1/1) kullanılarak (sağ) elektroçizme yöntemleri ile üretilmiş PHBV yapıların SEM görüntüleri.

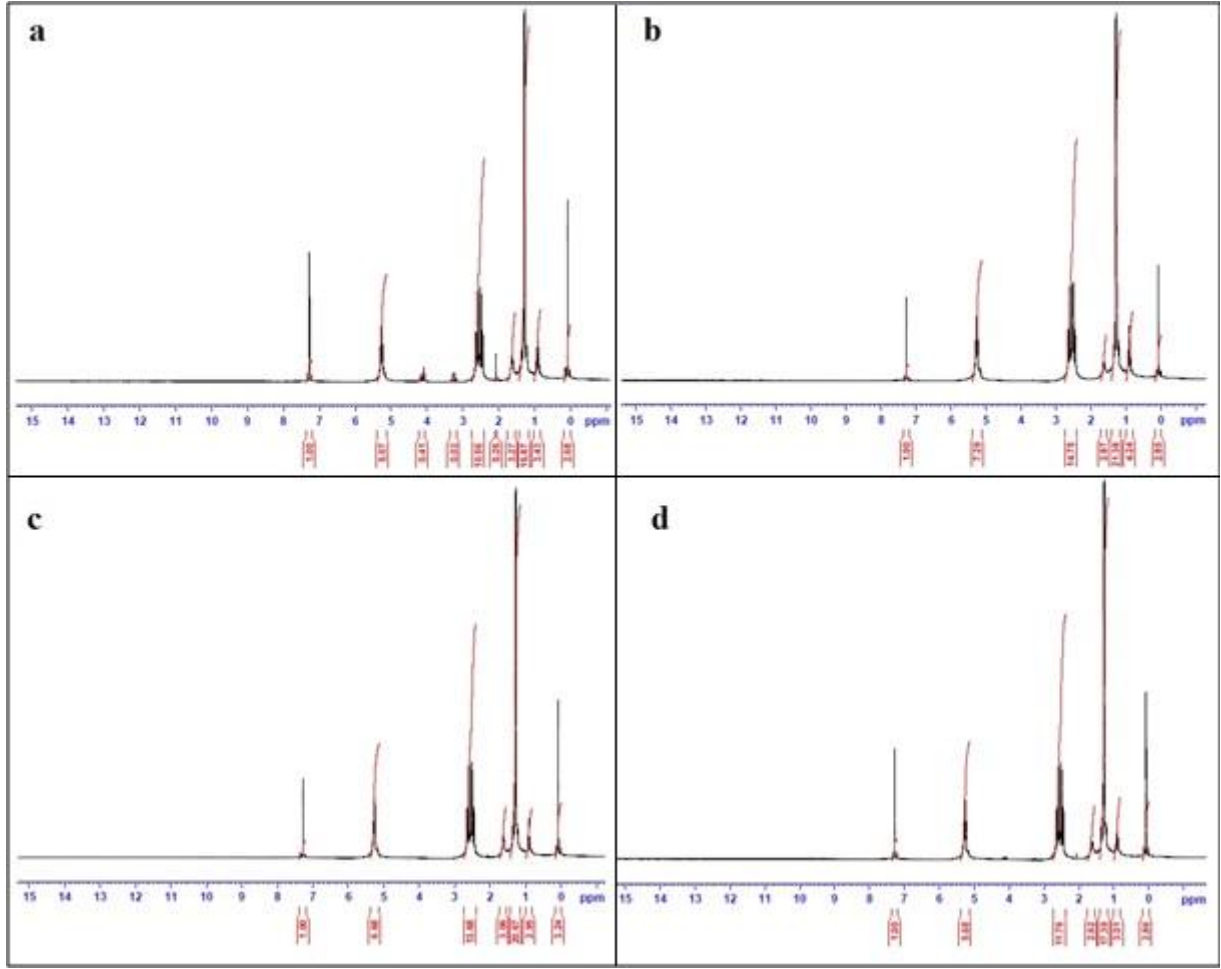
Kloroform ile elektroçizme, istenilen fiber yapısını vermediğinden, çözücü olarak HFIP ile denemeler yapılmıştır. HFIP ile çözülen PHBV ile elektroçizme optimizasyonu tamamlanmış

ve istenilen boncuksuz fiber yapılar elde edilebilmiştir. Ancak, bu yapılar SEM ile incelendiğinde yüzeyinde ve bazı yerlerde tüm yapı boyunca kırıklar tespit edilmiştir. Bu sorunun nedeni araştırılırken, farklı kaynaktan satın alınan, pul formda (yapraksı) ve toz halinde bulunan PHBV'lerin elektroğirme denemeleri yapılmıştır. Bu deneyler sırasında PHBV kaynakların ikisinde de elde edilen yapıların kırık fiberler içerdiği SEM ile görüntülenmiştir (Şekil 18). Ayrıca toz kaynak kullanılarak üretilen fiberlerin yapraksı haldeki PHBV kullanılarak üretilenlere kıyasla daha kalın çaplara sahip olduğu tespit edilmiştir.



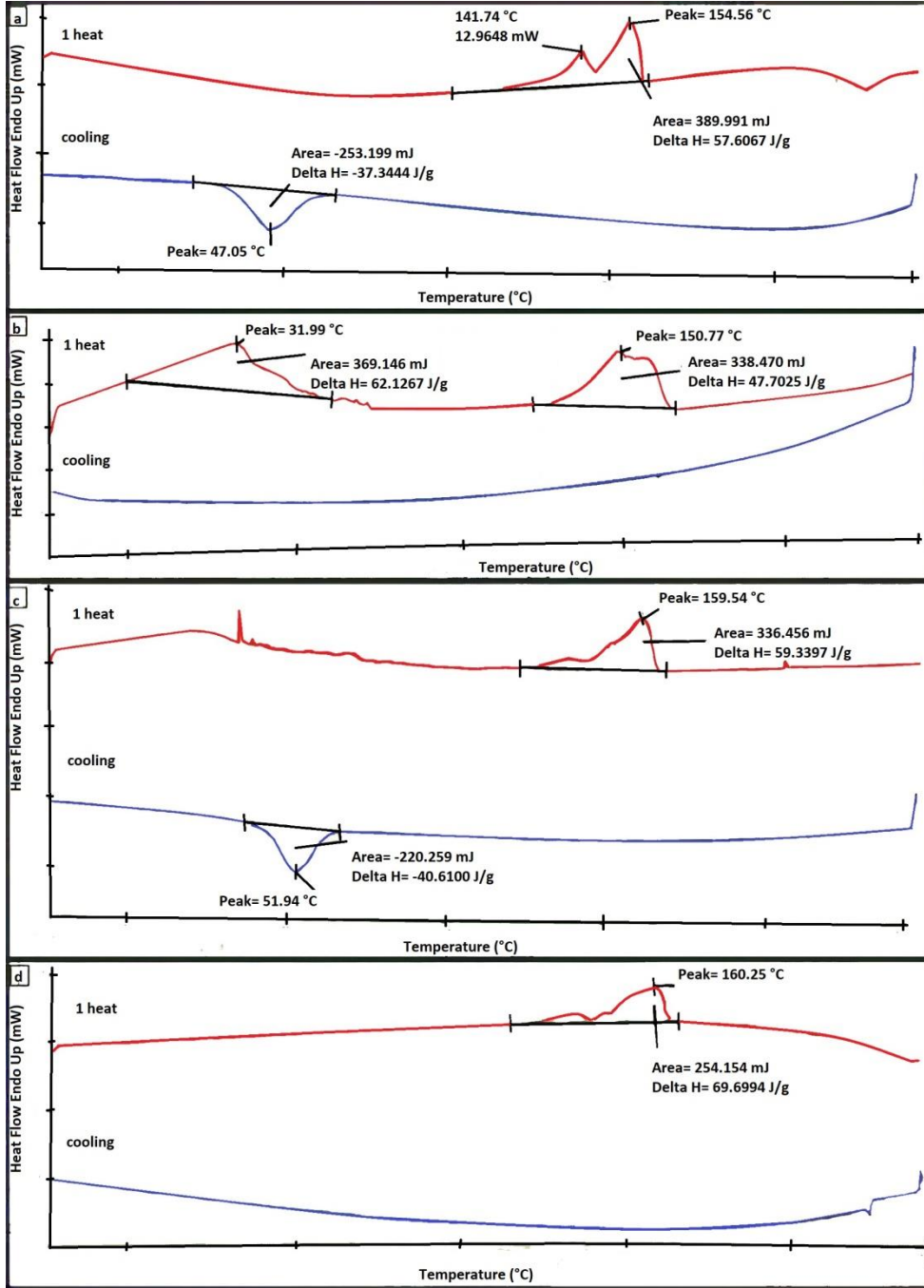
Şekil 18. Yapraksı halde (sol) ve toz halde (sağ) PHBV kaynakları kullanılarak üretilen elektroğirilmiş fiberlerin SEM görüntüleri.

Ticari alınan Pul-yapraksı formdaki PHBV ile elektroğirilen yapıda oluşan kırıklar nedeniyle, polimer kaynağının saf olmadığı şüphesi oluşmuştur. Bu nedenle bu ticari PHBV kaynağına farklı saflaştırma protokolleri uygulanmıştır. Aynı zamanda bakteriden PHBV üretme çalışmalarının bir aşaması olan saflaştırma çalışmaları da bu süreçte denenmiş ve elde edilen PHBV'nin kimyasal yapısı H-NMR ile incelenmiştir (Şekil 19). Yapraksı halde olan PHBV'nin analiz grafiğinde 3.2 ve 4.2 ppm değerlerinde iki tanımlanamayan okuma görülmektedir (Şekil 19, a). Saflaştırma işlemleri sonrasında bu tepe noktalarının kaybolduğu görülmüştür. Toz PHBV'nin H-NMR spektrumu, literatürde kabul edilen PHBV spektrumuyla örtüşmektedir. PHBV'nin karakteristik tepe noktaları, 0.8-1.8 ppm aralığı, 2-3 ppm aralığı ve 5.2 ppm değerlerinde görülmektedir (Liu vd., 2010). H-NMR analiz sonucunda toz PHBV kaynağının yeterince saf olduğu ve kırıklı fiber yapısının bu nedenden kaynaklanmadığı anlaşılmıştır.



Şekil 19. Farklı fiziksel yapıdaki ve farklı saflaştırma aşamalarının uygulandığı PHBV'lerin H-NMR görüntüsü; yapraksı halde PHBV(a), toz halde PHBV (b), kloroform ile kaynatılarak saflaştırma işlemi uygulanmış yapraksı haldeki PHBV (c) ve klorit ile yıkandıktan sonra kloroform ile kaynatılarak saflaştırma işlemi uygulanmış yapraksı haldeki PHBV (d).

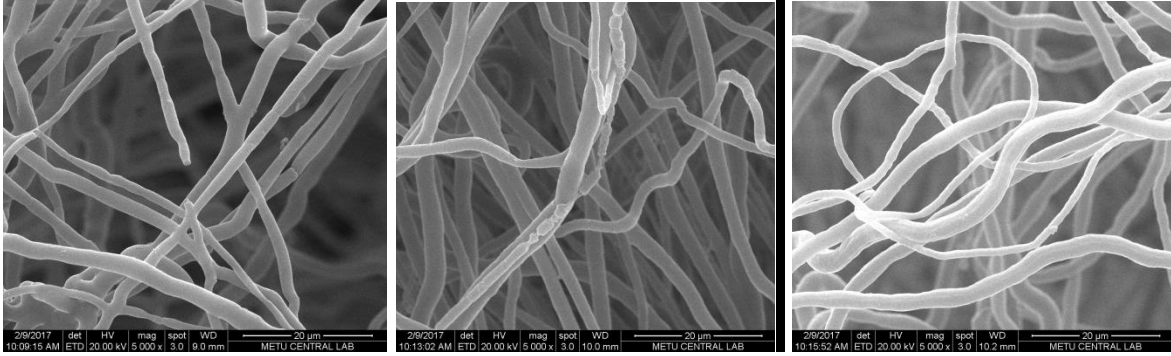
Yapraksı ve toz haldeki PHBV kaynaklarının DSC analiz sonuçları Şekil 20 (a ve b)'de gösterilmiştir. Ayrıca, yapraksı PHBV'ye iki farklı saflaştırma işlemi uygulanmış ve elde edilen ürünün DSC analizi yapılmıştır (Şekil 20, b ve c). Analiz sonucunda yapraksı PHBV'nin saflaştırılma işlemi uygulanmadan önce ve sonrasında erime noktasının literatürdeki sonuçlara uygun olarak 155-160°C sıcaklık olduğu görülmektedir (Wang vd., 2013). Ancak toz halindeki PHBV birinci erime noktasını 31.99 °C sıcaklıkta vermiştir bu da toz halindeki PHBV'nin erime noktası farklı iki yapıyı barındırdığı ve kristalinitesinin yapraksı haldeki PHBV'ye göre daha düşük olduğunu göstermiştir. H-NMR ve DSC analizi sonucunda projede yapraksı haldeki PHBV kaynağının kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 20. Yapraksı haldeki PHBV (a), toz haldeki PHBV (b), sadece kloroform ile kaynatılarak saflaştırılan yapraksı PHBV (c) ve klor ile yıkandıktan sonra kloroform ile kaynatılarak saflaştırılan PHBV'nin (d) DSC grafikleri.

Polimer fiberlerde oluşan kırıkların, polimerin kristal yapısının fazlalığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kırıklı yapının, mekanik özellikleri düşürmek gibi olası negatif etkilerini engellemek için PHBV fiberlerinin ikinci bir polimer eklenerek desteklenmesine karar verilmiştir. İlk deneme için fiber oluşumuna katkısı bilinen PVA polimeri seçilmiştir. PHBV ve PVA ile üç farklı konsantrasyon hazırlanmış (PHBV:PVA; 9:1, 8:2 ve 7:3 a/a) ve

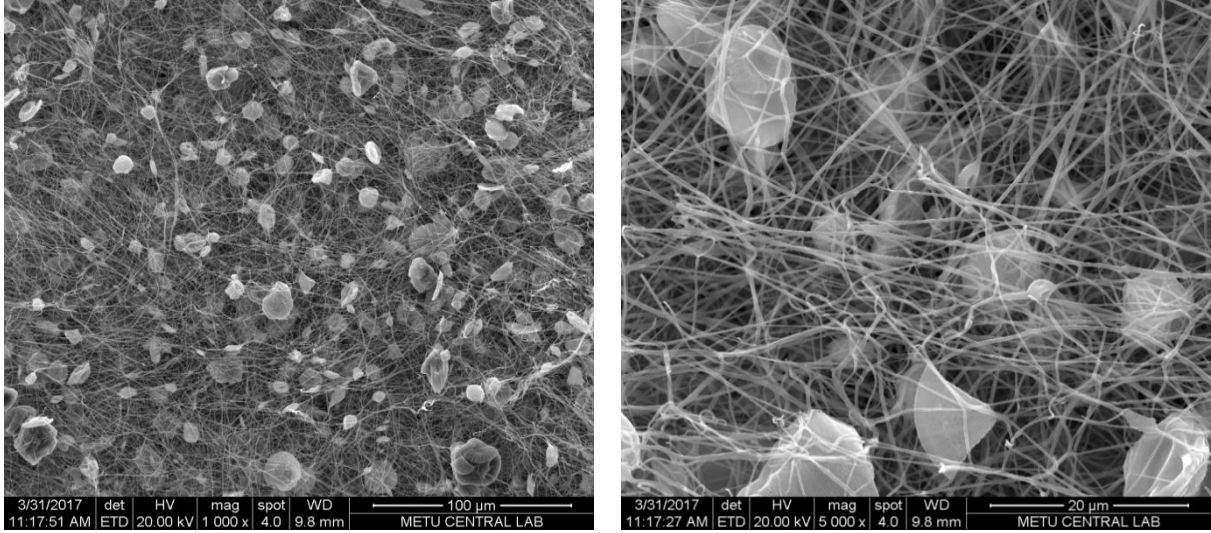
elektroeğirildikten sonra SEM ile incelenmiştir ancak PVA'nın kırıkları engellemekte başarılı olmadığı görülmüştür. İkinci olarak seçilen PCL polimeri kullanılarak yine PHBV ile birlikte üç farklı oranda (PHBV:PCL; 9:1, 8:2 ve 7:3 a/a) gruplar hazırlanmış ve elektroegirilmiştir. PHBV gibi hidrofobik bir polimer olan PCL, yüksek mekanik özellikleriyle PHBV fiberlerini destekleyebilecek özelliktedir (Del Gaudio vd., 2009). Ayrıca PCL kemik doku mühendisliği araştırmalarında tercih edilen, kemik hücreleriyle uyumluluğu kanıtlanmış bir polimerdir (Yoshimoto vd., 2003; Yu vd., 2009). PHBV:PCL taşıyıcıların SEM analizi yapıldığında, PHBV ve PCL 7:3 a/a oranında karıştırıldığında, fiberlerde kırık oluşumunun engellendiği görülmüştür (Şekil 21, sağ) ve bu oran taşıyıcıların üretimi için en uygun polimer kompozisyonu olarak belirlenmiştir.



Şekil 21. PHBV ve PCL ile farklı oranlarda hazırlanmış elektroegirilmiş taşıyıcı yapılarının SEM görüntüleri; PHBV:PCL oranı 9:1 (sol), 8:2 (orta) ve 7:3 (sağ).

4.4.3 Elektroegirme ile PHBV/PCL Fiber ve DS Yüklü PUL Fiber İçeren Üç Boyutlu Taşıyıcıların Oluşturulması

İlk önce ayrı olarak optimize edilen PUL ve PHBV fiber yapıları, birlikte eğirme yöntemi ile birleştirilmiş ve aynı toplama havuzunda iki fiberi içeren taşıyıcılar oluşturulmuştur. (Şekil 22).

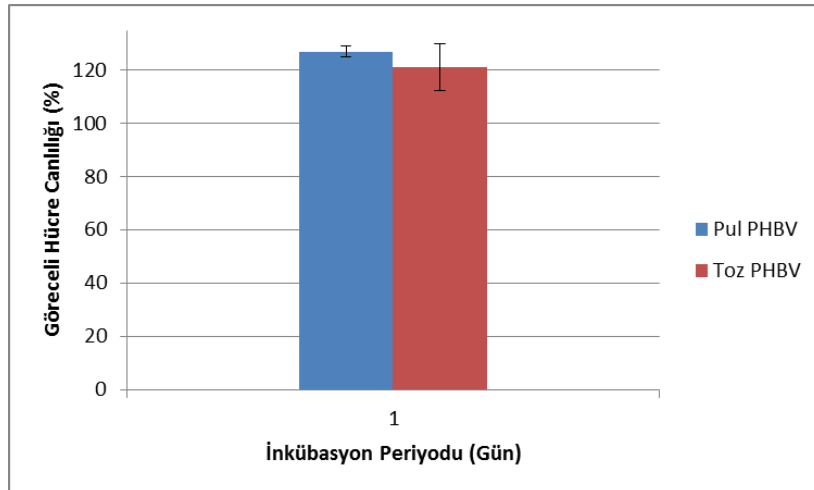


Şekil 22. Birlikte eğirme yöntemi kullanılarak elektroğrılmış PHBV/PCL:PUL/DS taşıyıcıların 1000X (sol) ve 5000X (sağ) büyütme ile SEM görüntüleri.

4.5. Hücre Canlılık Ön Denemelerinin Sonuçları

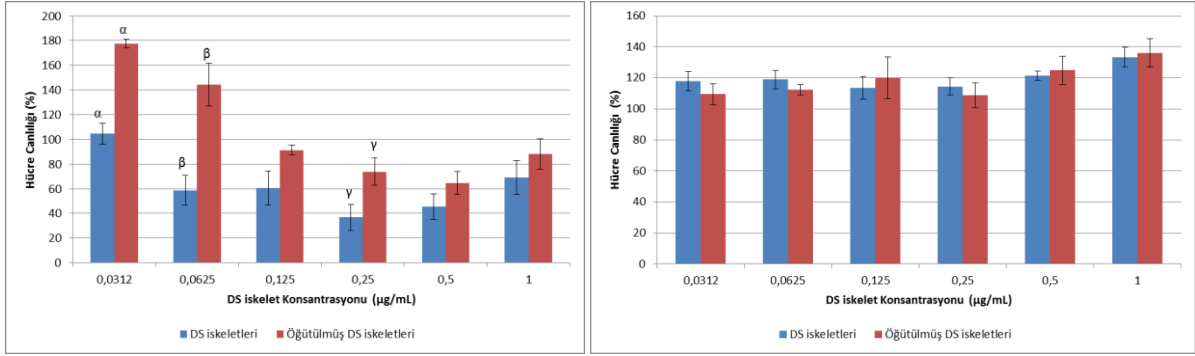
Hücre sitotoksitesite ön denemelerinde, insan öncül osteoblastik sarkoma hücreleri olan Saos-2 hücre hattı kullanılmıştır.

Toz ve yapraksı haldeki PHBV'lerin hücre canlılığı açısından bir farkı olup olmadığı alamar mavisi testi ile incelenmiştir. Toz ve yapraksı haldeki PHBV'den elektroğrılmış hücre taşıyıcıların alamar mavisi canlılık sonuçları, sadece hücre olan kontrol kuyucuklarına göre oranlanarak hesaplanmıştır (Şekil 23). İnceleme sonucunda iki grubun da yüksek canlılık gösterdiği ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.



Şekil 23. Yapraksı (Pulsu) ve toz yapıdaki PHBV'lerin alamar mavisi canlılık deney sonuçları. Hücre canlılık yüzdeleri sadece hücre olan (hücrü kültür kabında çoğaltılan) kontrol grubuna göre hesaplanmıştır.

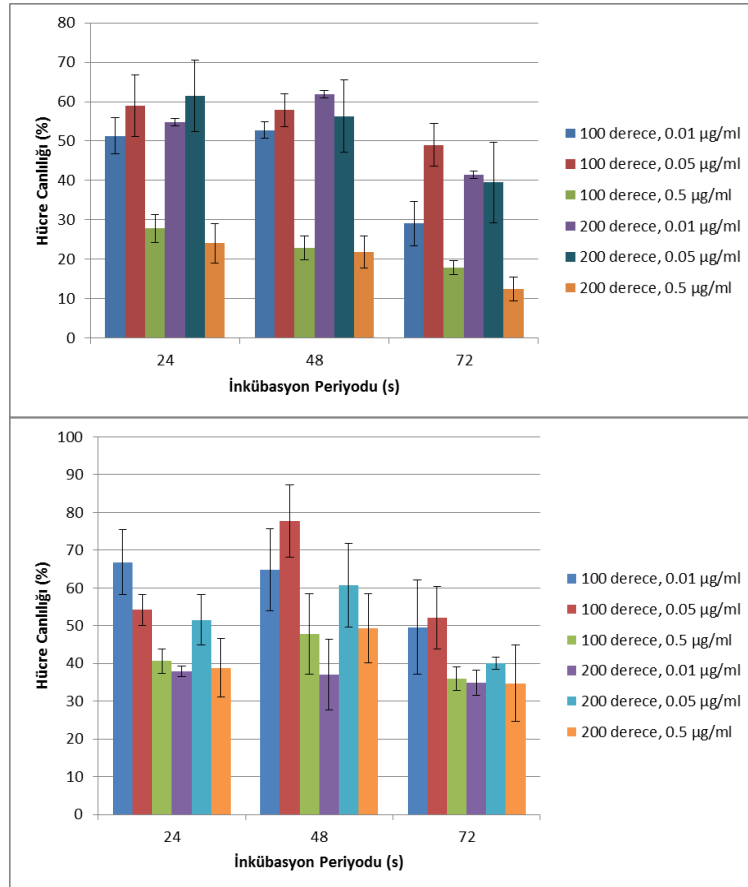
DS kabuklarının tek başına direk canlılık testi MTT deneyi ile incelenmiştir. Farklı miktarlarda DS kabukları ile hazırlanan örneklerle bir ve iki gün boyunca maruz bırakılan hücrelerin canlılık sonuçları Şekil 24'te gösterilmiştir. Birinci gün sonunda artan DS kabuk yapısı konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığının ciddi oranda düştüğü görülmüştür. Hücreler ile direk temasta olan DS kabuk yapısının yüksek konsantrasyonda iken yüksek oranda iyon salımı ve direkt kontakt stresleri nedeniyle birinci günde hücre canlılığını konsantrasyonla orantılı azalttığı düşünülmüştür. Ayrıca, ilk gün sonunda, öğütülmüş DS kabuk gruplarının, bütün haldeki DS kabuklarına kıyasla daha yüksek canlılık sağladığı görülmüştür. Bunun daha küçük DS kabuk yapılarının hücre üzerindeki stress etkisinin azalmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. İkinci günde yapışan hücrelerin çoğalması ile tüm gruplardaki hücre canlılığının, kontrol grubu ile aynı ve hatta daha fazla olduğu belirlenmiştir. İkinci günde artan hücre canlılığı ile beraber DS kabuk gruplarının sitotoksik etkisi ortadan kalkmıştır ve ayrıca artan DS kabuk konsantrasyonu ile beraber artan hücre canlılığı görülmüştür. Bu deney ile birlikte DS kabuklarının Saos-2 hücrelerinin canlılığı üzerinde olumsuz etkisi olmayabileceği değerlendirilmiştir. Yine de 1. Günde düşük ancak 2. Günde çok yüksek canlılık sonucu terizasyon ile ilgili endişeleri de düşündürmüştür.



Şekil 24. DS kabuklarının farklı konsantrasyonlarının, 1 gün (sol) ve 2 gün (sağ) inkübasyon sonunda, hücre canlılığı üzerindeki etkisinin MTT ile incelenmesi sonucunda sadece hücre içeren kontrol grubuna (Hücre kültür kabında çoğaltılmış) göre hesaplanmış canlılık yüzdeleri. İstatistiksel olarak farklı gruplar α, β, γ olarak belirtilmiştir (p<0.05, n=5)

Birinci deneydeki sonuçlar arasındaki belirsizlik nedeniyle, ikinci bir yaklaşım olarak, DS kabuklarının sterilizasyonunun ısı ile yapılmasına karar verilmiştir. Sterilizasyon için iki farklı ısı değeri seçilmiştir; 100°C ve 200°C. Bir önceki MTT deney sonuçlarına göre seçilen 3 farklı DS kabuk konsantrasyonu ve iki farklı ısı değeri ile MTT deneyi tekrarlanmıştır (Şekil 25). Parçalanmamış haldeki DS kabuk gruplarıyla yapılan deneyde (Şekil 25, üst) konsantrasyon 0.5 mg/ml'e çıkarıldığında hücre canlılığının belirgin bir şekilde düştüğü görülmüştür. Bunun nedeninin DS kabuklarından çözölen çok miktarda iyonun yarattığı toksisite ve direkt canlılık

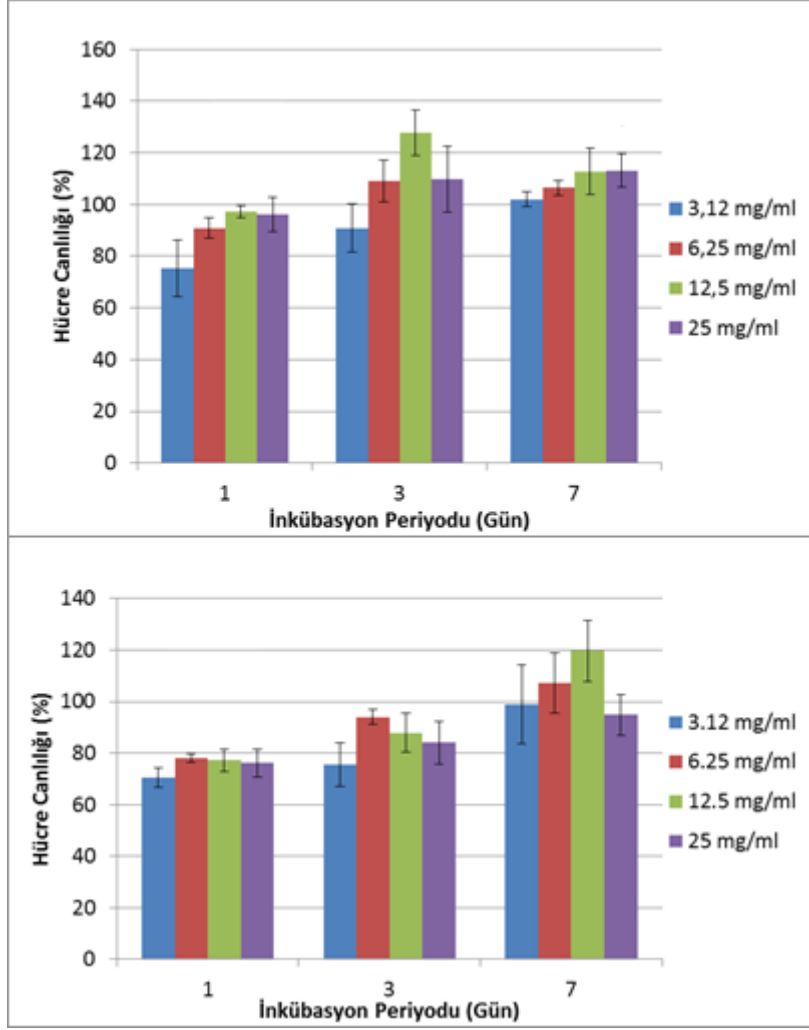
testinde hücrelerin direkt yüksek miktarda toz yapıyla etkileşip kuyucuk yüzeyine yapışamamasının olduğu düşünülmektedir. Diğer iki konsantrasyonun da, 0.01 ve 0.05 mg/ml hücre canlılığına etkilerinin benzer olduğu gözlenmiştir. Parçalanmış (öğütülmüş) DS kabuklarıyla yapılan deneyde ise hücre canlılıklarının çoğu konsantrasyonda öğütülmemiş DS ile kıyasla daha iyi olmakla birlikte hücre canlılığında önemli azalma yaptığı görülmüştür. Hücrelerin daha küçük yapılar arasında daha çok tutunma alanı bulunduğu ve bu yapılarla daha sağlıklı etkileşimler sağladığı bilinmektedir. Sterilizasyon sıcaklığı etkileri karşılaştırıldığında hücre canlılığı olarak istatistiksel bir fark görülmemiştir. Öğütülmüş ve parçalanmamış haldeki DS kabuk gruplarının hücre canlılıklarının kontrol ile karşılaştırıldığında düşük olduğu iki grafikte de görülmektedir. Bu sonucun literatürdeki benzer çalışmalarda direkt etkileşimli deneylerde de bulunduğu farkedilmiştir (Le vd., 2016; Zhang vd., 2018). Hücrelerin ilk andan itibaren yoğun miktarda toz halinde DS kabuk ile besiyeri içinde etkileşmiş olmasının hücre canlılığında in vivo koşullardakine benzemeyecek yoğun bir maruz kalma oluşturduğu ve hücrelerin fiziksel kısıtlamalarla canlılıklarını etkilediği düşünülmüştür.



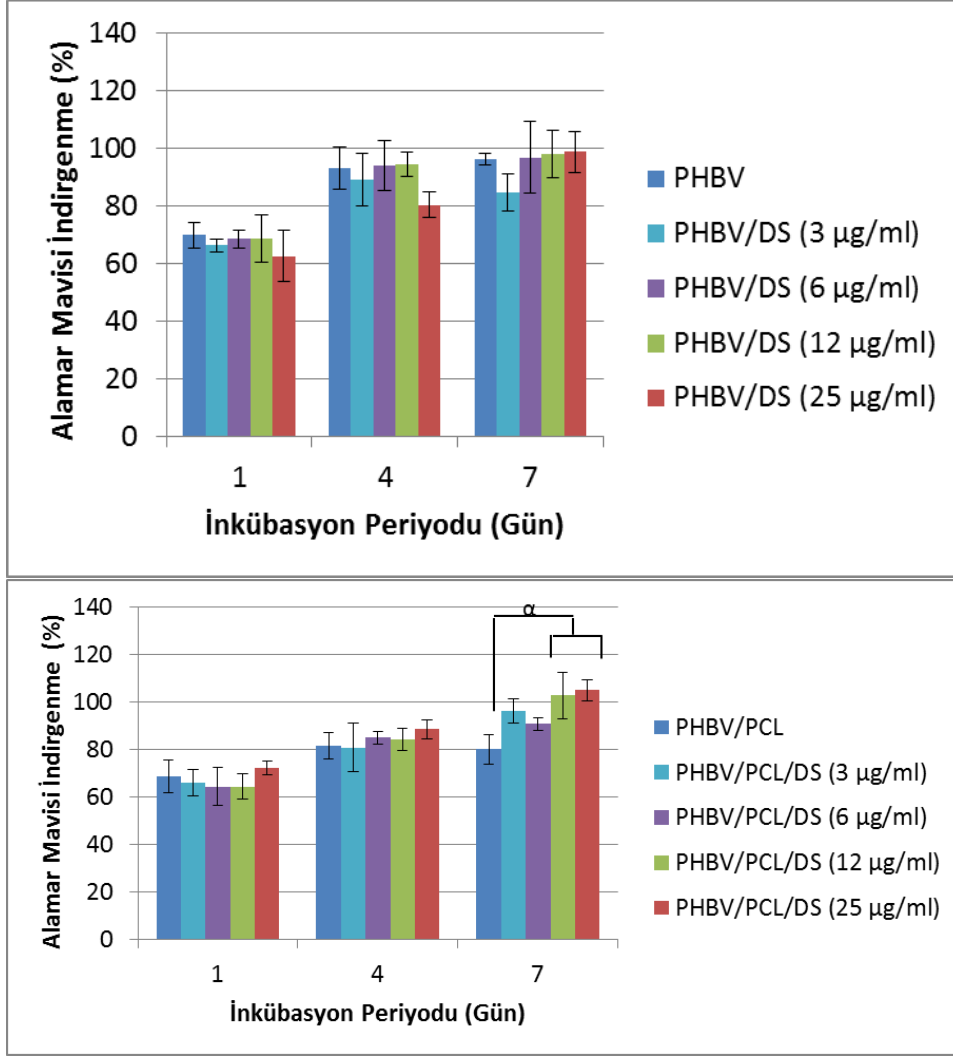
Şekil 25. Bütün haldeki DS kabuklarının (üst) ve öğütülmüş DS kabuklarının (alt) MTT ile belirlenmiş hücre canlılığı grafikleri. Canlılık yüzdeleri sadece hücre içeren (Hücre kültür kabında çoğaltılmış) kontrol grubuna oranla hesaplanmıştır.

Direkt hücre etkileşiminden kaynaklanan etmenlerin, hücre canlılığını düşüren fiziksel negatif etmenler olduğu düşüncesiyle, bu tip çalışmalarda kullanılan ikincil yöntem olan ekstrak testi ile hücre canlılık çalışması yapılmıştır. Denenen iki farklı sterilizasyon ısısı anlamlı bir fark yaratmadığı için bu deneylerde DS kabuk grupları 200°C'de steril edilmiştir. Ekstrak toksisite olarak da bilinen bu yöntemde DS kabuklarının bekletildiği hücre vasatı kullanarak büyütülen Saos-2 hücrelerinin canlılık grafikleri Şekil 26'da görülmektedir. Parçalanmamış haldeki DS kabuk grupları ilk günden itibaren kontrol ile benzer çoğalma oranları göstermiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte 3. gün sonunda 12.5 mg/ml konsantrasyon grubunda, diğer gruplara göre biraz daha yüksek hücre canlılığı gözlenmiştir. Yedinci gün sonunda tüm gruplar kontrole yakın hücre canlılığı göstermiş ve bütün haldeki DS kabuklarının hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi görülmemiştir. Öğütülmüş haldeki DS kabuklarına maruz bırakılmış besiyeri ile inkübe edilen gruplar 1. gün düşük hücre canlılığı gösterse de, hücre canlılığı zamana bağlı olarak artmış ve 7. gün sonunda 12 mg/ml konsantrasyon grubu yaklaşık %120 oranında hücre canlılığına ulaşmıştır. İlerleyen deneylerde, bütün haldeki DS kabuk grubunun da yüksek hücre canlılığı gösterdiği bu konsantrasyonun seçilmesine karar verilmiştir. Bu deney sonucunda DS kabuklarının uygun sterilizasyon sonrasında ve doğrudan yüksek oranda hücrelerle etkileşmediği sürece hücre canlılığını desteklediği sonucuna varılmıştır. Bu araştırmalar projenin temel hedefi olan kemik doku hücre taşıyıcısı oluşturulmasında DS kabuklarının konsantrasyon olarak yoğunluğunun ve fiber yapıya sağlam bir şekilde (kontrollü olarak ortama çıkışını sağlayacak bir yapıya) yüklenmesinin ileride in vivo aşamaya geçilmesi durumunda sonuçların başarısı açısından önemini göstermiştir.

Hücre taşıyıcılarda kullanılacak polimerlerin ve bu polimerler ile birlikte DS kabuklarının hücre etkileşimini araştırmak için direkt film sitotoksikite deneyleri de yapılmıştır (Şekil 27). Farklı konsantrasyonlarda bütün haldeki ve öğütülmüş DS kabukları ile PHBV ve PHBV/PCL polimer bileşenleriyle hazırlanmış grupların hücre canlılığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Farklı DS konsantrasyonu içeren PHBV polimer filmlerinde (3, 6, 12 ve 25 µg/ml) 7 günlük hücre etkileşimi sonunda hiçbir sitotoksik etki gözlenmemiştir. Grupların 1. gündeki düşük hücre canlılığı, polimer filmlerin üzerine hücre tutunmasının daha zor olmasıyla açıklanabilmektedir. Grupların hücre canlılığı 4. günde sadece hücre bulunan kontrol grubuna yetişmiş ve 7. gün sonunda da benzer bir sonuç vermiştir. PHBV ve PCL karışımı ile hazırlanan polimer film gruplarında hücre canlılığının 7 gün süresince daha yavaş bir hızda arttığı ve 7. gün sonunda PHBV/PCL kontrol grubunun DS kabuk yapısı içeren gruplara kıyasla düşük hücre canlılığı gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 27, alt). DS kabuklarının hücre çoğalmasına destekleyici etkisi bu deney sonucunda daha netleşmiştir.

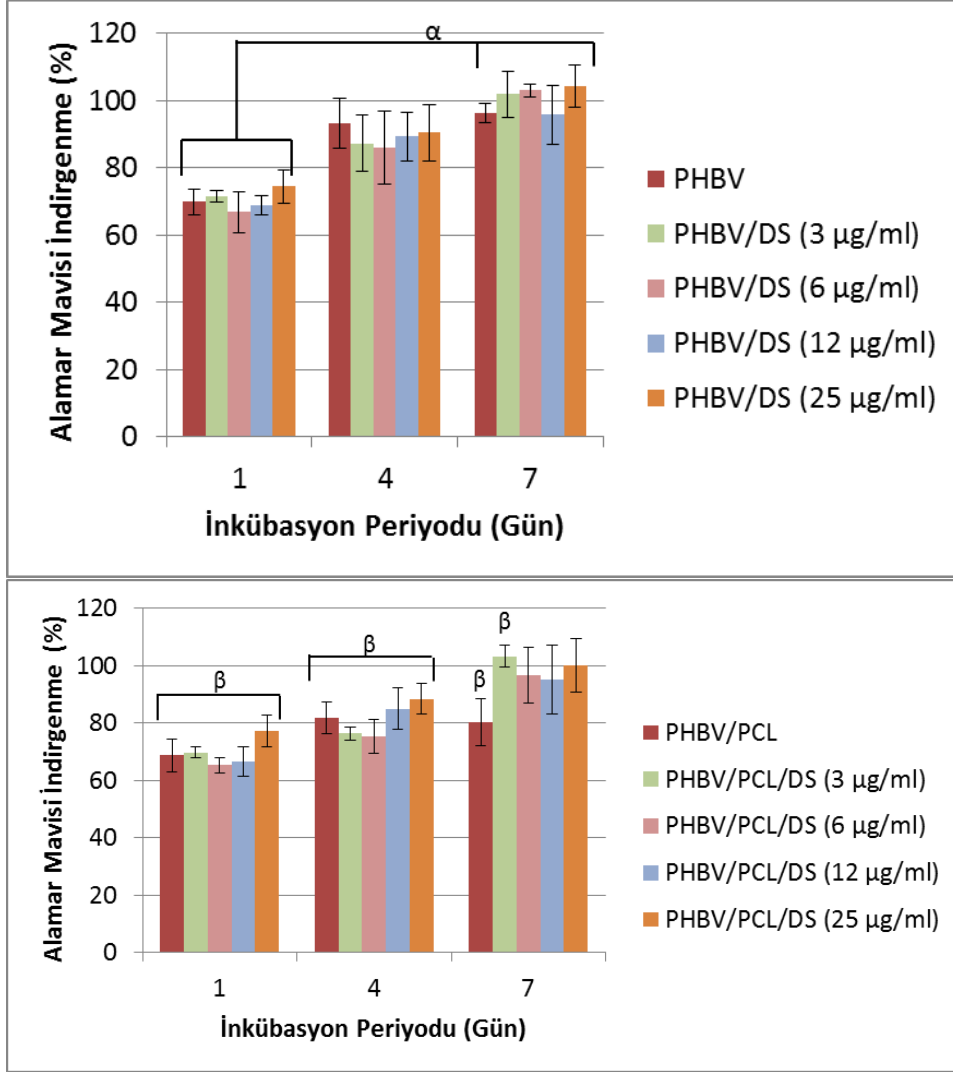


Şekil 26. Bütün haldeki DS kabuklarının (üst) ve öğütülmüş DS kabuklarının (alt) ekstraktları ile büyütülen hücrelerin, MTT ile belirlenmiş canlılık grafikleri. Canlılık yüzdeleri, sadece hücre olan (Hücre kültür kabında çoğaltılmış) kontrol grubuna oranla hesaplanmıştır.



Şekil 27. Farklı oranlarda bütün haldeki DS kabuk yapısı katkılı, PHBV (üst) ve PHBV/PCL (alt) filmlerin alamar mavisi indirgenme oranlarıyla hücre canlılık testi grafikleri. α : PHBV/PCL/DS (12 µg/ml) ve PHBV/PCL/DS (25 µg/ml) gruplarının kontrol grubu (DS içermeyen) ile arasındaki istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir ($p < 0.05$).

Film sitotoksosite deneyi aynı protokol ile öğütülmüş DS kabukları kullanılarak tekrarlanmıştır (Şekil 28). Öğütülmüş DS kabuk gruplarındaki hücre canlılığı, bütün haldeki DS kabuk grupları ile örtüşmektedir ve öğütme işleminin film sitotoksosite yaklaşımıyla hücre canlılığı ölçümlerinde bir fark yaratmadığı görülmüştür. DS kabuklarının hücre uyumluluğu testlerinde her ne kadar öğütülmüş DS kabukları bazı gruplarda pozitif etki göstermiş olsa da, üretilen DS kabuk yüklü hücre taşıyıcıların fiziksel yapısı film sitotoksosite deneyindeki gruplara daha çok benzemektedir ve nihai olarak film sitotoksosite deney sonuçlarına daha yakın sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak DS kabuklarının PHBV/PCL polimer karışımı ile üretilen hücre taşıyıcılarda hücre canlılığını arttırabileceği değerlendirilmiştir.



Şekil 28. Farklı oranlarda öğütülmüş DS kabuk yapısı içeren, PHBV (üst) ve PHBV/PCL (alt) filmlerin alamar mavisi indirgenme oranlarıyla hücre canlılık testi grafikleri. α : 7. gün ve 1. gün grupları arası anlamlı istatistiksel farkı, β : 4 gün inkübasyona bırakılmış PHBV/PCL/DS (3 µg/ml) grubunun diğer gruplardan istatistiksel anlamlı farkını belirtmektedir ($p < 0.05$).

4.6. Bakteriden PHBV Üretimi Ön Denemeleri ve Optimizasyonu

Bakteri ile PHBV üretim deneyleri, İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Bölümü'nde, Prof. Dr. Ayten Karataş Yazgan'ın Laboratuvarı'nda optimize edilmiştir. Polimer ürettiği düşünülen kurutulmuş bakteri örnekleri ODTÜ Mühendislik Bilimleri Laboratuvarları'na gönderilmiş ve saflaştırma ve karakterizasyon işlemleri burada yapılmıştır.

PHBV polimer üretimi için, proje önerisinde belirttiğimiz *Bacillus megaterium* NCIM 2475 suşunu tüm uğraşlarımıza rağmen ticari olarak temin etmek mümkün olmamıştır. Bunun üzerine, ticari olarak kolaylıkla temin edebileceğimiz, ATCC ve/veya DZM stok merkezlerinde bulunan, PHBV üretebilen bakteri suşları araştırılmıştır. ATCC stoklarında

bulunan yüksek oranda PHBV ürettiği rapor edilen (Lu vd., 2008) *Haloflex mediterranei* (ATCC 33500) suşu temin edilmiştir. Metotta da anlatıldığı gibi farklı besiyerleri kullanılmasına rağmen bu bakteride büyüme gözlenmemiştir.

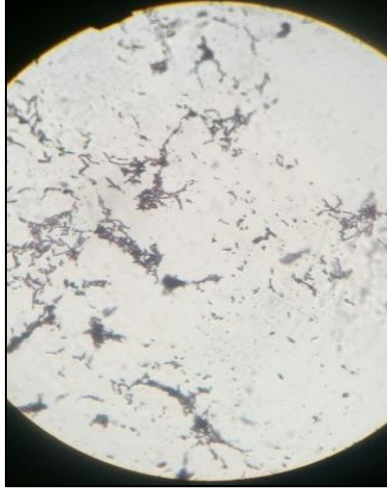
Bunun üzerine tekrar PHBV üretici suş değiştirilme gerekliliği doğmuş, kültüre edilmesi kolay PHBV ürettiği bilinen *Cupriavidus necator* (DSMZ 428) suşunun kullanılmasına karar verilerek DZM stok merkezinden sipariş edilmiştir (Berezina, 2012; Špoljarić vd., 2013).

Cupriavidus necator (DSMZ 428) suşu elimize ulaşana kadar, koleksiyonumuzda bulunan *Bacillus polymyxa* DSM36 suşunun PHB/PHBV üretme potansiyeli araştırılmıştır. Canlı bakteri hücresi içerisindeki PHB depo granüllerinin tespit edilmesi için yaygın olarak kullanılan metotlardan biri de, Nil Blue A, Sudan Black B ve Sudan III gibi lipofilik boyalarla boyamadır. Şekil 29'da görüldüğü gibi, Sudan Black B ile boyanan bakterilerin PHB granüllerinin varlığına işaret eden koyu mavi-siyah rengi koruduğu görülmüştür.



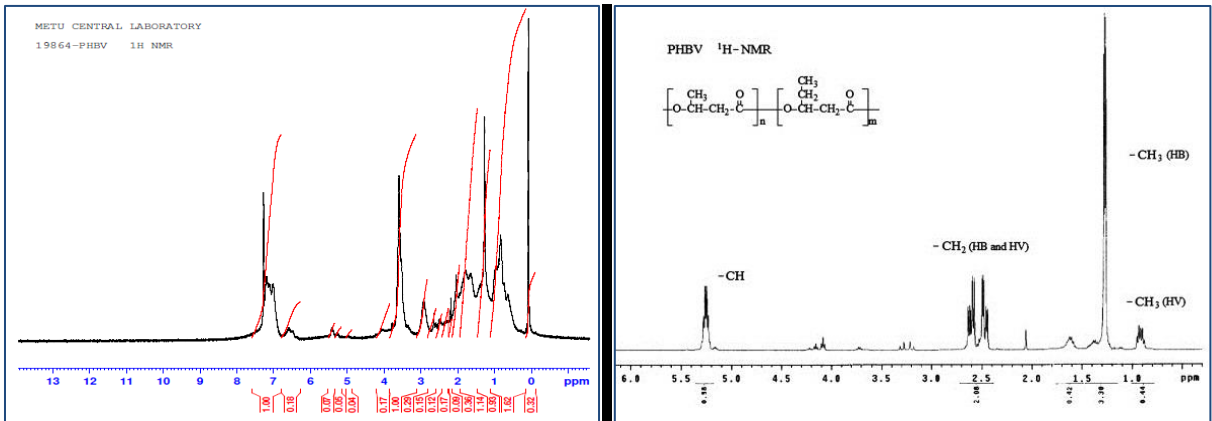
Şekil 29. Nütrient agar plak yüzeyinde büyütülmüş, Sudan Black B boyası ile boyanmış DSM 36.

Bacillus polymyxa DSM36 suşundan toplanan hücreler % 0.003'lük Sudan Black B boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir. Şekil 30'da görüldüğü gibi, hücreler, PHB polimer varlığına işaret eden siyah-mavi rengi korumuştur. Bu aşamayı takiben, hücre içi depolanan polimerik yapının detaylı analizinin yapılması hedeflenmiştir.



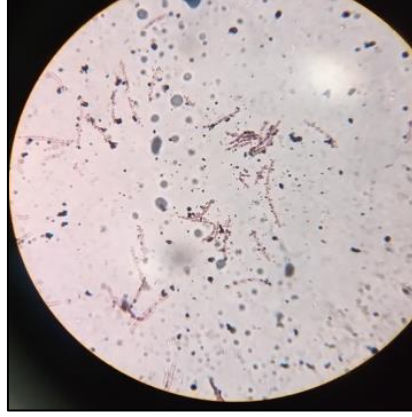
Şekil 30. Polimer üreten DSM 36 beyaz hücreleri (40X büyütme).

Bacillus polymyxa DSM36 suşu ile yapılan denemelerden elde edilen, PHBV vesikülleri içerdiği düşünülen kurutulmuş bakteri örnekleri saflaştırıldıktan sonra üretilen polimerin PHBV olduğunu doğrulamak için H-NMR analizi yapılmıştır (Şekil 31). Saf PHBV polimerinin karakteristik tepe noktaları literatürde 0.8-1.8 ppm aralığı, 2-3 ppm aralığı ve 5.2 ppm değerlerinde gösterilmektedir (Tao vd., 2009). Bakteri tarafından üretilen polimerin analizinde bu tepe noktalarına uygun olarak tepe noktaları elde edilmiştir. Ancak yoğunlukları literatür sonucuyla örtüşmemektedir ve bu tepe noktalarında emilim veren sinyallerin dışında farklı frekanslarda da emilimler görülmektedir. Ayrıca 3-4 ppm aralığında oluşan tanımlanamayan tepe noktasının, çift bağ yapması gereken oksijenin, iki adet ayrı tek bağ yapmasından kaynaklandığı ve polimer ana zincirinde dallanmaya neden olduğu düşünülmektedir. Bunlardan bağımsız olarak saflaştırma işlemindeki olası eksiklikler yüzünden polimerin tam olarak saf elde edilememesi ihtimali üzerinde de durulmuştur.



Şekil 31. Bakteri kültüründe üretilen polimerin saflaştırıldıktan sonra yapılmış H-NMR analiz sonucu (sol), literatürden alınmış PHBV H-NMR analiz sonucu (sağ) (Tao vd., 2009).

Son olarak, *Cupriavidus necator* (DSMZ 428) bakteri hücreleri içerisindeki polimer varlığını teyit etmek için, Sudan Black B boyaması yapılmıştır. Şekil 32’de görüldüğü gibi *Cupriavidus necator* (DSMZ 428) suşunun kültürasyonunda PHB granüllerine işaret eden koyu siyah granüller ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir.



Şekil 32. Polimer üreten *Cupriavidus necator* hücreleri (100x büyütme).

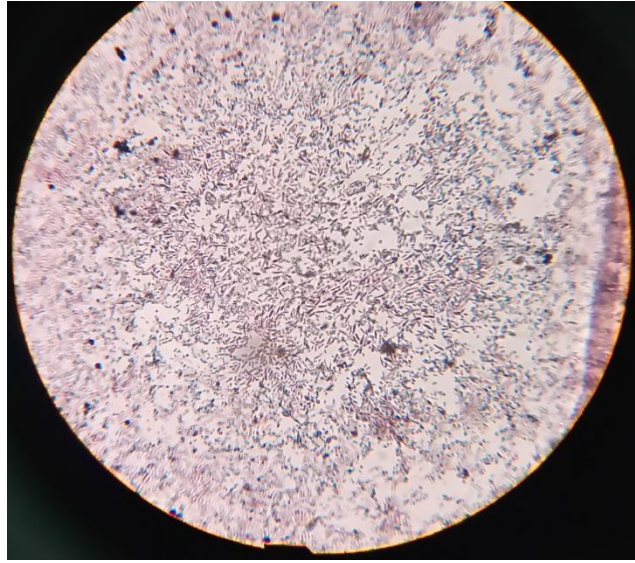
4.7 PHBV Polimerinin *Cupriavidus necator* Bakteri Suşunda Üretimi ve Karakterizasyonu ile İlgili Sonuçlar

4.7.1 PHBV Polimerinin *Cupriavidus necator* Bakteri Suşunda Üretimi ve Saflaştırılması Sonuçları

Bakteriden PHBV kopolimeri üretimi bu proje kapsamında başarıyla gerçekleştirilmiştir. *Cupriavidus necator* bakterisi ile bu yürütülen denemeler süresince bakteri besiyerinde değişiklikler yapılarak üretilen polimerin PHBV olmasına çalışılmıştır ve yapılan son (3.) denemede PHBV'nin üretiminin başarıyla sağlandığı görülmüştür.

İlk deneme olarak, *Cupriavidus necator* (DSMZ 428) suşuyla Wang vd. (2013) tarafından rapor edildiği gibi PHBV polimer üretim potansiyeli analiz edilmiştir. Sıvı besiyerinde da büyüyen hücrelerden %5 inokül olacak şekilde alınarak polimer üretim besiyeri olan ve sipariş edilen Fe(III)NH₄-sitrat gelene kadar onun yerine Fe-sitrat (1,11 mg/L) kullanılarak hazırlanan MSM'de, 200 dakikada devir sayısında, 30°C de 70 saat inkübe edilmiştir. Bu deneme sonucunda üretilen polimerin PHBV olmadığı H-NMR sonuçları ile açıklanmaktadır (Şekil 35).

İkinci deneme olarak, sipariş edilen Fe(III)NH₄ sitrat'ın gelmesi üzerine, *C.necator* suşu MSM polimer üretim besiyerinde aynı protokol uygulanarak inkübe edilmiş, daha sonra ortamdan örnek alınarak hücreler 13 000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüş ve canlı bakteri hücresi içerisindeki PHB depo granüllerinin tespit edilmesi için kullanılan %0.003lük Sudan Black b lipofilik boyası ile boyanmıştır. Şekil 33'te sunulduğu gibi PHBV granüllerine işaret eden koyu siyah granüller ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir. Daha sonra 2 L besiyeriden büyütülen, kuru kütle ağırlığı 2.94 g olan hücreler polimer saflaştırması ve gerekli analizlerin yapılması için ODTÜ'ye gönderilmiştir. Bu deneme sonucunda üretilen polimerin PHBV olmadığı kanıtına varılmıştır; sonuçlar H-NMR sonuçları ile açıklanmaktadır (Şekil 35).



Şekil 33. Polimer üreten *C. necator* hücreleri 400x büyütme.

Üçüncü deneme olarak, literatür araştırması genişletilerek *C. necator* için kullanılan diğer bir PHBV üretim besiyeri olan Berezina (2012) çalışmasının kullandığı mineral ortamı denenmiştir. Polimer depo granüllerini görme amacıyla inkübe edilen hücrelerden örnek alınarak %0.003 lük Sudan Black b ile boyanmış ve Şekil 34'te görüldüğü üzere bakteriler PHB granüllerinin varlığına işaret eden koyu mavi-siyah rengi korumuştur.



Şekil 34. Polimer üreten *C.necator* hücreleri 1000x büyütme.

C. necator suşunda tespit edilen polimerik yapının belirlenmesi için, kuru kütle ağırlığı 1.01 g olan hücre kütlesi ODTÜ'ye incelenmek üzere gönderilmiştir. Bu denemenin sonucunda PHBV kopolimeri başarıyla üretildiği bulunmuştur. İlgili karşılaştırmalar H-NMR sonuçları ile (Şekil 36) açıklanmaktadır.

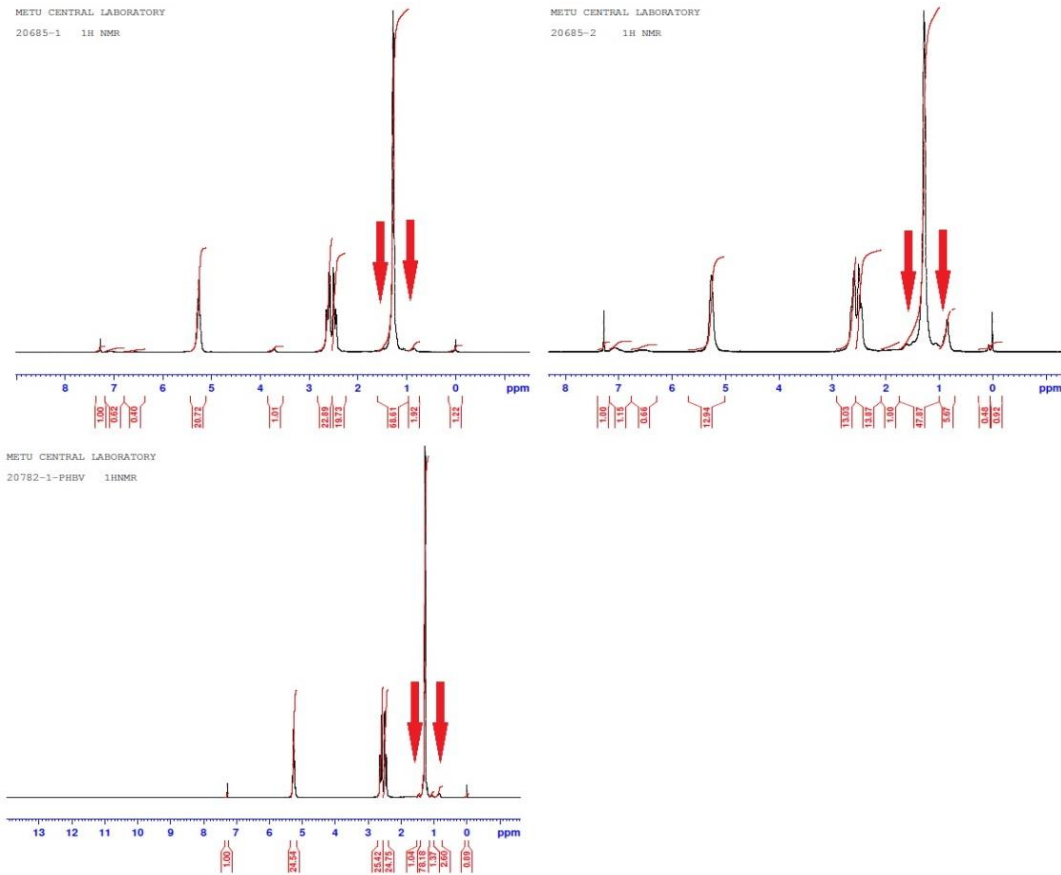
Yapılan analizlerde sodyum propiyonat kullanılarak hazırlanan besiyeri sonuçlarına göre PHBV üretimi yapıldığı tespit edilmiş fakat valerat oranı beklenenden yüksek çıkmıştır. Bunun üzerine Berezina (2012) çalışmasının kullandığı mineral ortamı kullanılmaya devam edilerek valerat oranını düşürme amaçlı çalışmalar başlamıştır. Nutrient agar plağına çizilen *C.necator* hücreleri alınarak bu sefer öncelikle 10 ml sıvı besiyeri ortamına ekilmiş ve 16 saat, 30°C'de, 150 dakikada devir sayısında çalkalanarak büyütülmüştür. Daha sonra bu ortamdan %5 inokül alınarak 10 g/ Lglukoz ve glutamat içeren 200 ml mineral besiyerine ekim yapılmış ve 16 saat, 30°C de hücreler büyütülmüştür. Bu sefer 3. aktarım olarak zengin mineral ortamda büyüyen hücrelerden %5 inokül alınarak 1 g/L sodyum propiyonat içeren 4000 ml mineral ortama aktarılmış ve 30°C de 48 saat büyümeye bırakılmıştır. Valerat oranını düşürme çalışmaları sonucunda üretilen örnekler ODTÜ'ye incelenmesi için gönderilmiştir.

Bu yaklaşım sonucunda valerat oranı, ticari olarak satın alınan PHBV'ye yakın değere düşürülmüştür. Böylece optimize edilen yöntem ile üretilen bakteriyel PHBV ile iki fiberli üç

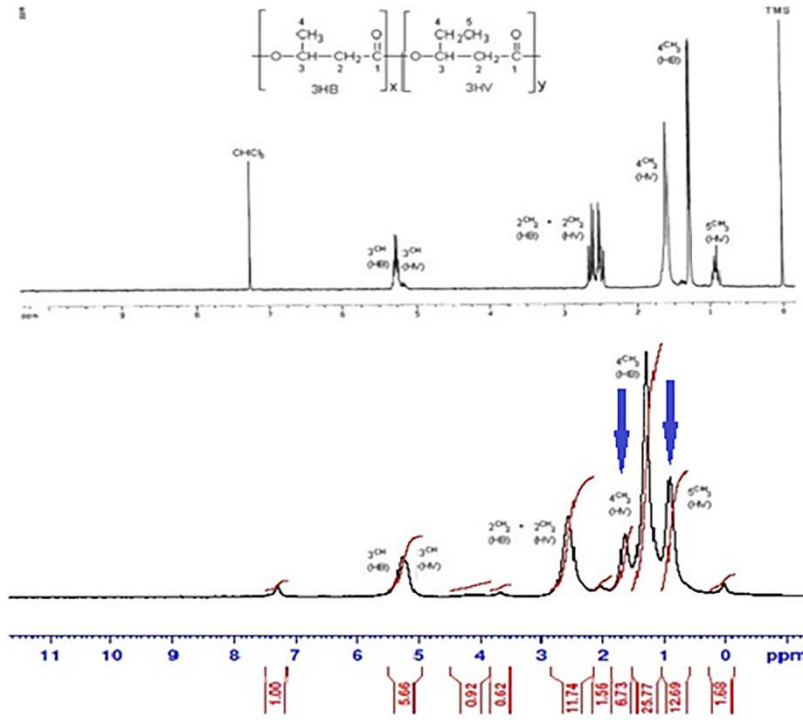
boyutlu B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS hücre taşıyıcısı hazırlanmasına, özelliklerinin ticari form ile üretilen taşıyıcı ile karşılaştırılmasına karar verilmiştir.

4.7.2. Hidrojen Sıvı Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (H-NMR) Sonuçları

Yapılan ilk denemenin H-NMR sonuçları Şekil 35'te gösterilmiştir. Bu denemelerde üretilen polimerin PHBV yerine PHB olduğu görülmektedir. Şekil 35'te kırmızı okla belirtilen yerlerde olması gereken PHV (valerat) karakteristik tepe noktaları görülememekte ancak bütün karakteristik PHB (bütrat) tepe noktaları bulunmaktadır. Bu sonuç bu denemelerde üretilen polimerin kopolimer değil, saf PHB olduğunu göstermektedir. PHB üretiminin başarıya ulaşması, hedeflenen PHBV kopolimerinin üretimine yaklaşıldığını belirtmektedir. Daha sonra 2. Yöntemle üretilen PHBV polimerinin H-NMR grafiği Şekil 36'da gösterilmiştir. H-NMR grafiğinde bulunan tepe noktaları literatürde gösterilen PHBV H-NMR grafiği ile birebir örtüşmektedir (Bhattacharyya vd., 2012). Proje kapsamında *Cupriavidus necator* bakterisi suşu kullanılarak başarıyla PHBV kopolimeri üretilmiştir.



Şekil 35. *Cupriavidus necator* bakterisi suşu kullanılarak ön deneme olarak üretilen polimerlerin saflaştırıldıktan sonra yapılan H-NMR analiz sonucu.



Şekil 36. *Cupriavidus necator* bakterisi suşu kullanılarak üretilen PHBV kopolimerinin saflaştırıldıktan sonra yapılan H-NMR analiz sonucu. Mavi oklar sadece valerata ait olan karakteristik tepe noktalarını göstermektedir.

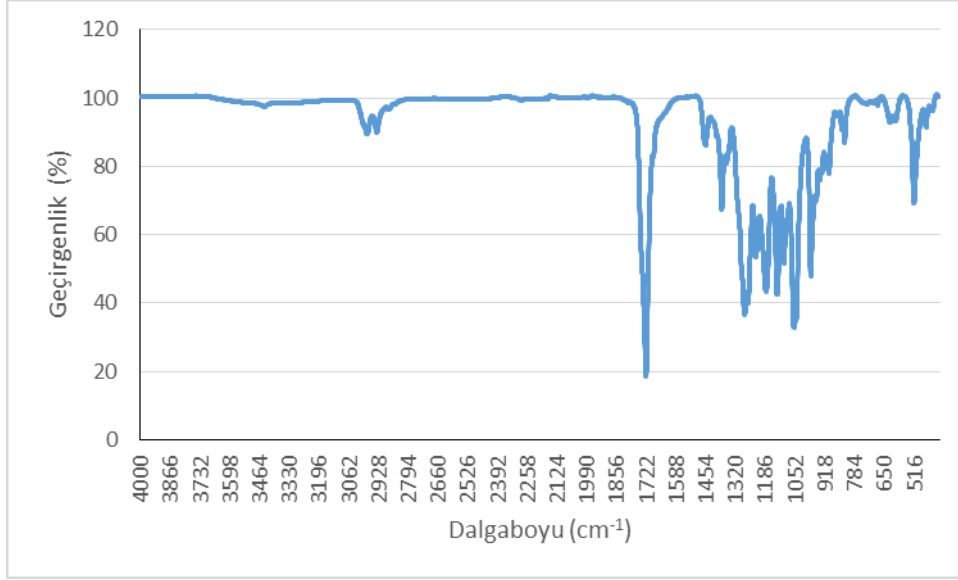
4.7.3 Üretilen PHBV Polimerinin Valerat Yüzdesinin Hesaplanması ile İlgili Bulgular

Tekrarlı olarak üretilip saflaştırılan PHBV kopolimerlerinin valerat yüzdesi H-NMR grafiğinden, yöntem kısmında anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır ve farklı denemelerin ortalaması yaklaşık % 8.2 ± 2.7 olarak bulunmuştur. Projede de hücre taşıyıcı sistemin optimizasyon deneyleri için ticari olarak satın alınan PHBV'nin valerat yüzdesi % 8 olarak belirtilmiştir. Projede, bu hücre taşıyıcıların, bakteriyel olarak üretilen PHBV ile üretilen taşıyıcılar ile karşılaştırılması hedeflenmiştir. Üretilen bakteriyel PHBV'nin valerat yüzdesi satın alınan PHBV'nin valerat yüzdesi oranına başarıyla düşürülmüş ve bakteriyel ve satın alınan PHBV ile üretilen hücre taşıyıcıların karşılaştırılması için uygun üretim başarıyla tamamlanmıştır.

4.7.4 Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Bulguları

Proje kapsamında bakteriden üretilen PHBV polimerinin FTIR spektrumu Şekil 37'de gösterilmiştir. PHBV'ye ait karakteristik bantlar bu spektrumda görülmüştür. Karbon-oksijen gerilimini gösteren bant 1720 cm^{-1} dalga numarasında ve karbon-hidrojen gruplarına ait bant 2977 cm^{-1} dalga numarasında görülmektedir (Nair vd., 2015). Ayrıca, karbon-oksijen-karbon fonksiyoneliğine bağlı simetrik gerilme titreşimleri 978 , 932 , 896 ve 826 cm^{-1} de bantlara sahiptir ve her biri spektrumda mevcuttur (Barboza vd., 2014). Ek olarak, karbon-oksijen-

karbon gruplarının kimyasal fonksiyoneliyesine bağı anti-simetrik gerilme titreşimleri 1060, 1101 ve 1134 cm^{-1} 'de görülmektedir (Raşoga vd., 2017). Kristal fazına spesifik bant 1722 cm^{-1} dalga boyunda baskın olarak gözükmele birlikte (Farago vd., 2008), buradaki bandın 1746'den 1722 cm^{-1} dalga numarası arası genişliğe sahip olması amorf ve kristal fazların birlikte bulunduğuna işaret etmektedir (Raşoga vd., 2017).

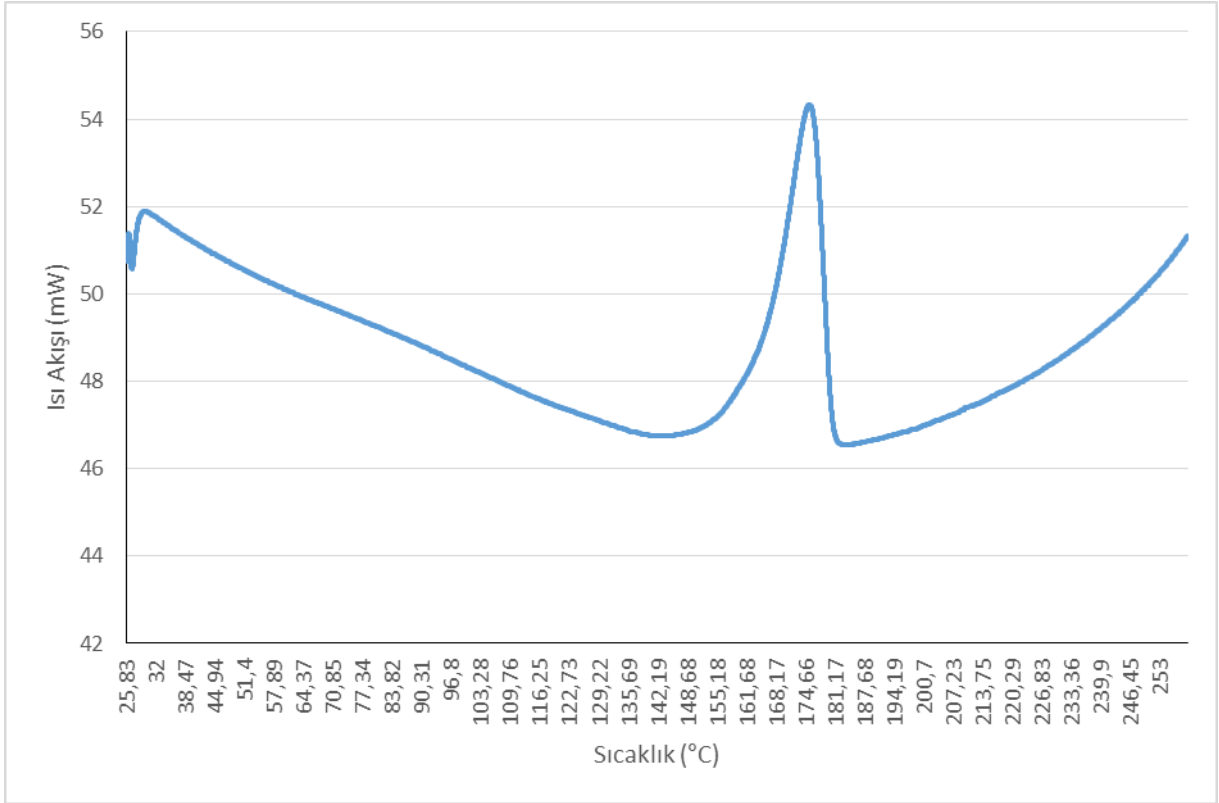


Şekil 37. *Cupriavidus necator* bakteri suşu kullanılarak üretilen PHBV kopolimerinin saflaştırıldıktan sonra yapılan FTIR analiz sonucu.

4.7.5 Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizler ile ilgili Bulgular

Projede bakteriden üretilen PHBV polimeri saflaştırıldıktan sonra yapılan DSC analizi sonucu Şekil 38'de gösterilmiştir. Bu elde edilen polimerin erime sıcaklığına bakıldığında, literatürde PHBV için paylaşılan erime sıcaklığı değerinden (~ 154 °C) daha yüksek bir değere (~ 172 °C) sahip olduğu görülmüştür (Singh vd., 2008). Tepe noktası değerindeki, bu kaymanın PHBV'nin moleküler ağırlığındaki artışla bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Endotermik eğrinin başlangıç ve bitiş noktalarını göz önünde bulundurduğumuzda (~ 148 ve 183 °C) malzemenin kristalinite karakteristiği ile ilgili bir yorum yapılabilmektedir. Litaratürde, semi-kristalin PHBV'nin amorf ve kristal yapıli bölgelerine bağıli olarak çoklu endotermik tepe noktalarına (~ 135 ve 153 °C) sahip olduğu çalışmalar bulunmaktadır (Bianco vd., 2013). Ayrıca, belirli çözücüler içerisinde çözünme, elektroegirme gibi işlemlerden geçmiş olması PHBV'nin bu tepe noktalarının ayrı ayrı görünmemesine, üstüste çakışmasına ve geniş endotermik bir eğri olarak görünmesine yol açabilmektedir (Wagner vd., 2014). Projede üretilen PHBV geniş bir endotermik eğri bandına (~ 148 ve 183 °C) sahiptir ve çoklu erime sıcaklığı tepe noktalarına sahip değildir. Bu sonuç, saflaştırma sırasında uygulanan ısıl ve kimyasal işlemlerden sonra PHBV'nin kristal bölgelerinin litaratürde belirtildiği gibi açılıp

tekrar oluşması (re-kristalizasyon) ile bağdaşmaktadır. PHBV'nin kristal bölgelerin erimesine bağlı oluşan tepe noktaları literatürde ~ 165 °C (orjinal kristallerin erime noktası) ve ~ 176 °C (re-kristalizasyon ve re-organizasyon sonucu oluşan kristal bölgelerin erime noktası) olarak verilmiştir (Díez-Pascual ve Díez-Vicente, 2014). Bu sonuçlar ışığında, elde ettiğimiz PHBV'nin yüksek kristaliniteye sahip olduğu söylenebilmektedir. Amorf bölgede yer alan herhangi ayrı bir tepe noktası görülmemekle birlikte (~ 135 °C) varsa da yüksek moleküler ağırlığa bağlı olarak kaydığı (endotermik bandın başlangıç noktası ~ 148 °C) ve olası kristal bölge erime noktaları ile çakıştığı değerlendirilmiştir.



Şekil 38. *Cupriavidus necator* bakterisi suşu kullanılarak üretilen PHBV kopolimerinin saflaştırıldıktan sonra yapılan DSC analiz sonucu.

4.7.6 Saflaştırılan Bakteriyel PHBV Polimerinde Bakteriyel Protein Tayini ile ilgili Bulgular

Bakteri suşu ile üretilen ve saflaştırılan B-PHBV polimerinin yapısında bakteriyel protein kirliliği olup olmadığı BCA protein testi ile incelenmiştir ve kontrol olarak satın alınan ticari PHBV ile karşılaştırılmıştır. Yapılan deney sonucunda alınan optik yoğunluk değerinde BCA protein miktarı iki polimer grubu içinde benzer (2.1 µg ve 1.9 µg) bulunmuştur. Bu sonuç bakteri suşu ile üretilen B-PHBV içeriğinde protein kirliliği olmadığını göstermiştir.

4.7.7 Saflaştırılan Bakteriyel PHBV Polimerinin Vizkositesinin Araştırılması

Proje önerisinde, bakteri suşundan üretilen ve istenilen nitelikte olduğu belirlenen PHBV'nin molekül ağırlığının belirlenmesi için vizkosite deneyi yapılması öngörülmüştür. Ancak öncelikle ODTÜ Merkez Laboratuvarında yapmak isteğimiz ve daha sonra laboratuvarımızda yapmayı denediğimiz vizkosite ölçümü ön hazırlıklarında bu deney için projedeki tüm deneyler için üretebildiğimiz PHBV miktarından çok daha fazla PHBV üretilmesine ihtiyaç olduğu görülmüştür. ODTÜ Merkez Laboratuvarında vizkosite ölçümü yapabilmek için 15 g PHBV iletmemiz gerektiği belirtilmiştir. Ancak, proje kapsamında istenilen nitelikte PHBV nin elde edilebildiği son dönemde mevcut laboratuvar koşullarıyla 1 ayda yaklaşık 1 g PHBV üretilmektedir. Vizkozite deneyi için gereken bu miktarı üretmek, proje iş takvimi dahilinde mümkün olamamıştır. Ayrıca 15 g gibi yüksek PHBV miktarı kullanılarak bir çok farklı deney ve çalışma yürütülebileceği, bu kadar yüksek bir miktarın sadece vizkosite ölçümünde kullanılmasının bu aşamada hem ekonomik, hem de zamansal kısıtlamalar nedeniyle mümkün olmayacağı değerlendirilmiştir.

4.8 SA Yüklü PHBV/PCL ve DS Kabukları Yüklü PUL Fiberleri İçeren Üç Boyutlu Taşıyıcılar ile İlgili Bulgular

Projede geliştirilmesi planlanan üç boyutlu hücre taşıyıcı, birlikte elektroçirime yöntemi optimize edilerek hedeflendiği gibi başarıyla üretilmiştir. Bu hücre taşıyıcı formun özelliklerini karşılaştırmak için, bileşenlerinin farklı kombinasyonlarını içeren, sadece PHBV/PCL (7/3) fiberlerden, DS kabukları yüklenmiş PHBV/PCL (7/3) fiberlerden, SA yüklü PHBV/PCL (7/3) fiberlerden oluşan taşıyıcılar kontrol grubu olarak hazırlanmış ve PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcıyla birlikte deneylerde kullanılmıştır. Bu örnekler bu aşamada önce ticari PHBV ile hazırlanmıştır.

4.8.1 PUL Fiberlerin Çapraz Bağlanması Optimizasyonu

İlk çalışmalarda PUL için STMP ile çapraz bağlama denemeleri yapılmıştır. Çalışmalarda PUL/STMP ağırlık oranı 7/3 ve STMP/NaOH ağırlık oranı 10/1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Deneylerde ilk olarak STMP, PUL çözeltisi içerisinde çözülerek elektroçirime işlemi yapılmış sonrasında çapraz bağlama reaksiyonunu başlatabilmek amacı ile NaOH içeren alkali sulu ortamda 10-12 dk bekletilerek fiberler çapraz bağlanmıştır.

PBS içerisinde bırakılan PUL fiberlerin dağıldığı gözlenince in situ çapraz bağlama işlemine geçilmiştir. Bu yöntem ile fiberlerin elektroçirime sırasında çapraz bağlanma reaksiyonu başlatılarak fiberlerin elektrik akımı altında toplayıcı banyo içerisine ulaştığı ana kadar önemli

seviyede çapraz bağlanmış olması hedeflenmiştir. Bu amaçla, elektroğirmeye başlamadan hemen önce bu karışım NaOH çözeltisi ile karıştırılmıştır. Ancak, NaOH eklendiği anda çapraz bağlama işlemi başladığından, PUL polimer çözeltisi hızla jel haline dönüşmeye başlamış ve bu çözeltinin bir süre sonra şırınga ucundan geçemeyecek miktarda jelleşerek fiber oluşumunu engellediği görülmüştür. Bu nedenle elektroğirme işlemi her 0.5 ml hacim için NaOH ile karıştırılarak tekrarlanmıştır. Şırınga düzeneği her 0.5 ml hacimde yenilenecek elektroğirme kesintili bir şekilde tamamlanmıştır. In situ çapraz bağlama işlemi sonucunda fiberli yapının bir önceki sistemle üretilmiş fiberlerden çok daha dayanıklılığı olduğu tespit edilmiştir. Fakat 1 günlük PBS inkübasyonu sırasında yine dağıldığı ve yapının hedeflenen sürelerce korunmadığı gözlemlenip çapraz bağlayıcı kimyasalı başka bir malzeme ile değiştirme yoluna gidilmiştir. Bu nedenle proje önerisinde B planında da belirtildiği gibi glutaraldehid (GTA) ile çapraz bağlama denemelerine geçilmiştir. İlk denemelerde STMP ve GTA ardarda kullanarak ikili çapraz bağlama metodu denenmiştir. Daha sonra tek başına GTA ile çapraz bağlama çalışmaları sürdürülmüş ve en başarılı sonuç bu şekilde elde edilmiştir.

Doku mühendisliği çalışmalarında sıkça kullanılan $-OH$ ve $-NH_3$ gruplarına bağlanarak çalışan glutaraldehitin (GTA), çapraz bağlayıcı ajan olarak eklenmesiyle çapraz bağlama verimi artırılmaya çalışılmıştır.

Yapılan denemeler sonunda en başarılı yöntem GTA ile tek seferlik in situ çapraz bağlama sonrasında elde edilmiştir ve birlikte elektroğirme sırasında bu yöntem kullanılmıştır. Başarılı olarak seçilen grup, Tablo 2'de 3. grup olarak gösterilmiştir. İn situ çapraz bağlama işlemi literatürdeki bir çalışmadan adapte edilerek % 5 GTA (a/h) olacak şekilde kullanılmış ve % 10'luk polimer konsantrasyonuna sahip sulu çözelti hazırlanmıştır (Chen vd., 2017). Ayrıca çapraz bağlama işleminin verimini arttırabilmek amacı ile bir asidik katalizör olan p-toluen sülfonik asit (% 0.1) eklenerek, bu karışım 1 saat boyunca $60^{\circ}C$ 'de karıştırıldıktan hemen sonra elektroğirme uygulanmıştır. Oluşan fiberlerin içerisindeki GTA ve p-toluen sülfonik asit'in, toplama banyosundaki etanol içerisine dağılarak, konsantrasyonlarının düşmemesi için toplama banyosuna da aynı konsantrasyonda GTA ve p-toluen sülfonik asit eklenmiştir. Etanol içine toplanan fiberler liyofilizasyon işlemi ile kurutulmuştur. Kurutma işlemi yaklaşık 1 gün sürmüştür ve bu sürede fiberlerin çapraz bağlanma reaksiyonları tamamlanmıştır. Elde edilen taşıyıcılar PBS içerisinde bütünlüğünü dağılmadan koruyabilmiştir. Başarılı olarak seçilen grup daha sonra SEM görüntülemesine götürüldüğünde fiber yapıların kaybolduğu görülmüştür (Şekil 39). Bu durum denemelerin sadece PUL fiberleri kullanılarak yapılmasından kaynaklanmaktadır. Başarılı olan çapraz bağlama metodu, birlikte elektroğirme yöntemine aktarıldığında, PUL fiberlerin yapısını koruduğu ve başarılı bir şekilde çapraz bağlandığı görülmüştür. PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcısında bulunan PHBV/PCL fiberlerinin PUL fiberlerinin arasına dağılarak PUL

fiberlerinin birleşmesini engellediği ve bu sayede çapraz bağlanan PUL fiberlerinin fiber yapısını koruduğu düşünülmektedir.

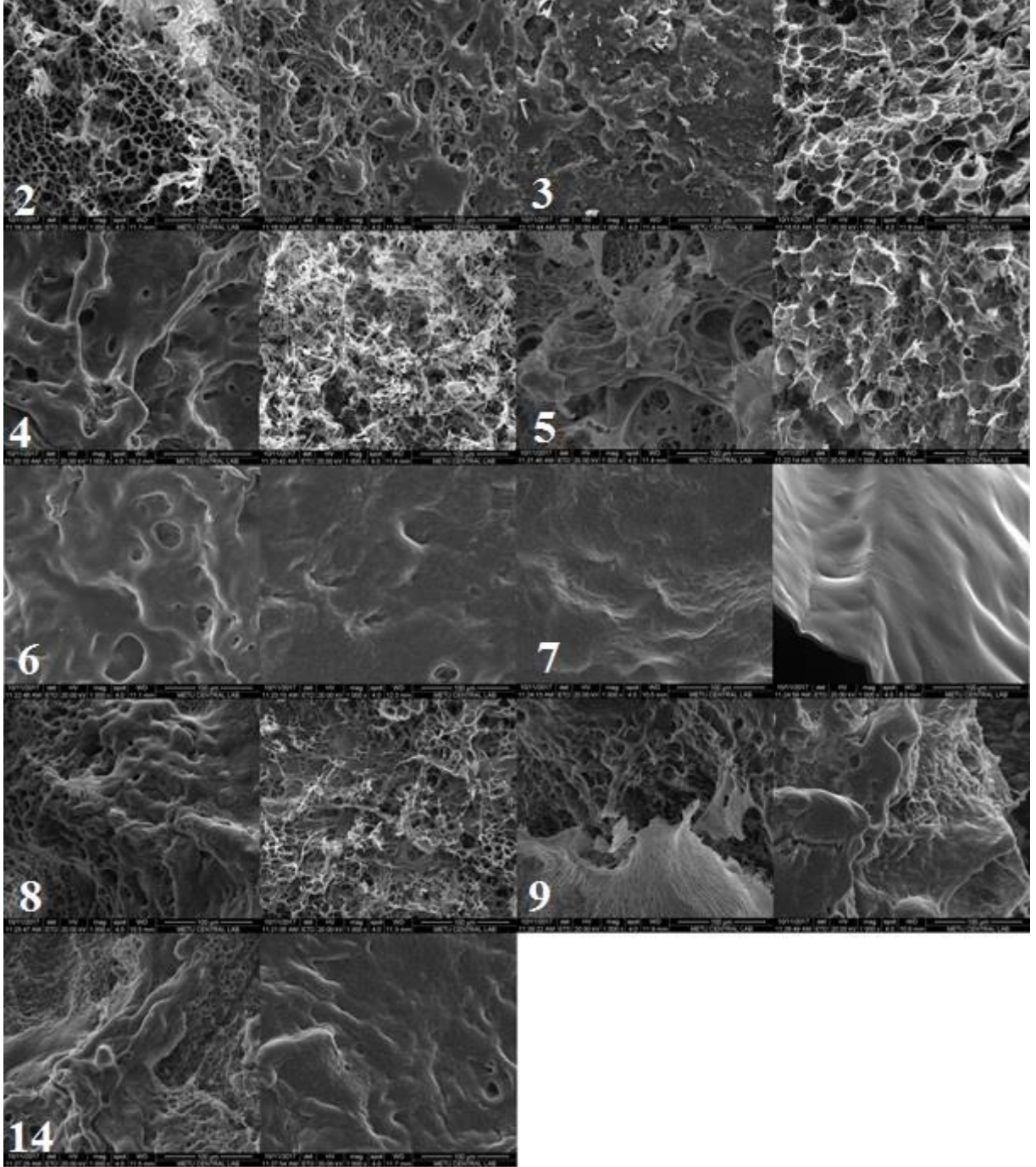
Bu süreçteki tüm çapraz bağlama denemeleri adım adım özetlenmiştir (Tablo 2). Ayrıca PUL solüsyonunun elektroejirme işlemini kolaylaştırmak ve elektriksel özelliklerini daha uygun hale getirmek amacı ile elektroejirme çözeltilerine 1/10 oranında ek çözücü DMF eklenerek denemeler yapılmıştır. Tüm deney grupları (Tablo 2'de 1-15 arası) DMF eklenerek yinelenmiştir ve bozunma testleri PBS içerisinde yapılmıştır.

Tablo 2. PUL fiberlerinin çapraz bağlanması sırasında yapılan işlemler. Tabloda yer alan kısaltmalar: PBS = PBS içerisinde bekleterek bozunma seviyesinin ölçümü; 24°C = Oda sıcaklığında kurutma işlemi; L = Liyofilizasyon işlemi; 60°C = in situ GTA çapraz bağlama işleminin yüksek sıcaklıkta gerçekleşen kısmının tamamlanması; GTA = GTA ile çapraz bağlama işlemi. Tablodaki gruplar ilk aşamada GTA (1-9 arası gruplar) veya STMP (10-15 arası gruplar) ile çapraz bağlanmalarına göre ikiye ayrılmıştır ve ilk kolonda belirtilmiştir. Bu ilk çapraz bağlama sonrasında takip eden işlemler tabloda işaretlenmiştir.

Deney grupları	Yapılan işlemler												
	PBS	24°C	L	PBS	60°C	24°C	L	PBS	GTA	24°C	L	PBS	
<i>in situ</i> GTA	1	✓											
	2		✓		✓								
	3			✓	✓								
	4					✓	✓		✓				
	5					✓		✓	✓				
	6		✓							✓	✓		✓
	7		✓							✓		✓	✓
	8			✓						✓	✓		✓
	9			✓						✓		✓	✓
<i>in situ</i> STMP	10	✓											
	11		✓		✓								
	12			✓	✓								
	13								✓	✓			✓
	14								✓		✓		✓
	15			✓					✓		✓		✓

Deney grupları arasında *in situ* GTA işlemi gören grup-1 PBS içerisinde bozunmuş ve ek işlem gereksinimi yaratmıştır. Bunun üzerine üretilen diğer *in situ* GTA grupları (2-9) PBS

içerisinde yapılarını korurken; in situ STMP işlemi gören gruplar arasında sadece grup-14 dağılmadan kalabilmiştir. Diğer tüm in situ STMP gruplarının ise PBS içerisinde dağıldıkları gözlemlenmiştir. Bütünlüklerini koruyabilen tüm grupların (2-9 ve 14) morfolojilerini görebilmek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz gerçekleştirilmiştir (Şekil 39). Ayrıca, bu grupların DMF ile elektroğrılmış versiyonları da SEM ile incelenerek morfolojisi DMF katılmayan gruplarla kıyaslanmıştır.



Şekil 39. PUL çapraz bağlama çalışmalarında bozunmayan grupların (Tablo 2. 2-9 ve 14) SEM görüntüleri. Her bir numaralı görüntünün sağında yer alan görüntü, aynı deney grubunun DMF kullanılarak üretilen versiyonudur. (Tüm ölçek çubukları: 100 µm).

SEM analizi sonucu gruplarda fiberli yapıların birbirlerine birleşerek bozulduğu gözlemlenmiştir. Elektroeğirme sonrası oda sıcaklığında kurutulan örneklerin (grup-2) gözenekli yapılarının DMF katıldığında azaldığı ve bazı bölgelerde polimer erimesinin olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, elektroeğirme sonrası liyofilizasyon işlemi ile kurutulan örneklerin (grup-3) DMF katılarak üretildiğinde yüzeylerinin daha pürüzlü halde korunabildikleri görülmüştür. Bu durumun, in situ GTA çapraz bağlamadan sonra GTA-alkol içine toplanan örneklerin hiç kurutma işlemi yapmadan 60 °C'ye bırakılan deney grupları için (grup-4 ve 5) tam tersi şekilde seyrettiği görülmüştür. Grup-4 ısıtma işleminin sonunda oda sıcaklığında kurutulduğunda fiberlerden geriye kalması beklenen gözenekli yada pürüzlü bir yapının olmadığı ancak DMF ile elektroeğirildiğinde göreceli olarak daha gözenekli bir yapı elde edildiği görülmüştür. Grup-5 ise liyofilizasyonun pozitif etkisini göstermektedir. Ayrıca grup-4 ile benzer olarak DMF ile eğirildiğinde grup-5, gözenekliliğini daha da iyi korumuş ve PUL fiberli yapılar yer yer gözlemlenebilmişlerdir. Liyofilizasyonun pozitif etkisi grup-6, 7, 8 ve 9 içinde aynı şekilde etki etmiştir. Bu nedenle grup-2 ve 3 için sonuçların lokal olarak değişkenlik gösterebileceği sonucuna varılmıştır.

Grup 6 ve 7 elektroeğirme işlemi sonrası oda sıcaklığında kurutulduktan sonra GTA ile yeniden çapraz bağlanmıştır ve SEM görüntülerinde tamamen yığın haline geldikleri görülmüştür. Bu örneklerin, çift çapraz bağlama işlemleri sonucu oda sıcaklığında veya liyofilizasyon ile kurutuluyor olması morfolojik bir değişikliğe sebebiyet vermemiştir. Elektroeğirme çözeltilerinin içerisinde DMF varlığı da yine herhangi bir değişme ile sonuçlanmamıştır. Bu sonuç, herhangi bir ikincil çapraz bağlama işlemi yapılmaksızın, oda sıcaklığında kurutulan herhangi bir örneğin elektroeğirilmiş yapısının korunmadığını kesin olarak göstermiştir. Grup 8 ve 9'da ise elektroeğirme işlemi hemen sonrası liyofilizasyon ile kurutulduktan sonra GTA ile yeniden çapraz bağlandığında sonucun değiştiği ve yığın görüntülerin net bir şekilde azaldığı gözlenmiştir.

STMP ile çapraz bağlama denemelerinde yapısını koruyan tek grup olan grup 14 ise in situ STMP çapraz bağlama işlemi sonrası yeniden GTA ile çapraz bağlanan ve liyofilize edilen bir örnektir. Ancak SEM görüntülerinde fiberli yapısının korunamadığı görülmüştür.

SEM analizi sonucunda DMF ile elektroeğirilen örneklerde çift çapraz bağlama işlemi sonrası oda sıcaklığında kurutulmuş yapıların DMF katılmayanlara göre daha pürüzlü kalabildiği yani fiberli yapılardan kalan gözeneklerin bir ölçüde korunduğu görülmüştür (grup 4 ve 8). Bunun nedeni DMF'in su ile kıyaslandığında daha uçucu oluşu, dolayısıyla oda sıcaklığında kurutma sürecinde kalan eser miktar çözücü maddenin yapıdan daha hızlı uzaklaşması olarak düşünülmüştür. DMF'in bu etkisi liyofilizasyon ile kurutulan örnekler için görülemez. DMF ile elektroeğirilen ve çift çapraz bağlama işlemine tabi tutulan liyofilize örnekler daha fazla gözenek kaybına uğramışlardır (grup 5, 9 ve 14). Bunun kaynağının yine kalan eser miktardaki DMF'in liyofilizasyonda kullanılan çok düşük sıcaklıklarda (-80 °C) donamadığı

için sıvı halde olup çözücü etkisini göstermesi olduğu düşünülmüştür. Sonuç olarak kurutma işlemi boyunca DMF varlığının polimeri çözdüğüne ve gözenekli yapısını bozduğuna karar verilmiştir.

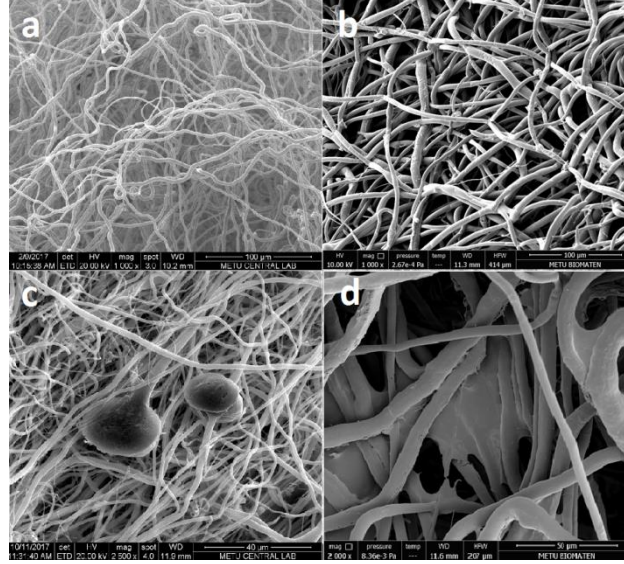
4.9 SA Yüklü PHBV/PCL ve DS Kabukları Yüklü PUL Fiberleri İçeren Üç Boyutlu Taşıyıcıların Özellikleri

Ticari PHBV ile üretilen gruplara (PHBV/PCL, PHBV/PCL/SA, PHBV/PCL/DS ve PHBV/PCL/SA:PUL/DS) ek olarak *Cupriavidus necator* bakteri suşu ile üretilen bakteriyel PHBV (B-PHBV) kullanılarak B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS hücre taşıyıcı grubu da oluşturulmuştur. Bakteri ile üretilen PHBV ile elektroçirime öncesi HFIP içerisinde polimer çözeltisi hazırlandığında, polimerin başarıyla çözüldüğü ve yüksek yoğunlukta bir çözelti elde edildiği görülmüştür. Elektroçirime işlemine uygun olması için PHBV çözeltisinin derişimi %10'a düşürülmüştür. Sentezlenen ve saflaştırılan PHBV'nin daha düşük derişimde elektroçirilebilir olması nedeniyle ülkemizde üretilen bu polimerin yüksek fiyatlarla yurt dışından satın alınana göre daha kaliteli bir polimer olduğu düşünülmektedir. Bu özellik projenin son döneminde istenilen valerat %'si içeren PHBV üretildikten sonra görülebilmüştür. Ticari formulla karşılaştırmalar yapılabilmesi için yine PHBV/PCL polimerleri aynı oranda kullanılarak son grup hazırlanmıştır. Taşıyıcıların, fiber morfolojileri, gözeneklilikleri, bozunma ve su tutma özellikleri, mekanik dayanımları, SA salım profilleri ve kalsiyum biriktirme miktarları araştırılmış ve karşılaştırılmıştır. Hücre taşıyıcılarının hücre canlılık testi Saos-2 ve L929 hücreleriyle yapılmış ve taşıyıcılar üzerine ekilen Saos-2 hücrelerinin ALP aktivitesi de incelenmiştir. Taşıyıcılarının üzerinde çoğaltılan hücrelerin morfolojik görüntüsü SEM ile görüntülenmiştir. Ayrıca taşıyıcılar üzerindeki hücre dağılımı ve hücre morfolojisi lazer taramalı konfokal mikroskobu ile incelenmiştir.

4.9.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Sonuçları

Bakteriyel PHBV ile üretilen B-PHBV/PCL (Şekil 40, b) ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS (Şekil 40, d) taşıyıcılarının fiber morfolojilerini incelemek için SEM görüntüleri alınmıştır ve karşılaştırma amacı ile ticari PHBV ile üretilmiş PHBV/PCL (Şekil 40, a) ve PHBV/PCL/SA:PUL/DS (Şekil 40, c) gruplarının SEM görüntüleriyle birlikte Şekil 40'ta sunulmuştur. Bakteriyel PHBV ile üretilen PHBV/PCL fiberler, ticari satın alınan PHBV ile üretilen fiberlere göre daha kalın oluşmuştur. Bunun nedeni, ticari olarak satın alınan PHBV'ye göre projede bakteri ile üretilen PHBV'nin daha saf ve kaliteli bir polimer içeriğinde ve daha yüksek çözünürlüğe sahip olması olarak değerlendirilmiştir. Ticari PHBV kullanılan deneylerde elektroçirime yapılabilmesi için PHBV çözeltisinin % 14 olarak hazırlanması gerekirken, bakteri ile üretilen PHBV kullanılan elektroçirime üretimlerinde B-PHBV çözeltisi % 10 olarak hazırlanmıştır. Daha yüksek derişimde yoğunluk nedeniyle eçirme yapılamamıştır. SEM görüntülerinden, PHBV/PCL, PHBV/PCL/DS ve PHBV/PCL/SA

gruplarının fiber çapları 1.38 ± 0.2 , 2.47 ± 0.5 ve 1.62 ± 0.2 μm olarak hesaplanmıştır. Bakteriyele PHBV ile üretilen fiber çapları ise 4.51 ± 1.5 olarak bulunmuştur. PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcı grubundaki PUL fiberlerin çapları 2.10 ± 0.6 μm , B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubundaki PUL ile benzer ölçülerde üretilmiştir (2.5 ± 0.7 μm). Ancak 1. formda PHBV/PCL fiberlerinin çapı 0.46 ± 0.15 μm iken B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS formunda bu fiberler 4.98 ± 1.3 μm boyutuna çıkmıştır.

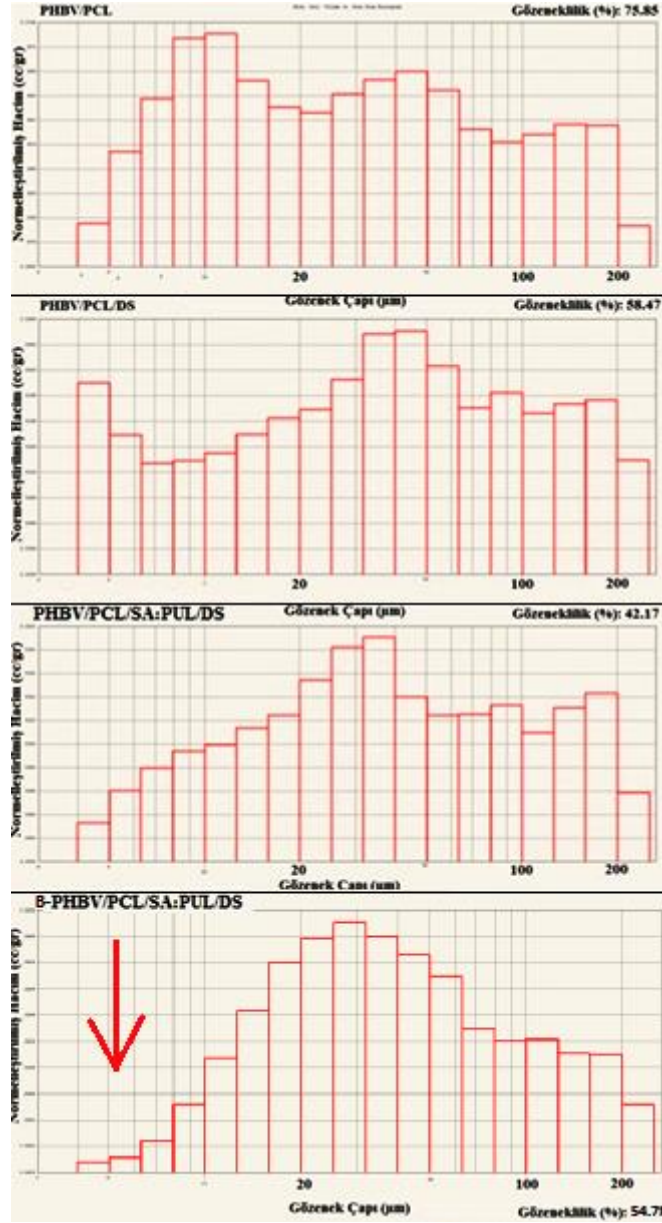


Şekil 40. PHBV/PCL (a) B-PHBV/PCL (b) PHBV/PCL/SA:PUL/DS (c) ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS (d) taşıyıcı gruplarının SEM görüntüleri.

4.9.2 Gözeneklilik Analizi Sonuçları

Bakteriyel PHBV ile üretilen B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubunun gözeneklilik ve gözenek boyut dağılımı sonuçları ve ticari form ile yapılan PHBV/PCL, PHBV/PCL/DS ve PHBV/PCL/SA:PUL/DS gruplarının sonuçları Şekil 41’de gösterilmektedir. En yüksek gözeneklilik (% 75.85) PHBV/PCL fiberlerinden oluşan ve normal elektroçirme ile üretilen taşıyıcılarda gözlenmiştir. PHBV/PCL fiberlerin içerisine DS kabukları eklendiğinde, taşıyıcıdaki gözenekliliğin % 58.47’ye düştüğü görülmüştür. Bunun nedeninin fiber yapısına hapsedilen diatomların, fiberler arasındaki boşlukları doldurması ve ayrıca fiberlerde ağırlaşmaya neden olarak fiberleri birbirine yaklaştırması olduğu düşünülmektedir. Birlikte elektroçirme ile üretilen PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcısı en düşük (% 42.17) gözenekliliği göstermiştir. Bu sonuç, iki farklı fiberin birlikte eğirilmesi ile daha yoğun bir yapıda fiber iskeletin oluşturulması ile ilgili olarak yorumlanmıştır. Bakteriyele PHBV ve birlikte elektroçirme yöntemi ile üretilen B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubunda PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcısına göre gözenekliliğin arttığı (% 54.71) görülmüştür. Bunun

nedeni bakteriyel PHBV kullanılarak üretilen B-PHBV/PCL fiberlerinin daha kalın olması ve taşıyıcıyı daha çok destekleyerek, taşıyıcının çökmesini engellemesidir.



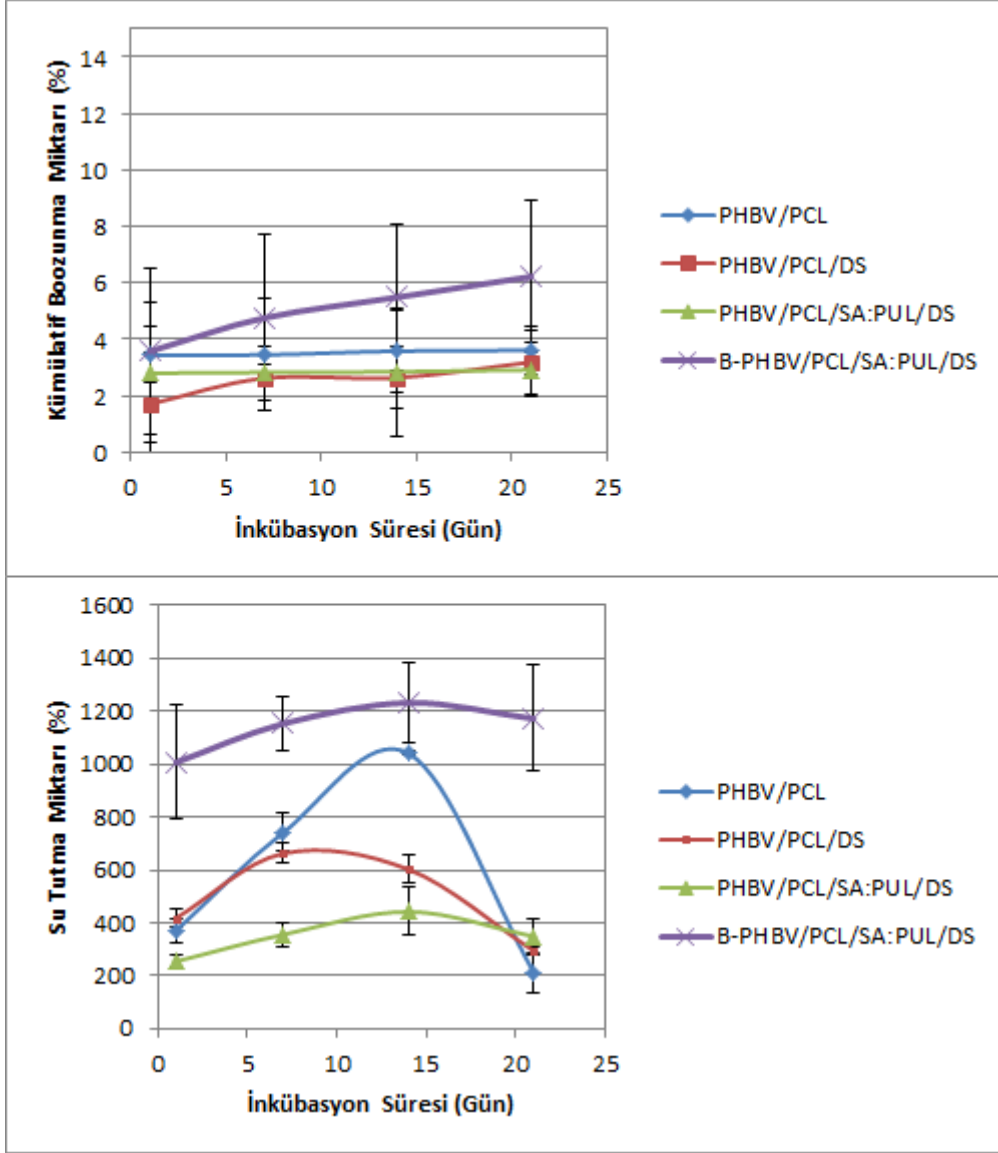
Şekil 41. Üretilen PHBV/PCL, PHBV/PCL/DS, PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcıların gözeneklilik boyut dağılımı ve taşıyıcıların % gözeneklilik sonuçları. Şekildeki ok, diğer gruplara kıyasla B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcıda yoğunluğu azalan düşük gözenek çaplarını göstermektedir.

Gözenek boyut dağılımı sonuçları incelendiğinde, B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubunda 20 µm'den küçük olan gözeneklerin, diğer gruplara kıyasla çok daha az sayıda olduğu farkedilmektedir. Bakteriyel PHBV kullanılarak üretilen B-PHBV/PCL fiberlerinin kalın yapısı taşıyıcıdaki gözenek boyutunu da arttırmıştır. Bu taşıyıcı, yoğun olarak daha geniş

gözenekler içerdiği için hücre göçüne ve yayılmasına elverişlidir. Taşıyıcıların hücre göçüne uygun olması için daha geniş çapta gözenekliliğe sahip olması gerektiği bilinmektedir. Osteoblast hücrelerinin 40 µm çaptaki gözeneklilikte çoğaldığı ve 100 µm çapta gözeneklilikte de taşıyıcı içine göç ettiği rapor edilmiştir. (Loh ve Choong, 2013). Bu genişlik, göç eden hücrelerin gözeneklerden ilerlemesi için gereken bir aralıktır.

4.9.3 Bozunma ve Su tutma Analizi Sonuçları

Bakteriyel PHBV ile üretilen B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubunun zamana bağlı bozunma ve su tutma grafiği ve PHBV/PCL, PHBV/PCL/DS ve PHBV/PCL/SA:PUL/DS gruplarının sonuçları Şekil 42’de gösterilmektedir. Bozunma deneyi sonucunda taşıyıcıların çok yavaş kütle kaybettiği gözlenmiştir ve 21 günlük inkübasyonun sonunda grupların bozunma miktarı % 10’un altındadır. Bu sonuç tüm taşıyıcıların kararlı bir yapı gösterdiğini, PUL içeren gruplarda, PUL fiberlerin başarıyla çapraz bağlandığını göstermektedir. Bozunma deneyinin 7. gününden itibaren B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubunun diğer gruplara oranla daha fazla kütle kaybettiği görülmektedir. B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubunu PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubu ile karşılaştırdığımızda iki grupta hidrofilik PUL fiberleri içermektedir ancak PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubunun kütle kaybı diğer gruplara yakinken B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubunun kütle kaybı daha fazla olmuştur. Bu sonucun B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcının diğer taşıyıcılara oranla daha yoğun ve büyük gözenekler içermesi ve bu gözeneklerin yapıya daha fazla su girişine izin vererek bozunmayı artırması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Bu durum aynı zamanda grupların su tutma sonuçlarında da gözlenmektedir. B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubu en fazla su tutan grup olarak bulunmuştur. Yapısında bulunan geniş gözeneklerin çokluğu hidrofilik PUL fiberlerinin olduğu iç kısımlara daha kolay su taşınmasına ve dolayısıyla taşıyıcının daha fazla su çekmesine olanak sağlamıştır.

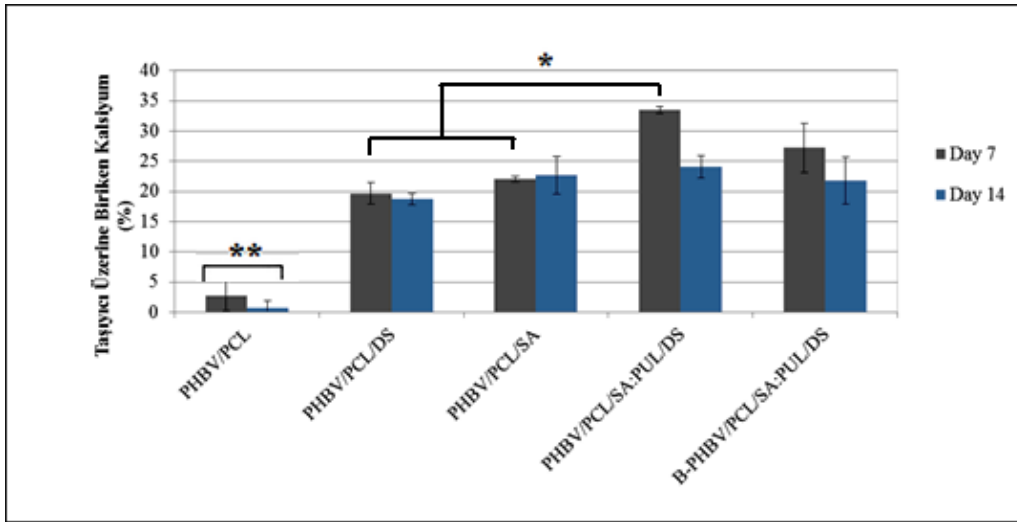


Şekil 42. PHBV/PCL, PHBV/PCL/DS, PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS gruplarının, (üst) bozunma analizi ve (alt) su tutma analizi sonuçları.

4.9.4 Biyomineralizasyon Analizi Sonuçları

Taşıyıcılar üzerine biriken kalsiyum miktarı, taşıyıcılar simüle edilmiş vücut sıvısı (SBF) içerisinde bekletildikten sonra SBF içerisindeki kalsiyum miktarı azalması ölçülerek belirlenmiştir. Taşıyıcılara çöken kalsiyumun yüzde değeri, kontrol SBF içerisindeki kalsiyum miktarını % 100 kabul edilerek hesaplanmıştır (Şekil 43). PHBV/PCL taşıyıcı grubunda 14 günlük inkübasyon sonucunda neredeyse hiç kalsiyum birikmesi olmamıştır. Fiberler içerisine DS yüklenecek oluşturulan PHBV/PCL/DS grubunda kalsiyum birikmesi % 20'ye yükselmiştir. PHBV/PCL/SA grubunda ise, fiberlere SA yüklenmesinin kalsiyum depolanmasını % 20'ye kadar arttırdığı görülmüştür. Fiberler içerisinde hapsedilen SA'nın bir şekilde kalsiyum ile etkileştiği ve kalsiyum birikmesini arttırdığı düşünülmektedir. Literatürde SA ile kalsiyum

arasındaki ilişkiden söz eden bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak SA antibiyotiği oral yoldan kullanılırken, SA ile birlikte kalsiyum içeren başka bir ilaç alınmamasına yönelik uyarılar bulunmaktadır ve bu da SA ile kalsiyum arasında bir etkileşimin olabileceğini düşündürmektedir (PDR, Prescribers Digital Reference, 2019). Bu özelliğin, SA antibiyotiğinin, kemik doku mühendisliğinde kullanımında avantaj sağlayabileceği de değerlendirilmiştir. İnkübasyonun 7. gününde, birlikte elektroğrılmış PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubu hem SA'yı hem de DS kabuklarını yapısında bulundurduğu için diğer gruplara kıyasla daha yüksek kalsiyum birikmesi göstermiştir. Ancak 14 gün sonunda diğer gruplarla aynı oranda kalsiyum birikme miktarı gözlenmiştir. Bunun bir nedeni, 14 günlük inkübasyon sonunda çözünen PUL fiberlerinin de etkisi ile yüzeye birikmiş olan kalsiyum bazlı minerallerin kaybedilmesi olabilir. Bakteriyel PHBV ile üretilen B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcı grubunda da 7. Günde artan kalsiyum birikme miktarı, 14. gün azalmıştır ve birlikte elektroğrılmış diğer grup olan PHBV/PCL/SA:PUL/DS'e benzer bir sonuç sergilemiştir.



Şekil 43. Simüle edilmiş vücut sıvısı (SBF) içerisinde bekleyen taşıyıcıların, 7 ve 14 günlük inkübasyon sonrasında taşıyıcı üzerinde biriken kalsiyum miktarları. * PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubu ile diğer gruplar arası istatistiksel farklılık ($p < 0.05$). **PHBV/PCL grubu ve diğer gruplar arası istatistiksel farklılık ($p < 0.05$).

4.9.5 Mekanik Çekme ve Basma Testi Sonuçları

Taşıyıcıların çekme ve basma mekanik testlerinin sonucunda elde edilen Young Modülü, nihai çekme ve basma dayanımı Tablo 3 ve 4'de sunulmuştur. Çekme testi sonucunda, PHBV/PCL ve PHBV/PCL/DS taşıyıcı grupları karşılaştırıldığında, taşıyıcı fiberlere DS yüklendiğinde Young Modülü değerinin arttığı ancak nihai çekme dayanımının düştüğü gözlenmiştir. Fiberler içerisine DS eklendiğinde fiber çapının arttığı gözlenmiştir ve fiber çapındaki bu artışın elastik modülün artmasına neden olduğu düşünülmektedir. DS'ler ile

polymer arasında arayüzey etkileşimi olmadığı için, fiberler içerisine hapsolan ve yarıçapı fiberlerden daha geniş olan DS'ler fiberlerin nihai çekme dayanımını düşürmüştür. Birlikte elektroğrılmış PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcı grubu daha yüksek elastik modülüne sahiptir. Birlikte elektroğrılmış yapıda bulunan DS yüklü kalın PUL fiberler ve elde edilen yoğun fiber matrisi yapının mukavemetini arttırmıştır ancak yapının nihai çekme dayanımı ancak PHBV/PCL grubu ile aynı düzeye kadar artmıştır. Basma testi sonucunda PHBV/PCL/DS grubunun PHBV/PCL grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek Young Modülü ve basma dayanımı değerlerine sahip olduğu görülmüştür (Tablo 4). Yapıya eklenen DS'ler yuvarlak yapısı sayesinde fiberler arasındaki boşlukları doldurarak fiber matrisine fiziksel destek kazandırmıştır. Basma testinde PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve B- PHBV/PCL/SA:PUL/DS grupları en yüksek Young Modülü ve basma dayanım değerlerine sahiptir. Birlikte elektroğrılmış bu taşıyıcılar, yapıya fiziksel destek olan DS kabukları ve birlikte elektroğirme sonucu elde edilen yoğun fiber matrisi sayesinde, diğer gruplara göre daha yüksek basma dayanımı göstermiştir.

Tablo 3. Çekme kuvveti testine tabi tutulan taşıyıcıların Young Modülü ve nihai çekme dayanımı değerleri. α : PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS gruplarının Young Modülü değerlerinin diğer gruplara göre istatistiksel anlamlı farkları. $p < 0.05$: PHBV/PCL grubunun nihai çekme dayanımının PHBV/PCL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS gruplarının nihai çekme dayanımından istatistiksel anlamlı farkı ($p < 0.05$).

Scaffold Groups	Young Modülü (kPa)	Nihai Çekme Dayanımı (kPa)
PHBV/PCL	95.2 ± 3.1	22.3±2.8 ^β
PHBV/PCL/DS	125.3 ± 10.9	13.5±5.5 ^β
PHBV/PCL/SA:PUL/DS	515.2 ± 91.9 ^α	19.1±1.4
B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS	460 ± 79.1 ^α	16 ± 2.7 ^β

Tablo 4. Basma kuvveti testine tabi tutulan taşıyıcıların Young Modülü ve % 70 oranında basma sonrasında basma dayanımı değerleri α : B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubunun Young Modülü değerlerinin diğer gruplara göre istatistiksel anlamlı farkı. β : B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubunun nihai çekme dayanımının PHBV/PCL ve PHBV/PCL/DS gruplarının nihai çekme dayanımından istatistiksel anlamlı farkı ($p<0.05$).

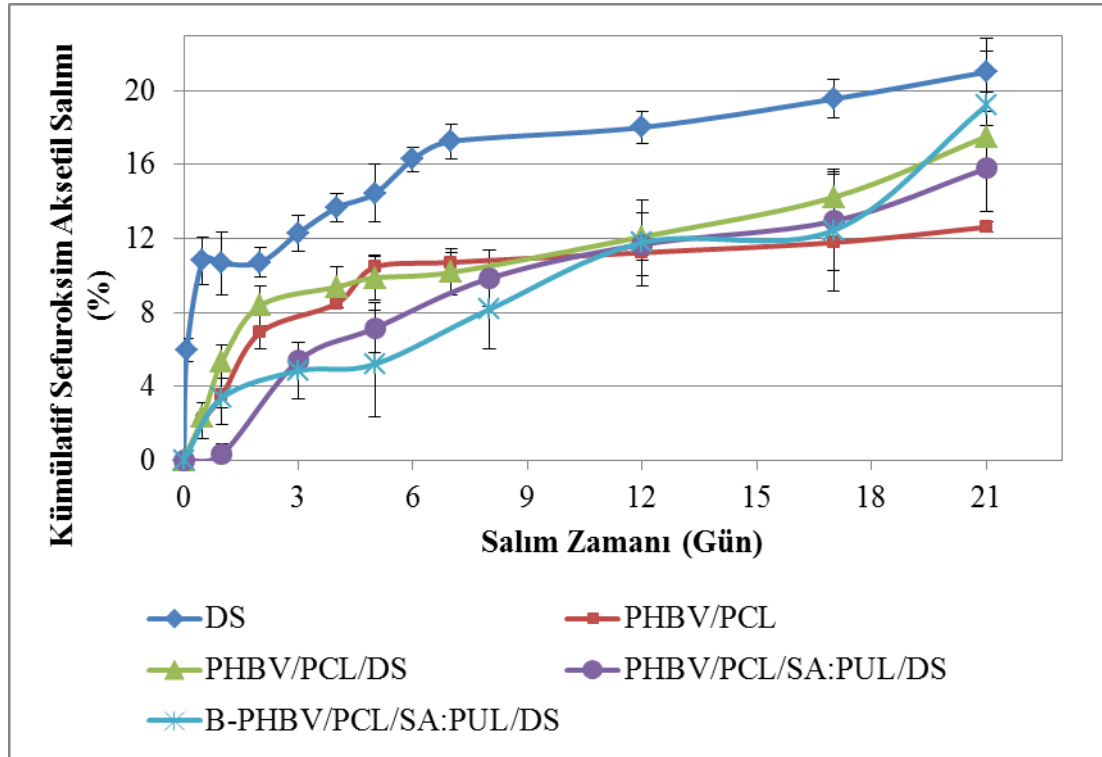
Scaffold Groups	Young Modülü (kPa)	Basma Dayanımı (% 70 oranında basıldığında) (kPa)
PHBV/PCL	2.42 \pm 0.52 ^{α}	1.83 \pm 0.55 ^{β}
PHBV/PCL/DS	8.15 \pm 2.47 ^{α}	4.86 \pm 1.41 ^{β}
PHBV/PCL/SA:PUL/DS	10.63 \pm 3.05	11.85 \pm 1.76
B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS	13.75 \pm 2.3 ^{α}	14.75 \pm 2.1 ^{β}

4.9.6 B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS Grubu Antibiyotik Yüklenme Etkinliğinin ve Antibiyotik Salım Profilinin İncelenmesi

Son grup olarak üretilen bakteriyel PHBV içeren B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubunun SA salım profilleri ticari PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve diğer gruplarla birlikte karşılaştırılmıştır (Şekil 44). Taşıyıcıdaki hidrofobik PHBV/PCL fiber fazına, SA'nın hidrofobik yapısı sayesinde, yüksek miktarda SA antibiyotik yüklemesi yapılabilmektedir. PHBV/PCL, PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS gruplarında, SA'nın elektroçirime öncesi eklenen miktarına göre % 92 \pm 9.6, % 93 \pm 11.7 ve % 89 \pm 10.7 oranında SA yüklendiği bulunmuştur. Tek başına DS içerisine sadece % 66 \pm 7.4 oranında SA yüklenebilmiştir. Bütün grupların SA salım profil incelemesi 21 güne kadar devam ettirilmiştir (Şekil 44). Salım süresinin sonunda (3 Hafta) tüm grupların kümülatif SA salımının % 25'in altında olduğu görülmüştür. Bu sonuç, hidrofobik olan SA'nın yavaş salımından kaynaklanmaktadır. Taşıyıcı gruplarının kümülatif SA salımları 12. günde benzer miktarlara ulaşmıştır ancak PHBV/PCL/DS grubunda DS kabuklarından salınan SA miktarı 12. günden sonra PHBV/PCL grubunda fiber yapıdan salınan SA miktarına göre artmıştır. Birlikte elektroçirilmeye üretilmiş PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubu çok daha düşük başlangıç SA salımını takiben daha kontrollü ve yavaş SA salımı göstermiştir. Birlikte elektroçirilmeye üretilen fiberler daha sık şekilde fiber matrisi oluşturduğundan ve bu nedenle yapının gözeneklilik miktarı düşük olduğundan yapıya suyun nüfuz etmesi ve SA salımının olması yavaşlamıştır. Bu sayede birlikte elektroçirilmeye üretilen gruplar ilk 12 günde daha kontrollü SA salımı göstermiştir. Literatürdeki çalışmalarda daha önce biyoaktif cam malzemeden, mikrokürelerden, kalsiyum fosfat yapılardan ve polimer-seramik yapıdaki hücre taşıyıcılardan SA salımı rapor edilmiştir (Yaprakci vd., 2013; Nandi vd., 2009a; Nandi vd., 2009b). Bu projede SA ilk kez elektroçirilmiş fiberler içerisine hapsedilmiştir ve üretilen taşıyıcı sayesinde hem fiberlere

yüklü SA dış etmenlerden korunmuş, bölgesel salım sistemi oluşturularak sistemik yan etkilerin azaltılması, SA'nın tedavi bölgesinde uzun süreli salımı ile operasyon sonrası komplikasyonların azaltılabileceği bir sistem geliştirilmesi sağlanmıştır. Yapılan deneyde PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS gruplarının başarılı bir şekilde SA'nın kontrollü salımını sağlayabilecek yapıda olduğu görülmüştür.

Bu araştırma aynı zamanda hidrofobik bir ajanın fiber yapıya eklenerek kontrollü salımının yapılabileceğini göstermektedir. Bu yaklaşım ile antibiyotik dışında amaca yönelik başka ilaç veya bioetken maddelerin (ağrı kesici, antiinflamatuvar, hormon, büyüme faktörü vb) taşıyıcıdaki fiber yapılardan birine veya taşıyıcıdaki DS iskeletlerine yüklenerek lokal kontrollü salımının uygulanabileceği gösterilmiştir.



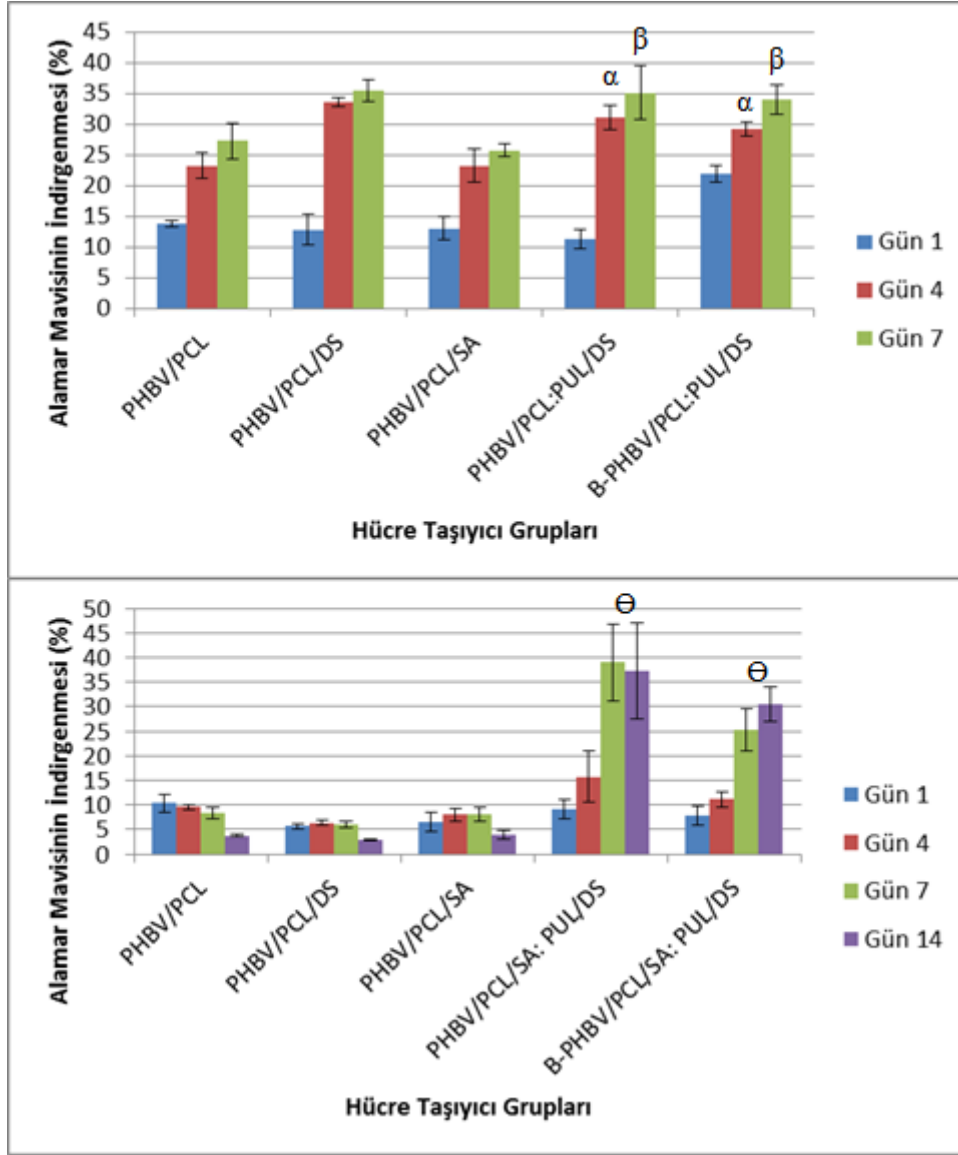
Şekil 44. Taşıyıcı gruplardaki PHBV/PCL polimer fiberlerden, tek başına DS kabuklarından ve SA yüklü DS kabukları katkılı polimer fiberlerden (PHBV/PCL/DS) elde edilen 21 günlük SA salım profilleri.

4.10 Hücre Kültürü Deneyleri ile İlgili Bulgular

4.10.1 Taşıyıcılar Üzerinde Hücre Canlılığı ve Çoğalması Bulguları

PHBV/PCL, PHBV/PCL/SA, PHBV/PCL/DS ve PHBV/PCL/SA:PUL/DS gruplarının hücre canlılığı alamar mavisi canlılık testi ile ölçülmüştür. Bakteriden elde edilen PHBV'nin hücreler üzerindeki etkisini görmek için iki ayrı grup ile hücre canlılığı testi yapılmıştır. Bu gruplar,

bakteriyel PHBV ile üretilen, B-PHBV/PCL ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS gruplarıdır. Taşıyıcıların kemik doku mühendisliğine uygunluğunun araştırılmasında canlılık testi için Saos-2 ve L929 hücreleri seçilmiştir. Taşıyıcılardaki PHBV/PCL fiberlerine SA yüklenmesinin hücre canlılığı üzerinde negatif bir etkisi olmadığı görülmüştür. Hücre canlılığı testi sonucunda, DS içeren grupların 4. ve 7. günden sonra hücre canlılığını diğer gruplara kıyasla arttırdığı görülmüştür. Bu çalışmada, DS kabuklarının orijinal boyutunda ve şeklinde hücre canlılığını desteklediği ve DS kabukları öğütülmüş olarak daha küçük boyutlara (1-5 µm) getirildiğinde Saos-2 hücre canlılığını düşürdüğü Bölüm 4.5'te indirekt hücre canlılığı testi (Şekil 26) ile gösterilmiştir. DS kabuklarının boyuta, doza ve şekle bağlı yarattığı sitotoksikite literatürde yeni bir çalışmada, küçük boyutta, düzgün şekilde olmayan ve yüksek dozda DS'in hücre ölümüne yol açması şeklinde rapor edilmiştir (Zhang vd., 2018). Küçük boyuttaki DS'lerin hücre içerisine alınma oranlarının arttığı ve hücre yüzeyiyle etkileştiğinde reaktif oksijen bileşenleri oluşturduğu bu nedenle hücre canlılığını düşürdüğü düşünülmektedir. Bu projede orijinal boyutunda kullanılan DS'lerin hücre canlılığını düşürmediği ve SEM görüntülerinde hücrelerin DS'ler üzerine tutunduğu gösterilmiştir. Taşıyıcıdaki DS'lerden salınan silikonun osteojenik özellikleri arttıracakları bilinmektedir. Silikonun daha önceki çalışmalarda osteoblast aktivitesini arttırdığı, silisik asitin IGF-I büyüme faktörü üretimini arttırdığı ve hücre ölümünü inhibe ettiği rapor edilmiştir (Kim vd., 2013). Daha önceki çalışmalarda da kitosan zarların ve silk fibroinden üretilen taşıyıcıların biyoaktivitesi ve kemik doku mühendisliğine uygunluğunun diatomit eklenerek artırılabilirliği rapor edilmiştir (Liaudanskaya vd., 2018; Tamburaci ve Tihminlioglu, 2017). Tamburaci ve Tihminlioglu (2018), ayrıca bir başka çalışmalarında kitosan süngerlerde ağırlıkça % 1-10 konsantrasyon aralığında diatomit kullandıklarında Saos-2 hücrelerinin biyoaktivitesinin arttığını belirtmiştir (Tamburaci ve Tihminlioglu, 2018). Bakteriyel PHBV kullanılarak üretilen B-PHBV/PCL ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grupları göz önüne alındığında, bakteriyel olarak üretilen PHBV'nin hücre canlılığına negatif bir etkisi olmadığı görülmektedir (Şekil 45). Birlikte elektroğrılmış B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubunun diğer gruplara kıyasla 1. gün sonunda daha yüksek hücre canlılığını desteklediği görülmektedir. Daha sonraki günlerde hücre canlılığı diğer gruplarla aynı oranda artmıştır. Bu sonuçlar gözönüne alındığında, bakteriyel PHBV ile üretilen fiberlerin ilk günde hücre tutunmasını ve canlılığını arttırdığı düşünülmektedir.

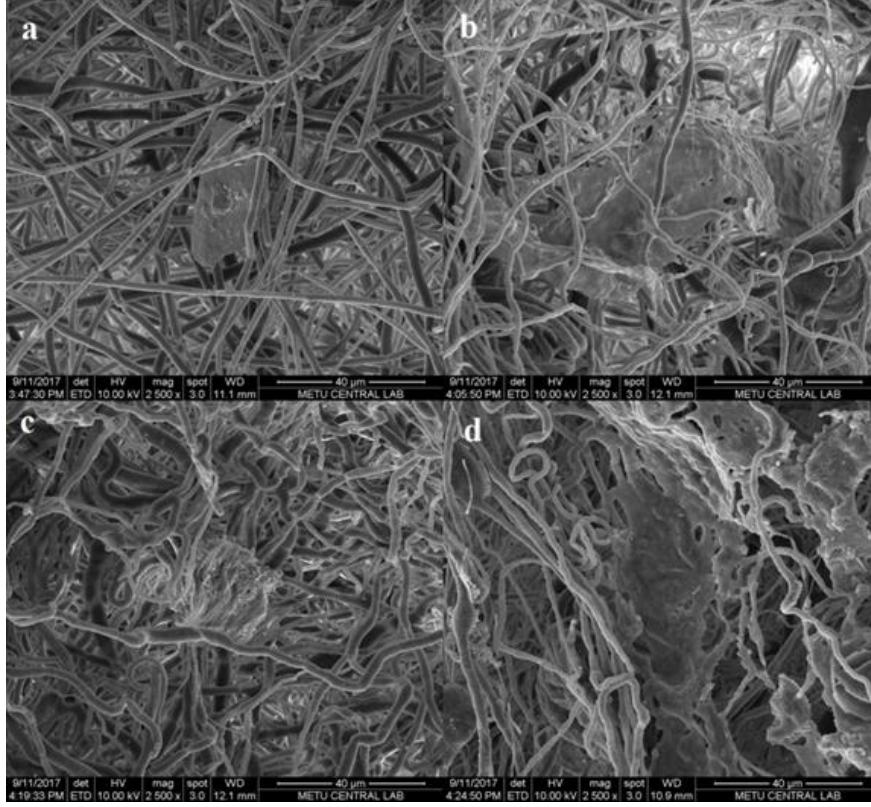


Şekil 45. Hücre taşıyıcı grupların üzerinde çoğaltılan Saos-2 (Üst) ve L929 (Alt) hücrelerinin inkübasyon süreleri sonunda alamar mavisini indirgeme aktiviteleri. α : İnkübasyonun 4. günü sonunda PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grupları ile PHBV/PCL ve PHBV/PCL/SA grupları arasındaki istatistiksel fark $p < 0.05$. β : İnkübasyonun 7. günü sonunda PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grupları ile PHBV/PCL/SA grubu arasındaki istatistiksel fark $p < 0.05$. θ : İnkübasyonun 7. ve 14. günü sonunda PHBV/PCL/SA:PUL/DS ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS grupları ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark ($p < 0.05$).

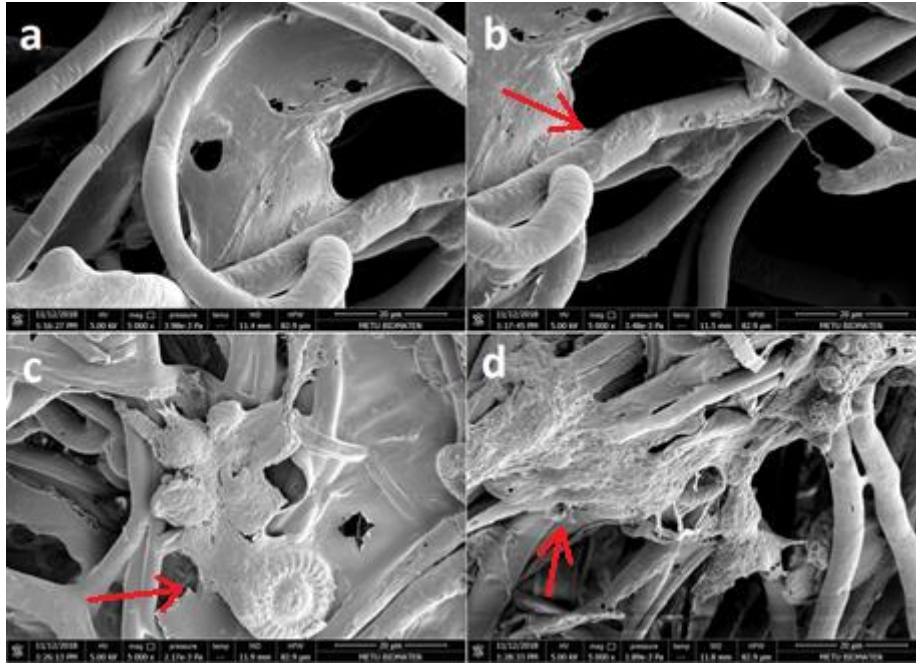
4.10.2 Taşıyıcılar Üzerinde Hücre Tutunması ve Morfolojisi Bulguları

Hücrelerin taşıyıcılar üzerindeki morfolojisi SEM ile incelenmiştir. Bunun için hücreler taşıyıcılarda 7 gün boyunca çoğaltıldıktan sonra fikse edilmiştir ve bu taşıyıcılar kaplama işleminin ardından SEM ile incelenmiştir. Şekil 46'da taşıyıcılardan alınan görüntüler gösterilmektedir. PHBV/PCL ve PHBV/PCL/SA grubunda düşük hücre yoğunluğu dikkati çekmektedir (Şekil 46, a ve c). Hücreler taşıyıcı içerisinde daha uzak yerleşmiştir. PHBV/PCL/DS ve PHBV/PCL/SA:PUL/DS gruplarında ise daha yoğun hücre kütleleri görüntülenmiştir (Şekil 46, b ve d). Böylece DS katkılı taşıyıcıların hücre canlılığı üzerindeki pozitif etkisi SEM incelemesinde de görülmüştür. Hücrelerin dağılımını daha net belirleyebilmek için konfokal mikroskobu ile görüntüleme yapılmıştır.

Bakteriyel PHBV kullanılarak üretilen B-PHBV/PCL ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS gruplarının üzerinde çoğalan Saos-2 hücrelerinin SEM görüntüleri Şekil 47'te görülmektedir. Bakteriyel PHBV kullanılarak üretilen PHBV/PCL taşıyıcının fiberlerinin daha kalın olduğu görülmüştür. Hücreler kalın fiberlerin üzerinde, tek bir fiber üzerinde uzanmış şekilde veya fiberlerin birleşme noktasında fiberlere tutunmuş olarak görülmektedir (Şekil 47, a ve b). Kalın fiberler üzerine uzanmış hücrelerin ince uzun bir morfolojiye sahip olduğu görülmüştür. B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcı grubunda birlikte elektroğrılmış fiberlerin oluşturduğu daha yoğun hücre matrisi, hücrelerin taşıyıcı üzerinde rahatlıkla yayılabileceği alanlar yaratmıştır. Hücrelerin birbirine yakın fiberler üzerinde yayıldığı görülmektedir (Şekil 47, c ve d). Hücrelerin B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcı yapısında bulunan DS'lerin çevresinde de sağlıklı bir morfolojiye sahip olduğu ve DS'lere tutunarak etrafında büyüdüğü SEM analizlerinde gözlenmiştir (Şekil 47, c).



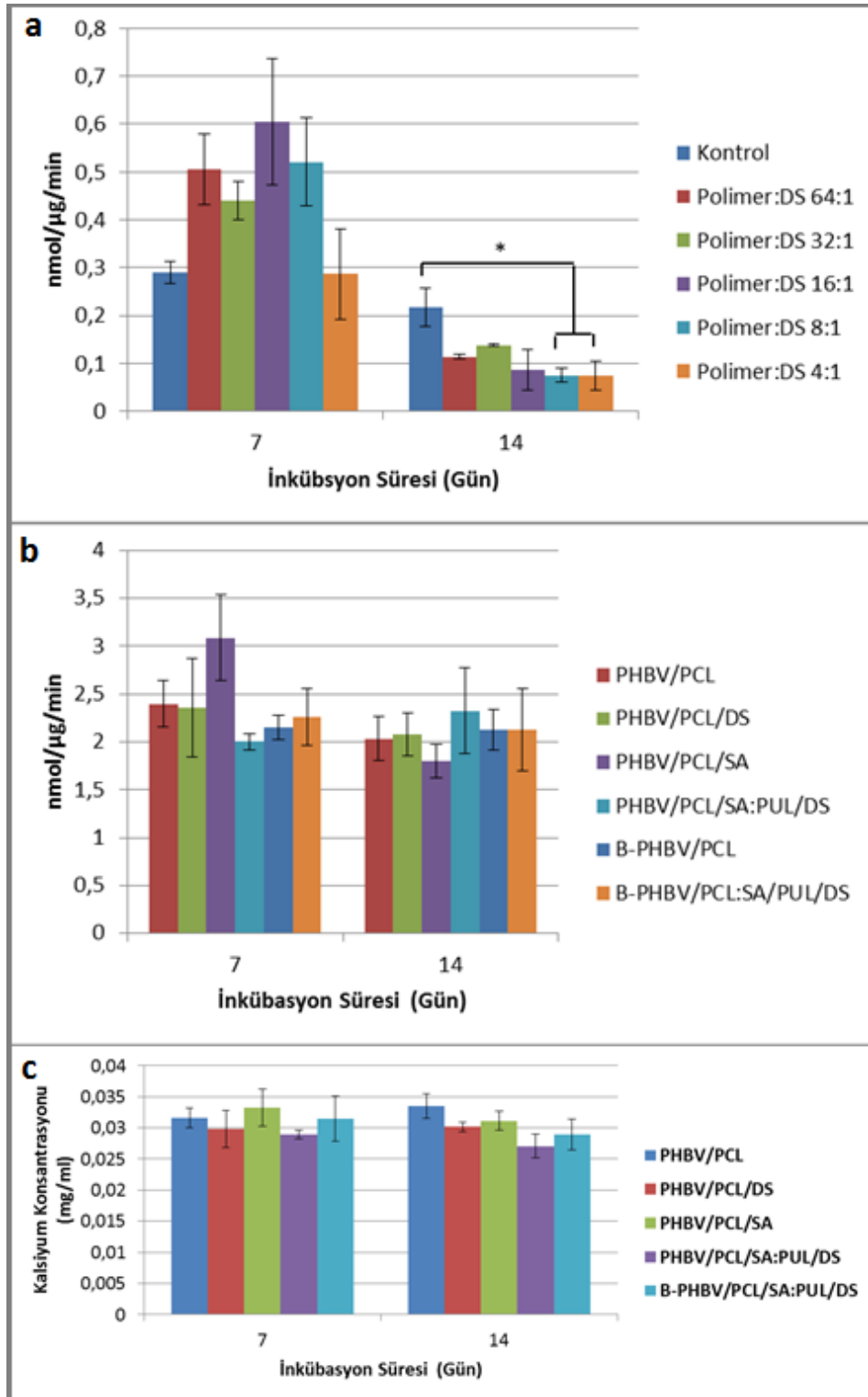
Şekil 46. Taşıyıcılar üzerinde 7 gün boyunca çoğaltıldıktan sonra sabitlemeye tabi tutulan hücrelerin SEM ile alınmış görüntüleri. Taşıyıcı grupları, (a) PHBV/PCL, (b) PHBV/PCL/DS, (c) PHBV/PCL/SA ve (d) PHBV/PCL/SA:PUL/DS. Görüntülerdeki ölçek çubuğu 40 µm'dir.



Şekil 47. B-PHBV/PCL (a ve b) ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS (c ve d) gruplarının üzerinde 7 gün boyunca çoğalan Saos-2 hücrelerinin SEM görüntüleri. (Oklar: Fiber üzerindeki hücreler). Görüntülerdeki ölçek çubuğu 20 µm'dir.

4.10.3 Taşıyıcılar Üzerinde Hücre Farklılaşması Analizleri ile İlgili Bulgular

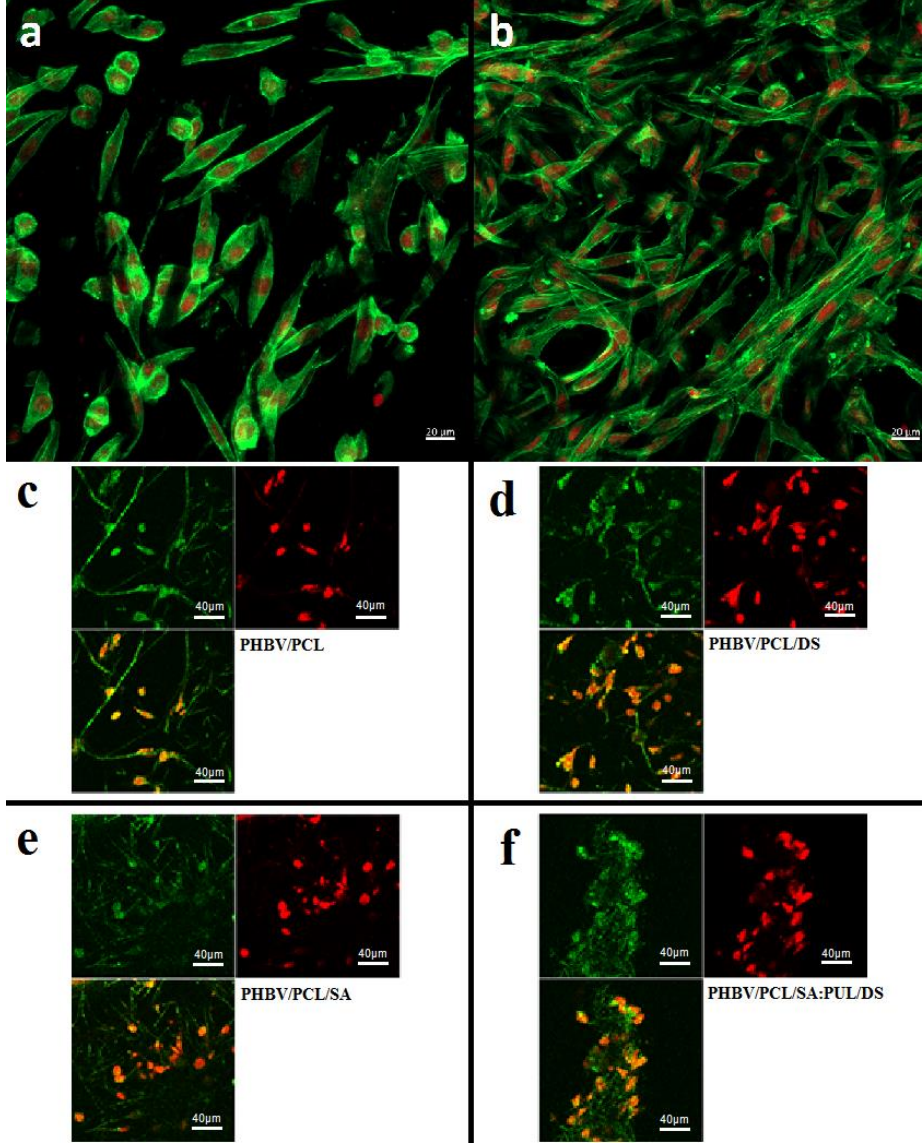
ALP aktivitesini arttırmak için gereken optimum DS dozu, farklı miktarlarda DS içeren PHBV/PCL taşıyıcılar üreterek ve taşıyıcılar üzerinde büyütülen Saos-2 hücrelerinin ALP aktivitesi incelenerek araştırılmıştır (Şekil 48, a). İnkübasyonun 7. gününde, 64:1, 32:1, 16:1 ve 8:1 PHBV/PCL:DS oranında DS içeren taşıyıcılar kontrol grubuna göre daha yüksek ALP aktivitesi göstermiştir. Bu sonuç gözönüne alınarak, taşıyıcılarda orijinal olarak seçilen 20:1 PHBV/PCL:DS oranı ile ALP aktivitesi deneylerine devam edilmesi kararlaştırılmıştır. Şekil 48, b'de taşıyıcılara ekilen Saos-2 hücrelerinin 7. ve 14. gündeki ALP aktivitesi gösterilmektedir. İnkübasyonun 7. gününde SA yüklü PHBV/PCL/SA grubu diğer taşıyıcılara göre daha yüksek ALP aktivitesi göstermiştir. Ancak 14 gün sonunda tüm taşıyıcı gruplar benzer oranda ALP aktivitesi göstermiştir. Tamburaci ve Tihminlioglu (2017; 2018) çalışmasında, kitosan zarlar üzerine ekilmiş Saos-2 hücreleriyle yapılan ALP deneyinde benzer sonuçlar bulunmuş, diatomit içeren gruplar diğer gruplara göre ALP aktivitesini arttırmamıştır, ancak geçikmiş olarak, 21 gün sonunda ALP aktivitesinde gelişme belirtilmiştir (Tamburaci ve Tihminlioglu, 2017; 2018). Diatomit içeren gruplardaki ALP aktivitesi artışı, diatomit yapısında bulunan silikona ve diğer azınlık olarak bulunan elementlere bağlı olarak osteoblastik aktivitenin artmasıyla açıklanmış ve doğal kemik yapısında da azınlık olarak bulunan elementler olduğu için doğal dokuyu taklit etmesi vurgulanmıştır (Lopez-Alvarez vd., 2009). ALP aktivitesi testi ile birlikte taşıyıcıların hücre içi kalsiyum miktarları kalsiyum tayini ile incelenmiştir. Taşıyıcılar üzerinde inkübe edilen Saos-2 hücrelerinin ALP testi sonrası hücre içi kalsiyum miktarları karşılaştırıldığında ALP testi sonuçlarına paralel sonuçlar elde edilmiş, taşıyıcı gruplardaki hücre içi kalsiyum miktarları arasında bir fark görülmemiştir.



Şekil 48. Farklı konsantrasyonda DS içeren PHBV/PCL taşıyıcıların ve kontrol grubu olarak taşıyıcı olmadan çoğaltılan Saos-2 hücrelerin 7 ve 14 günlük inkübasyon sonucunda ALP aktiviteleri (a). Taşıyıcı:DS oranı 20:1 olan veya DS içermeyen farklı kompozisyonlardaki hücre taşıyıcı grupların inkübasyon sonucunda ALP aktiviteleri (b). ALP aktivite deneyi sonucunda taşıyıcı:DS oranı 20:1 olan farklı kompozisyonlardaki hücre taşıyıcı gruplarda Sao-2 hücrelerinin hücre içi kalsiyum miktarları (c).

4.10.4 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu ile Hücre Morfolojisi ve Dağılımı Analizi Sonuçları

PHBV/PCL, PHBV/PCL/DS, PHBV/PCL/SA ve PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcılar üzerindeki Saos-2 hücreleri dağılımı ve morfolojisi lazer taramalı konfokal mikroskobu ile görüntülenmiştir (Şekil 49). Bu görüntüleme sonucunda PHBV/PCL ve PHBV/PCL/SA grubunda hücre yoğunluğunun az olduğu gözlenmiştir (Şekil 49, c ve e). DS eklenen PHBV/PCL/DS ve birlikte elektroğrılmış PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcılarda hücre yoğunluğunun daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 49, d ve f). Bakteriyel PHBV kullanılarak üretilen B-PHBV/PCL (Şekil 49, a) ve B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS (Şekil 49, b) taşıyıcı gruplarına ekilen hücrelerin 7 gün sonrasında lazer taramalı konfokal mikroskobu ile taşıyıcı üzerindeki dağılımı ve morfolojisi incelenmiştir. B-PHBV/PCL taşıyıcısındaki hücrelerin bir kısmı daha geniş alana yayılmışken bir kısmı yuvarlak morfolojiye sahiptir. Hücrelerin yuvarlak morfolojiye yakın olması buldukları ortamla yeterince etkileşimde bulunamadıklarını ve sağlıklı bir şekilde yayılamadıklarını gösterir. Bu durum B-PHBV/PCL taşıyıcısındaki fiberlerin hidrofobik karakterinden kaynaklanmıştır. B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcıda çoğalan hücrelerin morfolojisi incelendiğinde, hücrelerin tamamının taşıyıcı yüzeyinde, fiberler üzerinde yayıldıkları ve filopodya uzantılarının bulunduğu görülmektedir. Sağlıklı bir morfolojiye sahip bu hücrelerin bazı yerlerde taşıyıcısındaki fiberler doğrultusunda yönlendiği görülmektedir. Birlikte elektroğrılmış B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcıların PUL fiberleri yapıya hidrofilik özellik katarak hücre tutunmasını ve yayılmasını arttırmıştır. Bu taşıyıcı grupların yapısındaki bakteriden sentezlenen PHBV'nin hücreler üzerinde negatif bir etkiye sahip olmadığı ve hücre canlılığını desteklediği görülmüştür.



Şekil 49. B-PHBV/PCL (a), B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS (b), PHBV/PCL (c), PHBV/PCL/DS (d), PHBV/PCL/SA (e) ve PHBV/PCL/SA:PUL/DS (f) taşıyıcılar üzerinde 7 gün boyunca çoğaltılan Saos-2 hücrelerinin lazer taramalı konfokal mikroskobu görüntüleri. (a ve b) Tespit işlemi sonrasında hücre sitoplazmaları FTIC (Yeşil) ve çekirdekleri DraQ5 (Kırmızı) floresan boylarla işaretlenmiştir (CSLM, Leica DM2500, Almanya). (c-f) Tespit işlemi sonrasında hücre sitoplazmaları FTIC (Yeşil) ve çekirdekleri PI (Kırmızı) floresan boylarla işaretlenmiştir (Zeiss LSM 510, Almanya).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Projede, doğal olarak elde edilebilen malzemeler kullanılarak, birlikte elektroçirme sistemiyle, hidrofilik ve hidrofobik fiberlerden oluşan, üç boyutlu, kemik doku mühendisliğine yönelik yeni bir taşıyıcı geliştirilmiştir. Taşıyıcının hidrofobik fazı temelde PHBV fiberler ile

oluşturulup, az miktarda PCL ile desteklenirken, hidrofilik faz pullulan (PUL) fiberleri ile oluşturulmuş, PUL fiberlerinin içine diatom kabuk yapısı (DS), Hidrofobik fiber yapısına ise hidrofobik bir antibiyotik olan sefuroksim (SA) yüklenmiştir (PHBV/PCL/SA:PUL/DS).

Projenin başlangıcında, farklı kaynaklardan elde edilen DS'ler karşılaştırılmış ve DS'in saflaştırılması optimize edilmiştir. Fiberlerden daha büyük çapta olan DS'lerin polimer çözeltisi içerisinde fiberlere hapsolacak şekilde elektroğirilebileceği ön çalışmalarda kanıtlanmıştır. Projede DS'in farklı boyut ve konsantrasyonlardaki Saos-2 hücrelerine etkileri in vitro deneylerle incelenerek hücre canlılığını arttıran optimum DS konsantrasyonunun bütün haldeki DS'ler için 12 mg/ml olduğu belirlenmiştir.

Projede hedeflenen PHBV/PCL/SA:PUL/DS taşıyıcı başarılı bir şekilde birlikte elektroğirme yöntemiyle üretilmiştir. Taşıyıcıdaki hidrofilik PUL fiberler uzun bir optimizasyon süreci sonunda glutheraldehid ile çapraz bağlanabilmiş ve PUL fiberlerin şeklinin korunarak çapraz bağlanabilmesi için elektroğirme sırasında ve sonrasında uygulanan yeni bir glutheraldehid ile çapraz bağlama metodu geliştirilmiştir. Sunulan bu çapraz bağlama metodunun, literatürde sadece PUL içeren fiberler oluşturmayı amaçlayan çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Üretilen taşıyıcı karakterize edildiğinde, su içerisinde yavaş hızda bozunduğu, çok az su alarak yapısını koruduğu, kontrollü antibiyotik salımını desteklediği, 21 günlük inkübasyon sonucunda SA'nın sadece % 15-19'unun salındığı, içerdiği DS ve çift fiber yapısı sayesinde PHBV/PCL taşıyıcılara kıyasla 6-8 kat daha yüksek basma dayanımı gösterdiği görülmüştür. Bu projede taşıyıcıdan sadece hidrofobik yapıda olan bir antibiyotik salımı çalışılmıştır. İleriki çalışmalarda hidrofilik PUL fiberlerden, hidrofilik bir antibiyotiğin salımının çalışılması ve salım kinetiğinin karşılaştırılması önerilmektedir. Ayrıca geliştirilen sistemin antibiyotik dışında başka ilaç veya biyoetken ajanların da (hormon, büyüme faktörü, anjiyotensin vb.) fiber yapılara veya DS bileşene yüklenerek lokal kontrollü salım sistemi olarak araştırılmasıyla çeşitlik kemik doku hasar/hastalıkları için yeni araştırmalar veya tedavi yaklaşımları tasarlanabilecektir.

Proje kapsamında PHBV üretimi *Cupriavidus necator* (DSMZ 428) bakteri suşu kullanılarak başarıyla gerçekleştirilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda PHBV kopolimeri yapısındaki valerat yüzdesi istenilen aralığa gelecek şekilde üretim yapılabilirdiği gösterilmiştir. Bakteri suşu ile üretilen PHBV ile hücre taşıyıcı üretilip (B-PHBV/PCL/SA:PUL/DS) optimize edilerek, karakterize edilmiş ve diğer gruplar ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen benzer sonuçlarla bu değerli ve yurt dışından yüksek maliyetle alınan polimerin benzeri, hatta daha kaliteli bir formunun istenilen kopolimer kompozisyonunda üretiminin Ülkemizde yapılabileceği gösterilmiştir. Üretilen taşıyıcılar in vitro testlere tabi tutulduğunda, alamar mavisini hücre canlılık testinde DS kabukları yüklü taşıyıcıların daha yüksek hücre canlılığına

sahip olduğu görülmüştür. Taşıyıcıya yüklenen DS kabukları, Saos-2 hücrelerinin çoğalmasını arttırmıştır. Taşıyıcıların L929 fibroblast ile yapılan hücre canlılığı testinde hücre canlılığını desteklediği ve taşıyıcının biyoyumlu olduğu görülmüş. Birlikte elektroğirme ile üretilen taşıyıcı, kontrol gruplarına göre daha yüksek hücre canlılığı desteklemiştir ve bu geliştirilen taşıyıcının başarısını kanıtlamaktadır. Bu bulgular taşıyıcı üzerinde çoğaltılan hücrelerin morfolojilerinin ve dağılımlarının, SEM ve konfokal mikroskobu görüntülemeleriyle de desteklenmiştir.

Temelde doğal malzemeler ile üretilen bu taşıyıcının kemik doku mühendisliği alanında kullanımının gelecek vaatettiği düşünölmektedir. Doğal olarak simetrik bir geometriye ve mikro-nano gözenekliliğe sahip diatomlar gözenekleri sayesinde lokal ilaç salım sistemlerinde ilaç taşıyıcı, güçlü mekanik dayanımları sayesinde kemik doku hücre taşıyıcıları yapılarında kullanılabilieceği düşünölmektedir. DS'ler ile kemiğin doğal inorganik fazı olan hidroksiapatit karıştırılarak, DS'lerin silika yapısı sayesinde hidroksiapatitin biyoaktivitesinin artırılması biyomalzeme alanında yenir hedef oluşturabilecek niteliktedir. DS-hidroksiapatit malzemelerden kemik çimentosu, implant yüzey kaplaması gibi ürünler oluşturulabilme potansiyeli bulunmaktadır. Projede in vitro olarak test edilen ve başarılı sonuçlar elde edilen taşıyıcı formülasyonları ile bir sonraki adım olarak in vivo deneylerde kemik regenerasyonu çalışılabileceği değerlendirilmektedir.

6. KAYNAKÇA

- Abed, A., Assoul, N., Ba, M., Derkaoui, S. M., Portes, P., Louedec, L., Flaud, P., Bataille, I., Letourneur, D., Meddahi-Pellé, A. 2011. "Influence of polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based hydrogels", Journal of biomedical materials research. Part A, 96(3), 535–42.
- Aw, M. S., Simovic, S., Addai-Mensah, J., Losic, D. 2011. "Silica microcapsules from diatoms as new carrier for delivery of therapeutics", Nanomedicine, 6, 1159–173.
- Bai, J., Dai, J., Li, G. 2015. "Electrospun composites of PHBV/pearl powder for bone repairing", Progress in natural science: materials international, 25(4), 327-333.
- Barboza, F. M., Machado, W. M., Junior, O., Renato, L., Padilha de Paula, J., Zawadzki, S. F., Farago, P. V. 2014. "PCL/PHBV microparticles as innovative carriers for oral controlled release of manidipine dihydrochloride", The Scientific World Journal, Volume 2014, 1-10.
- Bariana, M., Aw, M. S., Kurkuri, M., Losic, D. 2013. "Tuning drug loading and release properties of diatom silica microparticles by surface modifications", International Journal of Pharmaceutics, 443(1-2), 230–41.
- Berezina, N. 2012. "Enhancing the 3-hydroxyvalerate component in bioplastic PHBV production by *Cupriavidus necator*", Biotechnology journal, 7(2), 304-309.

Bharti, C., Nagaich, U., Pal, A. K., Gulati, N. 2015. "Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: a review", *International journal of pharmaceutical investigation*, 5(3), 124.

Bhattacharyya, A., Pramanik, A., Maji, S. K., Haldar, S., Mukhopadhyay, U. K., Mukherjee, J. 9 Jul. 2012. "Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*", *AMB Express*, 2.

Bianco, A., Calderone, M., Cacciotti, I. 2013. "Electrospun PHBV/PEO co-solution blends: Microstructure, thermal and mechanical properties", *Materials Science and Engineering: C*, 33(3), 1067-77.

Bismuto, A., Setaro, A., Maddalena, P., De Stefano, L., De Stefano, M. 2008. "Marine diatoms as optical chemical sensors: A time-resolved study". *Sensors and Actuators B: Chemical*, 130(1), 396-399.

Blackwood, K., McKean, R., Canton, I., Freeman, C., Franklin, K., Cole, A., Brook, I., Farthing, P., Rimmer, S., Haycock, J., Ryan, A., MacNeil, S. 2008. "Development of biodegradable electrospun scaffolds for dermal replacement", *Biomaterials*, 29, 3091-104.

Brunella, V., Jadhav, S. A., Miletto, I., Berlier, G., Ugazio, E., Sapino, S., Scalarone, D. 2016. "Hybrid drug carriers with temperature-controlled on-off release: A simple and reliable synthesis of pnipam-functionalized mesoporous silica nanoparticles", *Reactive and Functional Polymers*, 98, 31-37.

Butler, K. S., Durfee, P. N., Theron, C., Ashley, C. E., Carnes, E. C., Brinker, C. J. 2016. "Protocells: Modular Mesoporous Silica Nanoparticle-Supported Lipid Bilayers for Drug Delivery", *Small*, 12(16), 2173-2185.

Canton, I., McKean, R., Charnley, M., Blackwood, K., Fiorica, C., Ryan, A., MacNeil, S. 2010. "Development of an Ibuprofen-releasing biodegradable PLA/PGA electrospun scaffold for tissue regeneration", *Biotechnology and Bioengineering*, 105, 396-408.

Chen, C.-T., Chen, K.-I., Chiang, H.-H., Chen, Y.-K. Cheng, K.-C. 2017. "Improvement on Physical Properties of Pullulan Films by Novel Cross-Linking Strategy", *Journal of Food Science*, 82 (1), 108–117.

Cheng, K. C., Demirci, A., Catchmark, J. M. 2011. "Pullulan: Biosynthesis, production, and applications", *Appl Microbiol Biotechnol*, 92(1), 29-44.

Conley, D. J., Kilham, S. S., Theriot, E. 1989. "Differences in silica content between marine and freshwater diatoms", *Limnol Oceanogr*, 34(1), 205-13.

De Stefano, L., Rotiroti, L., De Stefano, M., Lamberti, A., Lettieri, S., Setaro, A., Maddalena, P. 2009. "Marine diatoms as optical biosensors". *Biosensors and Bioelectronics*, 24(6), 1580-1584.

Del Gaudio, C., Bianco, A., Folin, M., Baiguera, S., Grigioni, M. 2009. "Structural characterization and cell response evaluation of electrospun PCL membranes: micrometric

versus submicrometric fibers”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 89(4), 1028-1039.

Dimas, L., Buehler, M. 2011. “Hierarchical Mechanics of Diatom Algae: From Atoms to Organism and Weakness to Strength”, *Imechanica.Org*, 2, 7–11.

Díez-Pascual, A. M., Díez-Vicente, A. L. 2014. “ZnO-reinforced poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) bionanocomposites with antimicrobial function for food packaging”, *ACS applied materials & interfaces*, 6(12), 9822-34.

Dolatabadi, J. E. N., de la Guardia, M. 2011. “Applications of diatoms and silica nanotechnology in biosensing, drug and gene delivery, and formation of complex metal nanostructures”, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30(9), 1538–48.

El-Sayed, A. A., Abdelhady, H. M., Abdel Hafez, A. M., Khodair, T. A. 2009. “Batch production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Ralstonia eutropha* and *Alcaligenes latus* using bioreactor different culture strategies”, *J Appl Sci Res*, 5(5), 556-564.

Farago, P. V., Raffin, R. P., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., Zawadzki, S. F. 2008. “Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique”, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(7), 1298-305.

Faull, K. “Diatoms: tiny creatures telling us a big climate change story”. *Sciengist*. <http://www.sciengist.com/diatoms-tiny-creatures-telling-us-a-big-climate-change-story/>
Son erişim tarihi: 17 Ağustos 2015.

Ferreira, L. M., Velasquez, A. D. A., Schaffazick, S. R., Cruz, L. 2015. “Pullulan: an advantageous natural polysaccharide excipient to formulate tablets of alendronate-loaded microparticles” *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(1), 27-33.

Finn, A., Straugun, A., Meyer, M., Chubb, J. 1987. “Effect of dose and food on the bioavailability of ceforoxime axetil”, *Biopharm. Drug Dispos.*, 8, 519-26.

Fricain, J. C., Schlaubitz, S., Le Visage, C., Arnault, I., Derkaoui, S. M., Siadous, R., Catros, S., Lalande, C., Bareille, R., Renardb, M., Fabre, T., Cornet, S., Durand, M., Léonard, A., Sahraoui, N., Letourneur, D., Amédée, J. 2013. “A nano-hydroxyapatite - pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, 34(12), 2947–59.

Greczynski, G., Hultman, L. 2017. “C 1s peak of adventitious carbon aligns to the vacuum level: dire consequences for Material's bonding assignment by photoelectron spectroscopy”, *ChemPhysChem*, 18(12), 1507-1512.

Güngörmedi, G., Demirbilek, M., Mutlu, M. B., Denkbaş, E. B., Cabuk, A. 2014. “Polyhydroxybutyrate and hydroxyvalerate production by *Bacillus megaterium* strain A1 isolated from hydrocarbon-contaminated soil”, *Journal of Applied Polymer Science*, 131(15).

- Imerson, A. 2010. "Food stabilisers, thickeners and gelling agents", *FMC BioPolymer*, 14(2), 266-73.
- Islam, M. S., Akter, N., Karim, M. R. 2010. "Preparation of superhydrophobic membranes by electrospinning of fluorinated silane functionalized pullulan", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 362(1-3), 117-20.
- Jamali, A. A., Akbari, F., Ghoraklu, M. M., de la Guardia, M., Khosroushahi, A. Y. 2012. "Applications of diatoms as potential microalgae in nanobiotechnology", *BioImpacts*, 2(2), 83–9.
- Jugdaohsingh, R. 2007. "Silicon and bone health", *The journal of nutrition, health & aging*, 11(2), 99–110.
- Kim, E.-J., Bu, S.-Y., Sung, M.-K., Choi, M.-K. 2013. "Effects of Silicon on Osteoblast Activity and Bone Mineralization of MC3T3-E1 Cells", *Biological trace element research*, 152(1), 105-12.
- Kouhi, M., Fathi, M., Prabhakaran, M. P., Shamanian, M., Ramakrishna, S. 2018. "Poly L lysine-modified PHBV based nanofibrous scaffolds for bone cell mineralization and osteogenic differentiation", *Applied Surface Science*, 457, 616-625.
- Lalande, C., Miraux, S., Derkaoui, S. M., Mornet, S., Bareille, R., Fricain, J. C., Franconi, J. M., Le Visage, C., Letourneur, D., Amédée, J., Bouzier-Sore, A. K. 2011. "Magnetic resonance imaging tracking of human adipose derived stromal cells within three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering", *European cells & materials*, 21, 341-54.
- Le, T. D. H., Bonani, W., Speranza, G., Sglavo, V., Ceccato, R., Maniglio, D., Motta, A., Migliaresi, C. 2016. "Processing and characterization of diatom nanoparticles and microparticles as potential source of silicon for bone tissue engineering", *Materials Science and Engineering: C*, 59, 471-479.
- Le, T. D. H., Liaudanskaya, V. Bonani, W., Migliaresi, C., Motta, A. 2018. "Enhancing bioactive properties of silk fibroin with diatom particles for bone tissue engineering applications", *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 12, 89-97.
- Lim, Y.M., Gwon, H.J., Jeun J.P., Nho, Y.C., 2010. "Preparation of Cellulose-based Nanofibers Using Electrospinning", *Nanofibers*, (9), 179-88.
- Liu, H., Pancholi, M., Stubbs, J., Raghavan, D. 2010. "Influence of hydroxyvalerate composition of polyhydroxy butyrate valerate (PHBV) copolymer on bone cell viability and in vitro degradation", *J. Appl. Polym. Sci.*, 116, 3225–31.
- Loh, Q. L., Choong, C. 2013. "Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size", *Tissue Eng Part B Rev.*, 19, 485–502.
- López-Álvarez, M., Solla, E. L., González, P., Serra, J., León, B., Marques, a. P., Reis, R. L. 2009. "Silicon-hydroxyapatite bioactive coatings (Si-HA) from diatomaceous earth and silica.

Study of adhesion and proliferation of osteoblast-like cells”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 1131–6.

Lu, Q., Han, J., Zhou, L., Zhou, J., Xiang, H. 2008. “Genetic and biochemical characterization of the poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthase in *Haloferax mediterranei*”, *Journal of bacteriology*, 190(12), 4173-80.

Lü, L.-X., Wang, Y.-Y., Mao, X., Xiao, Z.-D., Huang, N.-P. 2012. “The effects of PHBV electrospun fibers with different diameters and orientations on growth behavior of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells”, *Biomedical Materials*, 7, 1-10.

Ma, J., He, X., Jabbari, E. 2011. “Osteogenic differentiation of marrow stromal cells on random and aligned electrospun poly(L-lactide) nanofibers”, *Annals of biomedical engineering*, 39(1), 14–25.

Meijer, G. J., De Bruijn, J. D., Koole, R., Van Blitterswijk, C. A. 2007. “Cell-based bone tissue engineering”, *PLoS Medicine*, 4(2), 0260–4.

Meng, W., Kim, S.-Y., Yuan, J., Kim, J. C., Kwon, O. H., Kawazoe, N., Chen, G., Ito, Y., Kang, I.-K. 2007. “Electrospun PHBV/collagen composite nanofibrous scaffolds for tissue engineering”, *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 18(March 2015), 81–94.

Mishra, B., Vuppu, S., Rath, K. 2011. “The role of microbial pullulan, a biopolymer in pharmaceutical approaches: A review”, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(6), 45-50.

Nair, M. B., Baranwal, G., Vijayan, P., Keyan, K. S., Jayakumar, R. 2015. “Composite hydrogel of chitosan–poly (hydroxybutyrate-co-valerate) with chondroitin sulfate nanoparticles for nucleus pulposus tissue engineering”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 84-92.

Nandi, S. K., Kundu, B., Mukherjee, P., Mandal, T. K., Datta, S., De, D. K., Basu, D. 2009. “In vitro and in vivo release of cefuroxime axetil from bioactive glass as an implantable delivery system in experimental osteomyelitis”, *Ceramics International*, 35(8), 3207-16.

Nandi, S. K., Kundu, B., Ghosh, S. K., Mandal, T. K., Datta, S., De, D. K., Basu, D. 2009. “Cefuroxime-impregnated calcium phosphates as an implantable delivery system in experimental osteomyelitis”, *Ceramics International*, 35(4), 1367-76.

Nassif, N., Livage, J. 2011. “From diatoms to silica-based biohybrids”, *Chemical Society Reviews*, 40(2), 849–59.

PDR, Prescribers Digital Reference. “Cefuroxime axetil - Drug Summary”. <https://www.pdr.net/drug-summary/Ceftin-cefuroxime-axetil-180>

Son erişim tarihi: 05.02.2019.

Raşoga, O., Sima, L., Chirişoiu, M., Popescu-Pelin, G., Fufă, O., Grumezescu, V., Socol, G. 2017. “Biocomposite coatings based on Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-

hydroxyvalerate)/calcium phosphates obtained by MAPLE for bone tissue engineering”, *Applied Surface Science*, 417, 204-12.

Rambo, C. R., Costa, C. M., Carminatti, C. a., Recouvreux, D. O. S., D’Acampora, A. J., Porto, L. M. 2012. “Osteointegration of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) scaffolds incorporated with violacein”, *Materials Science and Engineering C*, 32(2), 385–9.

Sajesh, K. M., Kiran, K., Nair, S. V., Jayakumar, R. 2016. “Sequential layer-by-layer electrospinning of nano SrCO₃/PRP loaded PHBV fibrous scaffold for bone tissue engineering”, *Composites Part B: Engineering*, 99, 445-452.

Samorezov, J. E., Alsberg, E. 2015. “Spatial regulation of controlled bioactive factor delivery for bone tissue engineering”, *Advanced drug delivery reviews*, 84, 45-67.

Scott, J.L., Ormrod, D., Goa, K.L. 2001. “Ceforoxime Axetil, an updated review of its use in the management of bacterial infections”, *Drugs*, 61, 1455-500.

Shishatskaya E. I., Volova T. G. 2004, “A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for in vitro cell cultures”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 15, 915-23.

Singh, S., Mohanty, A. K., Sugie, T., Takai, Y., Hamada, H. 2008. “Renewable resource based biocomposites from natural fiber and polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) bioplastic”, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 39(5), 875-86.

Simovic, S., Ghouchi-Eskandar, N., Moom Sinn, A., Losic, D., 2011. “Silica Materials in Drug Delivery Applications”, *Current Drug Discovery Technologies*, 8,(3), 250-68.

Sombatmankhong, K., Sanchavanakit, N., Pavasant, P., Supaphol, P. 2007. “Bone scaffolds from electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and their blend”, *Polymer*, 48, 1419–27.

Song, H. H., Yoo, M. K., Moon, H. S., Choi, Y. J., Lee, H. C., Cho, C. S. 2007. “A novel polycaprolactone/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering”, In *Key Engineering Materials*, 342, 265-8.

Špoljarić, I. V., Lopar, M., Koller, M., Muhr, A., Salerno, A., Reiterer, A., Malli, K., Angerer, H., Strohmeier, K., Schober, S., Mittelbach, M., Horvat, P. 2013. “Mathematical modeling of poly [(R)-3-hydroxyalkanoate] synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 on substrates stemming from biodiesel production”, *Bioresource technology*, 133, 482-494.

Stijnman, A.C., Bodnar, I., Tromp, R.H. 2011. “Electrospinning of food-grade polysaccharides”, *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1393-8.

Suroy, M., Boutorh, J., Moriceau, B., Goutx M. 2014. “Fatty acids associated to frustule of diatoms and their fate during degradation—a case study in *Thalassiosira weissflogii*”, *Deep-Sea Res. I*, 86, 21–31.

Suwantong, O., Waleetorncheepsawat, S., Sanchavanakit, N., Pavasant, P., Cheepsunthorn, P., Bunaprasert, T., Supaphol, P. 2007. “In vitro biocompatibility of electrospun poly(3-

hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fiber mats”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 217–23.

Svensson, A., Nicklasson, E., Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D. L., Brittberg, M., Gatenholm, P. 2005. “Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage”, *Biomaterials*, 26(4), 419-31.

Tamburaci, S., Tihminlioglu, F. 2017. “Diatomite reinforced chitosan composite membrane as potential scaffold for guided bone regeneration”, *Materials Science and Engineering: C*, 80, 222-31.

Tamburaci, S., Tihminlioglu, F. 2018. “Biosilica incorporated 3D porous scaffolds for bone tissue engineering applications”, *Materials Science and Engineering: C*, 91, 274-91.

Tao, J., Song, C., Cao, M., Hu, D., Liu, L., Liu, N., Wang, S. 2009. “Thermal properties and degradability of poly (propylene carbonate)/poly (β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate)(PPC/PHBV) blends”, *Polymer Degradation and Stability*, 94(4), 575-83.

Torun Köse, G., Korkusuz, F., Korkusuz, P., Purali, N., Özkul, a., Hasirci, V. 2003. “Bone generation on PHBV matrices: An in vitro study”, *Biomaterials*, 24(27), 4999–5007.

Uppal, R., Ramaswamy, G. N. 2011. “Cellulose Submicron Fibers”, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 6(4), 39-45.

Wagner, A., Poursorkhabi, V., Mohanty, A. K., Misra, M. 2014. “Analysis of Porous Electrospun Fibers from Poly (l-lactic acid)/Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Blends”, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(8), 1976-82.

Weng, Y. X., Wang, Y., Wang, X. L., Wang, Y. Z. 2010. “Biodegradation behavior of PHBV films in a pilot-scale composting condition” *Polymer Testing*, 29(5), 579-587.

Williamson, D. H., Wilkinson, J. F. 1958. “The isolation and estimation of poly hydroxylbutyrate inclusions of *Bacillus* species”, *J. Gen. Microbiol.*, 19, 198-209.

Wong, H. M., Chu, P. K., Leung, F. K., Cheung, K. M., Luk K. D., Yeung K. W. 2014. “Engineered polycaprolactone–magnesium hybrid biodegradable porous scaffold for bone tissue engineering”, *Prog. Nat. Sci-Mater.*, 24(5), 561-7.

Yaprakci, V., Erdemli, O., Kayabolen, A., Tezcaner, A., Bozkurt, F., Keskin, D. 2013. “In vitro/in vivo comparison of cefuroxime release from poly (ϵ -caprolactone)–calcium sulfate implants for osteomyelitis treatment”, *Biotechnology and applied biochemistry*, 60(6), 603-16.

Yoshimoto, H., Shin, Y. M., Terai, H., Vacanti, J. P. 2003. “A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, 24(12), 2077-2082.

Yu, H., Wooley, P. H., Yang, S. Y. 2009. “Biocompatibility of Poly- ϵ -caprolactone-hydroxyapatite composite on mouse bone marrow-derived osteoblasts and endothelial cells”, *Journal of orthopaedic surgery and research*, 4(1), 5.

Zhang, H., Shahbazi, M. A., Mäkilä, E. M., da Silva, T. H., Reis, R. L., Salonen, J. J., Hirvonena, J. T., Santos, H. A. 2013. "Diatom silica microparticles for sustained release and permeation enhancement following oral delivery of prednisone and mesalamine", *Biomaterials*, 34(36), 9210–9.

Zhang, X., Yang, H., Li, S., Qin, G., Yang, L. 2018. "Natural diatomite particles: Size-, dose- and shape-dependent cytotoxicity and reinforcing effect on injectable bone cement", *Journal of materials science & technology*, 34(6), 1044-53.

Zou, P., Liu, H., Li, Y., Huang, J., Dai, Y. 2016. "Surface dextran modified electrospun poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHBV) fibrous scaffold promotes the proliferation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells", *Materials Letters*, 179, 109-113.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. DİLEK KESKİN
Proje No:	215M893
Proje Başlığı:	Diatom Silika İskeletleri İle Güçlendirilmiş Polihidroksibütrat-Kohidroksivalerat/Pullulan Üç Boyutlu Doku İskelelerinin Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	30
Araştırmacılar:	AYTEN KARATAŞ, AYŞEN TEZCANER
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. MÜHENDİSLİK F. MÜHENDİSLİK BİLİMLERİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/05/2016 - 01/11/2018
Onaylanan Bütçe:	462681.0
Harcanan Bütçe:	340783.38
Öz:	<p>Kemik dokusu kayıplarının tedavisinde kullanılan greft yaklaşımlarında donör kısıtlılığı, bulaşıcı hastalık ve immün reaksiyon riski ile karşılaşmaktadır. Doku mühendisliği amacıyla geliştirilen hücre taşıyıcıları bu sorunların önüne geçmektedir. Projede, kemik doku rejenerasyonunu destekleyecek, temelde doğal malzemelerden oluşan üç boyutlu yeni bir taşıyıcı geliştirilmiştir. Birlikte elektroçirme yöntemiyle hazırlanan taşıyıcının birinci fiber yapısı temelde bakteriden üretilen Poli(3-hidroksibütrat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV) ve yapıyı desteklemek için az miktarda Polikaprolakton (PCL) polimerinden, ikinci fiber ise pullulan (PUL) polimeri ve tek-hücreli bir alg olan diatomun silika kabuklarından (DS) oluşmaktadır. DS parçacıkları taşıyıcıya eklenmeden önce saflaştırılmış, hücre canlılığını destekleyen konsantrasyon ve boyut özellikleri belirlenmiş ve elektroçirme sırasında fiberler içerisine başarıyla hapsedilebildiği gösterilmiştir. Projede öncelikle ticari olarak satın alınan (yurt dışı kaynaklı) PHBV ile taşıyıcının hazırlanma koşulları ve özellikleri araştırılmış, daha sonra proje kapsamında Cupriavidus necator bakterisi suşundan PHBV üretimi ve valerat yüzdesi optimize edilip bu polimerle taşıyıcılar hazırlanmış ve özellikleri karşılaştırılmıştır. İki fiberli hücre taşıyıcı yapı olarak PHBV/PCL/SA:PUL/DS grubu üretilmiş ve PUL fiberlerinin elektroçirme sırasında çapraz bağlanması için yeni bir yöntem sunulmuştur. Projede ayrıca, Sefuroksim aksetil (SA) antibiyotigi, hidrofobik olan PHBV fiberlerine elektroçirme sırasında hapsedilmiştir. Geliştirilen bu yeni taşıyıcının yavaş hızda bozunduğu, çok az su alarak yapısını koruduğu, kontrollü antibiyotik salımını desteklediği, içerdiği DS ve çift fiber yapısı sayesinde daha yüksek basma dayanımına sahip olduğu görülmüştür. Saos-2 hücreleriyle yapılan in vitro deneylerde DS içeren grupların daha yüksek hücre canlılığı sağladığı ve L929 hücreleri ile yapılan deneylerde hidrofilik PUL fiberleri varlığı sayesinde birlikte elektroçirilmiş taşıyıcıların canlılığı daha iyi desteklediği sonucu elde edilmiştir. SEM ve lazer taramalı konfokal mikroskopu analizlerinde, hücrelerin taşıyıcı içinde yayıldığı, sağlıklı morfolojide olduğu görülmüştür. Projede üretilen PHBV ile hazırlanan taşıyıcılar aynı karakterizasyon aşamalarına tabi tutulmuştur ve hücre canlılığını aynı şekilde desteklediği görülmüştür. Projede, kemik doku kayıplarının tedavisi için ürüne dönüşme potansiyeli bulunan ve tüm malzemeleri ülkemiz kaynaklarından elde edilebilecek veya üretilebilecek yeni bir 3 boyutlu hücre taşıyıcı geliştirilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Diatom silika iskeleti, PHBV, Pullulan, PCL, Birlikte Elektroçirme, Hücre Taşıyıcı
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- PHBV Based Bone Tissue Engineering Scaffolds Doped with Diatom Shells (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 2- Cefuroxime Axetil Loaded PHBV/PCL Electrospun Scaffolds for Bone Tissue Engineering (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 3- Diatom Silika Kabuk Katkılı PHBV/PCL-Pullulan Taşıyıcıların Kemik Doku Mühendisliğine Uygunluğunun Araştırılması (Bildiri - Ulusal Bildiri - Poster Sunum),