T.C.

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİBROİN ESASLI DOKU İSKELELERİNİN ÜRETİMİNDE KULLANILAN FİZİKSEL ŞARTLARIN OLUŞAN YAPI ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Gülbahar KIDIMAN

Danışman	**Dr. Öğr. Üyesi Nuray EMİN**
Jüri Üyesi	**Prof. Dr. Meltem ÇELİK**
Jüri Üyesi	**Dr. Öğr. Üyesi Senem YETGİN**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MALZEME BİLİMİ ve MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

KASTAMONU – 2019

TEZ ONAYI

Gülbahar KIDIMAN tarafından hazırlanan "**Fibroin Esaslı Doku İskelelerinin Üretiminde Kullanılan Fiziksel Şartların Oluşan Yapı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve **oy birliği** ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Ana Bilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Dr. Öğr. ÜyesiNuray EMİN Kastamonu Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Meltem ÇELİK Ankara Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Senem YETGİN Kastamonu Üniversitesi	

16/01/2019

Enstitü Müdürü Prof. Dr. Hasbi YAPRAK .....

TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.

İmza

Gülbahar KIDIMAN



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FİBROİN ESASLI DOKU İSKELELERİNİN ÜRETİMİNDE KULLANILAN FİZİKSEL ŞARTLARIN OLUŞAN YAPI ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Gülbahar KIDIMAN
Kastamonu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nuray EMİN

İpek fibroini, doğal yapılı bir biyopolimer olup, biyouyumluluk, biyobozunurluk, biyoinertlik gibi özelliklerinin yanı sıra doğal yara iyileştirici etkiye sahip olması nedeniyle, doku mühendisliği çalışmalarında biyomalzeme olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Fibroin yapısında bulunan antiparalel zincirlerden dolayı amfoterik özellik göstermektedir. Fibroinin farklı sıcaklık ve basınç seviyelerine farklı sürelerde maruz bırakılması da yapısında bulunan protein komplekslerini farklı şekillerde etkilemektedir. Bu değişimler fibroinle elde edilen doku iskelelerinin derişimlerini, gözeneklilik yapısını, mekanik mukavemetlerini, fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkilemektedir. Yürütülen tez çalışmasında ipek fibroinin amfoterik yapısı dikkate alınarak farklı pH değerlerinde hazırlanan akuajenik çözeltileri kullanılarak farklı basınç ve sıcaklık şartlarında doku iskeleleri üretilerek bunların, elde edilen yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri ile biyouyumluluğuna olan etkileri çeşitli analizler ile incelenmiştir. Biyouyumluluk analizleri kemik iliği mezenkial kök hücreleri kullanılarak MTT reaktifi kullanılarak kalitatif ve kantitatif olarak gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak farklı yöntemlerle üretilen iskelelerin biyouyumlu özellikte olduğu, bazı iskelelerin doku rejenerasyonuna destek olabilecek şekilde biyobozunma süresine sahip olduğu belirlenmiştir. SEM ve ışık mikroskobisi ile iskelelerin üretim yöntemlerine bağlı olarak farklı morfolojilere sahip olduğu, civalı porozimetre ölçümleri ile de toplam yüzey alanı ve gözenekliliklerinde önemli farklılıklar olduğu bulunmuştur. FTIR spektroskopisi incelemesi ile de orijinal fibroin yapısı spektrumlarından farklı olarak yapılan pH değişimleri, sıcaklık ve basınç etkileri sonucunda spesifik pikler gözlemlenmiştir. Termogravimetrik özelliklerinin üretim ve pH değişimlerine göre önemli derecede değişmediği tespit edilen iskelelerin, farklı fizikokimyasal şartlar altında üretiminden kaynaklı olarak kendi amfoterik yapısı sebebiyle çapraz bağlayıcılara ihtiyaç duyulmadan molekül içi çapraz bağlanmaların gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu sonuç hazırlanan iskeleleri doku mühendisliğinde daha yüksek biyouyumluluk ile yeni dokuların oluştrulmasında daha yüksek rejeneratif kapasitede işlev görebilecektir.

Anahtar Kelimeler: Doku iskelesi; pH Değişimi; sıcaklık etkisi; fibroin; amfoterik

2019, 124 sayfa
Bilim Kodu: 91

ABSTRACT

MSc. Thesis

DETERMINATION OF THE EFFECT OF PHYSICAL CONDITIONS USED IN THE PRODUCTION OF FIBROIN BASED TISSUE SCAFFOLDS ON THE FORMED STRUCTURE

Gülbahar KIDIMAN
Kastamonu University
Institute of Science and Technology
Department of Material Science and Engineering

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Nuray EMİN

Silk fibroin is a natural structure biopolymer and is preferred as a biomaterial in tissue engineering studies since it has a natural wound healing effect besides biocompatibility, biodegradability, bioinertivity. Fibroin structure shows an amphoteric due to antiparallel chains. Exposure of fibroin to different temperature and pressure levels at different times influences the protein complexes in the structure in different ways. These changes affect the concentration, porosity, mechanical strength, physical and chemical properties of tissue scaffolds obtained by fibroin. In the thesis study, by taking into consideration the amphoteric structure of silk fibroin, the different scales of pressure and temperature were used in different pH values. The scaffolds were produced and their effects on the physical and chemical properties and biocompatibility of the obtained structures were investigated with various analyzes. Biocompatibility analyzes were performed qualitatively and quantitatively by using MTT reagent by using bone marrow mezenkial stem cells. As a result, it was determined that the scaffolds produced by different methods have biocompatible properties and some scaffolds have biodegradation time to support tissue regeneration. It has been found that there are different morphologies depending on the production methods of scaffolds by SEM and light microscopy, and there are significant differences in total surface area and porosity with mercury porosimeter measurements. FTIR spectroscopy examination showed that no specific peaks were observed as a result of pH changes, temperature and pressure effects. Due to its amphoteric structure due to the production of thermogravimetric properties of scaffolds, which are determined to be not changed significantly according to production and pH changes, it has been determined that intra-molecule cross-linking occurs without the need of crosslinkers due to their ampHoteric structure. This result will serve to a higher regenerative capacity in the formation of new tissues with higher biocompatibility in tissue engineering of prepared scaffolds.

Key Words: Tissue Scaffold; pH Change; temperature effect; fibroin; amphoteric

2019, 124 pages
Science Code: 91

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin hazırlığında ve yürütülmesinde bilgileri ve deneyimi ile bana yol gösteren, laboratuvar ortamında yapılması gereken her deney ve aşamada gerekli imkânları sunarak yardımlarını esirgemeyen Danışman Hocam Dr. Öğr. Üyesi Nuray EMİN'e,

Laboratuvar çalışmaları sırasında desteğini esirgemeyen arkadaşım Salma Taher MOHAMMED'e, Buğrahan Ragaip KILINÇ'a, Canan ZORLU, Kıymet NURAL ile her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen kıymetli dostlarıma,

Doku Mühendisliği ve Biyomalzeme Laboratuvarı imkânlarını kullanmamda desteklerini esirgemeyen Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü'ne ve burada görevli değerli Hoca'larıma,

Bugünlere gelmemi sağlayan, her şartta maddi ve manevi destekleri ile bana güç veren sevgili Aileme,

Teşekkürlerimi Sunarım.

Gülbahar KIDIMAN
Kastamonu, Ocak, 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TAAHHÜTNAME ... iii
ÖZET ... iv
ABSTRACT ... v
TEŞEKKÜR ... vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ ... x
ŞEKİLLER DİZİNİ ... xi
TABLOLAR DİZİNİ ... xiv
1. GİRİŞ ... 1
1.1. Fibroinin Yapısı ve Kimyasal Özellikleri ... 2
1.1.2. Fibroinin Bombyx Mori İpek Böceğinden Elde Ediliş Yöntemleri ... 13
1.1.3. Fibroinin Doku Mühendisliğinde Kullanım Alanları ... 14
2. FİBROİNİN pH DEĞİŞİMLERİNE TEPKİSİ ... 17
2.1. Fibroinin Protein Yapısında Meydana Gelen Oluşumlar ve Fibroinin Amfoterik Özelliğinin Etkinliği ... 17
3. FİBROİNİN SICAKLIK DEĞİŞİMLERİNE TEPKİSİ ... 22
3.1. Fibroinin Protein Yapısında Meydana Gelen Farklılıklar ve Doku İskelesi Üretimi Üzerindeki Etkileri ... 22
3.2. Buharlı Otoklav Yöntemi ... 25
3.3. Kuru Hava Etüvlerinde Isıl Sterilizasyon ... 25
4. FİBROİNİN BASINÇ DEĞİŞİMLERİNE TEPKİSİ ... 31
4.1. Fibroinin Yapısında Meydana Gelen Farklılaşmalar ve Doku İskelesi Üretimi Üzerindeki Etkileri ... 31
5. MATERYAL ve METOD ... 33
5.1. Kimyasal ve Reaktifler ... 33
5.2. Deney Planı ... 34
5.3. Bombyx Mori İpek Böceği Kozasından Fibroin Eldesi ... 34
5.3.1. Bombyx Mori İpek Böceği Kozasından Serisinin Uzaklaştırılması ... 34
5.3.2. Fibroin Liflerinden Saf Fibroin Çözeltisinin Hazırlanması ... 35
5.3.2.1. *Ajisawa metodu ile fibroin çözeltisinin eldesi* ... 36
5.3.2.2. *Diyaliz işlemi* ... 38
5.4. Fibroin Çözeltilerinin Farklı pH'larda Ayarlanması ... 38
5.5. Fibroin İskelelerinin Üretim Yöntemleri ... 39
5.5.1. Liyofilizasyon ile 3B İskele Üretimi ... 40
5.5.2. Vakumlu Etüvde 3B İskele Üretimi ... 40
5.5.3. Fibroin İskelelerin Yapısına Sıcaklığın Etkisi ... 42
5.5.3.1. *Buharlı otoklav kullanımı* ... 42
5.5.3.1.1. *Liyofilizasyon işlemi sonrası otoklav kullanımı* ... 42

5.5.3.1.2. *Fibroin çözeltilerinin otoklavlanması sonrası liyofilizasyon* 44
5.5.4. Etüv-Sterilizatör İşlemleri 45
5.6. Biyouyumuluk Analizi 45
5.7. Biyobozunurluk Testi 46
6. ARAŞTIRMA BULGULARI 48
6.1. Işık Mikroskobisi İle Görüntüleme 48
6.2. Biyouyumluluk Testi: MTT (Mitokondriyal Dehidrojenaz Aktiviteleri) Analizi 53
6.3. Biyobozunurluk Süresi Tesbiti 56
6.4. Fourıer Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) Analizi 60
6.4.1. A Serisi Fibroin İskelelerin FTIR Grafikleri 60
6.4.2. B Serisi Fibroin İskelelerin FTIR Grafikleri 64
6.4.3. C Serisi Fibroin İskelelerin FTIR Grafikleri 67
6.4.4. F Serisi Fibroin İskelelerin FTIR Grafikleri 71
6.4.5. G Serisi Fibroin İskelelerin FTIR Grafikleri 74
6.5. Termogravimetrik Analiz (TGA) 79
6.6. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi 82
6.7. Civalı Porözimetre ile Yüzey Analizi 93
7. TARTIŞMA VE SONUÇ 97
7.1. Kullanılan Fizkokimyasal Şartların Fibroin İskelelerin Kimyasal Yapısı Üzerine Etkisi 98
7.1.1. Düşük Basınç ve Düşük Sıcaklık Şartlarının Fibroin İskelenin Yapısına Etkisi 98
7.1.2. Fizyolojik Sıcaklık ve Vakum Şartlarının Fibroin İskelenin Yapısına Etkisi 99
7.1.3. Düşük Basınç ve Sıcaklıkta Hazırlanan Fibroin İskelenin Kuru Halde Otoklav (121°C-Yüksek Buhar Basıncı) Muamelesinin Yapı Üzerine Etkisi 100
7.1.4. Düşük Basınç ve Sıcaklıkta Hazırlanan Fibroin İskelenin Kuru Halde Etüv Sterilizatör (180°C) Muamelesinin Yapı Üzerine Etkisi 101
7.1.5. Fibroin Çözeltisinin Otoklav (121°C-Yüksek Buhar Basıncı) Muamelesi Sonrası Standart Liyoflizasyon (-55°C-Vakum) ile Hazırlanan Fibroin İskelelerin Yapısal Özellikleri 102
7.2. pH Değişimlerinin Fibroin İskelelerin Kimyasal Yapısı Üzerine Etkisi 103
7.2.1. pH 5 Değerine Sahip İskelelerin Fonksiyonel Analizleri 103
7.2.2. pH 6 Değerine Sahip İskelelerin Fonksiyonel Analizleri 104
7.2.3. pH 7 Değerine Sahip İskelelerin Fonksiyonel Analizleri 104
7.2.4. pH 8 Değerine Sahip İskelelerin Fonksiyonel Analizleri 105
7.3. Üretim Yöntemlerinin Fibroin İskelelerin Morfolojik Yapısı Üzerine Etkisi 105
7.4. pH Değişimlerinin Fibroin İskelelerin Morfolojik Yapısı Üzerine Etkisi 106

7.4.1. pH 5 Değerine Sahip İskelelerin Morfolojik Analizleri 106
7.4.2. pH 6 Değerine Sahip İskelelerin Morfolojik Analizleri 107
7.4.3. pH 7 Değerine Sahip İskelelerin Morfolojik Analizleri 107
7.4.4. pH 8 Değerine Sahip İskelelerin Morfolojik Analizleri 108
7.5. Genel Değerlendirme 109
7.6. Sonuç 115
KAYNAKLAR 117
ÖZGEÇMİŞ .....**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

IF	İpek Fibroin
KCl	Potasyum Klorür
HCl	Hidroklorik Asit
NaCl	Sodyum Klorür
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Infrared spk.
MTT	Mitokondriyal Dehidrojenaz Aktiviteleri
TGA	Termogravimetrik Analiz
NaOH	Sodyum Hidroksit
°C	Santigrat Derece
LiBr	Lityum Bromür
$CaCl_2$	Kalsiyum Klorür
$Ca(CNS)_2$	Kalsiyum Siyanat
$ZnCl_2$	Çinko Klorür
NH_4CNS	Amonyum Tiyosiyanat
$CuSO_4$	Bakır(II) Sülfat
NH_4OH	Amonyum Hidroksit
$Ca(NO_3)_2$	Kalsiyum Nitrat
Ca_2^+	Kalsiyum İyonu
Sr_2^+	Stronsiyum İyonu
Ba_2^+	Baryum İyonu
Li^+	Lityum İyonu
Zn^+	Çinko İyonu
DMAA	Dimetilasetamid
DMF	Dimetilformamid
Cl	Klor
Br	Brom
MA	Moleküler Kütle
LH	Hidrodinamik Uzunluk
R	Dönme Yarıçapı
V	Hacim
Å	Ångström
kH	Huggins sabiti
Tg	Camsı geçiş sıcaklığı
K	Kelvin
pH	Power of Hydrogen
pI	İzoelektrik Sabiti
kDa	kilodalton
MKH	Mezenkimal Kök Hücre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Fibroinin yapısında bulunan beta-tabakalı antiparalel yapılı polipeptit zincirleri 6
Şekil 1.2. Fibroinin amino asit dizileriyle beraber genel kimyasal yapısı 7
Şekil 1.3. Fibroinin yapısında bulunan amino asit türlerinin temel kimyasal yapıları 9
Şekil 1.4. a. Fibroinin makromoleküler protein yapısında bulunan alfa-helix yapıların gösterimi b. Fibroinin makromoleküler protein yapısında bulunan beta-katman(beta-sheet) yapıları 10
Şekil 1.5. Fibroinden 3 farklı yöntem ile doku iskelesi hazırlanması 16
Şekil 2.1. Fibroin membranın su ile etkileşimi sonucu meydana gelen pH değerleri grafiği 19
Şekil 2.2. Fibroin membranın 0,01 M KCl ve HCl ile titrasyonu neticesinde meydana gelen pH değişim grafiği..... 19
Şekil 2.3. Fibroin membranın pH potansiyel grafiği..... 20
Şekil 3.1. Sterilizasyon işlemleri sonucunda elde edilen iskelelerin yapısal görüntüleri 26
Şekil 5.1. Ajisawa çözeltisi kullanılarak fibroin çözeltisinin elde edilmesi..... 37
Şekil 5.2. 1:8:2 mol (A) ve B. 1:8:1 mol (B) Ajisawa çözeltisiyle hazırlanan fibroin çözeltilerinin karşılaştırılması..... 37
Şekil 5.4. A. Liyofilizasyon cihazı B. Liyofilizasyon işlemi için liyofilizatör cihazına yüklenen numuneler C. Liyofilizasyon işlemi sonrası elde edilen fibroin iskeleler. 40
Şekil 5.5. A.ve C. Vakumlu etüve yüklenmek üzere hazırlanan numuneler B. Vakumlu Etüv içerisine kurutma işlemenin gerçekleştilmesi. 41
Şekil 5.6. Vakumlu etüvde kurutulan pH5 (A), pH6 (B), pH7 (C), ve pH8 (D) porojen arındırma işlemiyle hazırlanmış, distile su içerisinde NaCl'den arındırılmış ve çeker ocakta kurutulmuş fibroin iskeleler 41
Şekil 5.7. A. Buharlı otoklav B. Liyofilizasyon sonrasında elde edilen fibroin iskelelerin kuru halde otoklav işlemi için hazırlanmış numuneler..... 43
Şekil 5.8. A. Sıvı fibroinin otoklavlama işlemine hazırlanması B. Otoklavlama işlemi sonrası sıvı fibroinler 44
Şekil 5.9. A. Otoklavlanan sıvı fibroinin liyofilizasyon işlemine hazırlanması B. Otoklavlanan sıvı fibroinden liyofilizasyon ile elde edilen iskeleler..... 45

Şekil 5.10. Solda(A) Gruplara ait 5, 6, 7 ve 8 pH'larda numunelerden kesitler, Sağda(B), hazırlanan numuneler üzerine Hank's dengeli tuz çözeltisi eklenmiş görüntüsü. 47
Şekil 6.1. A Serisi için yapılan işlemleri sonunda elde edilen iskelelerin ışık mikroskobisi görüntüleri. A. pH 5, B. pH 6, C. pH 7, D. pH 8. 49
Şekil 6.2. B grubu işlemleri sonunda elde edilen iskelelerin ışık mikroskobisi görüntüleri. A. pH 5, B. pH 6, C. pH 7, D. pH 8..... 50
Şekil 6.3. C grubu işlemleri sonunda elde edilen iskelelerin ışık mikroskobisi görüntüleri. A. pH 5, B. pH 6, C. pH 7, D. pH 8..... 51
Şekil 6.4. F grubu işlemleri sonunda elde edilen iskelelerin ışık mikroskobisi görüntüleri. A. pH 5, B. pH 6, C. pH 7, D. pH 8..... 52
Şekil 6.5. G grubu işlemleri sonunda elde edilen iskelelerin ışık mikroskobisi görüntüleri. A. pH 5, B. pH 6, C. pH 7, D. pH 8. 53
Şekil 6.6. 14.gün MTT testi, A. MTT ilave edilen hücre iskelelerinin 4 saatlik inkübasyon sonrası görüntüsü, B. Kuyucuklardan çözeltinin uzaklaştırılması ve iskeleler üzerindeki renk değişiminin (formazan kristallerinin) gözlenmesi, C. Kuyucuklardan uzaklaştırılan çözeltilerin görüntüsü, D. İskelelerde oluşan formazan kristallerinin MTT solventi ile çözülmesi ve çözeltinin farklı kuyucuklara aktarılmış halinin görüntüsü..... 54
Şekil 6.7. 14.gün MTT testi sonrasında iskeleler üzerinde oluşan formazan kristallerinin görüntülenmesi..... 55
Şekil 6.8. Fibron iskelelerde oluşan formazan kristallerinin UV-spektrofotometresinde absorbans değerlerinin numune türü ve günlere göre dağılımı 56
Şekil 6.9. Biyobozunurluk süresinin deney serileri bazında günlere göre yüzde bozunmalarının grafikler ile gösterimi. 58
Şekil 6.10. Aynı pH değerine sahip fibroin iskelelerin hazırlanma yöntemlerinin bozunma sürelerine bağlılığının, bozunma yüzdelerinin günlere göre grafikler ile karşılatırmalı olarak gösterimi. 59
Şekil 6.11. A grubunda tüm pH'lara ait fibroin iskelelerin FTIR spektrumları 61
Şekil 6.12 A grubuna ait pH 6'da hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumları ve oluşan spesifik alanlar ve alan ölçüleri. 62
Şekil 6.13. B grubunda tüm pH'lara ait fibroin iskelelerin FTIR spektrumları 64
Şekil 6.14. B grubuna ait pH 6'da hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumları ve oluşan spesifik alanlar ve alan ölçüleri. 66
Şekil 6.15. C grubunda tüm pH'lara ait fibroin iskelelerin FTIR spektrumları 68
Şekil 6.16 C grubuna ait pH 6'da hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumları ve oluşan spesifik alanlar ve alan ölçüleri. 69
Şekil 6.17. F grubunda tüm pH'lara ait fibroin iskelelerin FTIR spektrumları..... 71
Şekil 6.18. F grubuna ait pH 6'da hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumları, oluşan spesifik alanlar ve alan ölçüleri. 73
Şekil 6.19. G grubunda tüm pH'lara ait fibroin iskelelerin FTIR spektrumları 75

Şekil 6.20. G grubuna ait pH 6'da hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumları, oluşan spesifik alanlar ve alan ölçüleri. 76
Şekil 6.21. Deneysel serilerdeki numunelerin artan sıcaklığa bağlı olarak yapısındaki kütle azalmasının istatistiksel olarak pH bazında karşılatırmalı gösterimi. 80
Şekil 6.22. Aynı pH değerine sahip farklı deney serilerindeki numunelerin artan sıcaklığa bağlı olarak yapısındaki kütle azalmasının istatistiksel olarak pH bazında karşılatırmalı gösterimi. 81
Şekil 6.23. Standart Liyofilizasyon(A Grubu) prosedürü ile elde edilen ve pH'ları 5 (A,C) ve 6 (B, D) olan numunelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri. 82
Şekil 6.24. Standart Liyofilizasyon (A Grubu) prosedürü ile elde edilen ve pH'ları 7 (A, B) ve 8 (C,D) olan numunelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri. 83
Şekil 6.25. Porojen Arındırma Yöntemi ve Vakumlu Etüv İşlemi (B Grubu) ile elde edilen pH'ları 5 (A,C) ve 6 (B,D) olan fibroin iskelelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri. 84
Şekil 6.26. Porojen Arındırma Yöntemi ve Vakumlu Etüv İşlemi (B Grubu) ile elde edilen pH'ları 7 (A,C) ve 8 (B,D) olan fibroin iskelelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri. 85
Şekil 6.27. Standart Liyofilizasyondan Sonra Kuru Haldeki İskelelerin Otoklavlanması (C Grubu) ile elde edilen pH'ları 5 (A, C) ve 6 (B, D) olan fibroin iskelelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri. 86
Şekil 6.30. Standart Liyofilizasyondan Sonra Kuru Haldeki İskelelerin Etüvlenmesi (F Grubu) ile elde edilen pH'ları 7 (A,C) ve 8 (B,D) olan fibroin iskelelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri. 89
Şekil 6.31. Fibroin çözeltilerinin 121°C'ta otoklavlanmasından sonra standart liyofilizasyon ile üretilen (G Grubu) pH'ı 5 (A,C) ve 6 (B,D) olan fibroin iskelelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri. 91
Şekil 6.32. Fibroin çözeltilerinin 121°C'ta otoklavlanmasından sonra standart liyofilizasyon ile üretilen (G Grubu) pH'ı 7 (A,C) ve 8 (B,D) olan fibroin iskelelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri. 92

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.2. Fibroinde interatomik mesafeler, hidrojen bağları, yapısal model ve kristalin alanlar 9
Tablo 1.3. Fibroinin sulu çözeltilerinin moleküler karakteristik özellikleri 12
Tablo 2.1. Fibroinin pH değimi için hazırlanan deney koşulları ve malzemeler 17
Tablo 3.1 Fibroin iskelenin gözenek boyutu ölçümleri 23
Tablo 3.2. Sterilizasyon tekniğinin avantajları ve dezavantajları 29
Tablo 5.1. Fibroin çözeltisi ve fibroin iskelelere uygulanan ısıl işlemler 42
Tablo 6.1. Deneylere göre yapılan alfabetik adlandırmalar 48
Tablo 6.2. İzlenen deney prosedürlerine göre FTIR spektrumlarının karşılaştırılması 78
Tablo 6.3. Deney serilerinndeki iskelelerin toplam yüzey alanı değerleri 93
Tablo 7.1. Beta-tabakalı yapılarda pH değişimi ve deney şartlarına göre meydana gelen bozulmaların oranları 110

1. GİRİŞ

İpek fibroini (IF), doğal polimerler sınıfına giren, süpermoleküler lifli protein yapısında olan, biyouyumluluk, biyobozunurluk, biyoinertlik, güçlü kimyasal stabilite, yüksek mekanik mukavemet ve mekanik özelliklerde doğal doku ile karşılaştırılabilme gibi oldukça önemli özelliklere sahip olan doku mühendisliği çalışmalarında sıkça tercih edilen bir biyomalzemedir (Kaplan vd., 1992; Langer ve Vacanti, 1993; Kaplan, 1998; Megeed, Cappello ve Ghandehari, 2002; Altman vd., 2003; Wanga, Kima, Vunjak-Novakovic ve Kaplan, 2006). Bununla birlikte, fibroinler *in vivo* olarak rahatça kullanılabilen, hücresel destekli bazal membran şeklinde modifiye edilebilen, hücreler için besiyerine eklenen büyüme faktörlerinin fonksiyonlarını destekleyen ve dokulara sıkıştırma özelliklerini veren suyu depolayabilen bir glikosaminoglikan bileşenine de sahiptir (Minoura ve Tsukada, 1990; Tsukada, Freddi, Minoura ve Allara, 1994; Cooper, 2000; Gobin, Froude ve Mathur, 2005).

Yapısal olarak fibroin, genel olarak glisin ve alanin gibi kısa yan zincirli amino asitlerden ve yüksek yan zincirden oluşan daha karmaşık sekanslara sahip hidrofilik bloklardan oluşan, yüksek düzeyde korunmuş tekrarlanan dizi içeren hidrofobik bloklardan oluşan doğal blok kopolimerler olarak karakterize edilir. Yapıda bulunan amino asitlerin büyük bir bölümü yüklü amino asitlerden oluşmaktadır (Winkler ve Kaplan, 1990; Bini, Knight ve Kaplan, 2004). Hidrofobik bloklar, hidrojenle bağlama ve hidrofobik etkileşimler yoluyla beta-tabakaları veya kristalleri oluşturma eğilimindedir ve ipek fibroinlerin mekanik-gerilme mukavemetinin temel oluşturmaktadır (Simmons, Ray ve Jelinski, 1994; Simmons ve Michal, 1996). Burada bahsedilen hidrofobik bloklar, ipek fibroinlerinin esnekliğini ve dayanıklılığını arttırmak için daha az emilen hidrofilik bloklarla birleşmektedir (Vollrath, 2000; Vollrath, 2005).

Canlı dokular ile biyouyumlu olan ipek fibroini aynı zamanda biyobozunurluk özeliğine de sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle son yıllarda yapılan araştırmalarda, doku mühendisliği ve ilaç salınım sistemlerine yönelik kullanımları artmıştır (Rujiravanit, Kruaykitanon, Jamieson ve Tokura, 2003; Meinel, Hofmann,

Karageorgiou, Kirker-Head, McCool, Gronowicz, Zichner, Langer, Vunjak-Novakovic ve Kaplan, 2005). Doku mühendisliğinde kullanılan yapı iskelelerinin oluşturulmasında fibroin tek başına kullanılabildiği gibi kollajen, kitosan, jelatin, hiyaluronik asit, seramikler, PLGA, PLA vb.gibi etkinliği daha iyi bilinen ve uzun yıllardır doku mühendisliğinde kullanılan polimerik malzemeler ile kompozit yapıları da test edilmeye başlanmıştır (Rujiravanit vd, 2003; Meinel vd., 2005; Bhardwaj ve Kundu, 2011; Mirahmadi, Tafazzoli-Shadpour, Shokrgozar ve Bonakdar, 2013; Yodmuang, McNamara, Nover ve Mandal, 2015).

Doğal yapılı bir biyopolimer olan ipek fibroini biyouyumluluk ve biyoinertlik gibi özelliklerinin yanı sıra önemli olarak doğal yara iyileştirici etkiye sahiptir. Bu özelliği yüzyıllardır bilinmekte olup, halk arasında yara kapatıcı ve kan durdurucu olarak kullanılmasının yanı sıra medikal firmalarca da ipek yara bantları imal edilerek haricen yara kapatıcı olarak kullanılmaktadır. Biyomalzeme olarak fibroin 3B iskele, lif, jel, film gibi farklı şekillerde ve farklı fiziksel özelliklerde üretilebilmektedir (Kundu, Rajkhowa, Kundu ve Wang, 2013).

1.1. Fibroinin Yapısı ve Kimyasal Özellikleri

İpek fibroin, iki ana zincirden oluşmaktadır. Bunlardan biri ağır bir zincirdir ve yaklaşık 325 kDa'luk zincir ağırlığına sahiptir. Diğeri ise tek bir disülfid köprüsü ile bağlanmış hafif zincirdir ve zincirin ağırlığı yaklaşık 25 kDa'dur.

Gly–X sekansı, Bombyx Mori'den elde edilen ipek fibroinin ağır zincirinin sekansının dikkat çekici bir özelliğidir (Lucas ve Shaw 1958; Zhou, Confalonieri, Medina, Zivanovic, Esnault, Yang, Jacquet, Janin, Perasso, Li, 2000; Zhou, Confalonieri, Jacquet, Perasso, Li ve Janin, 2001). İki zincir, bir serisin kaplama ile birbirine bağlanmaktadır. İpek fibroinin yapısı, kristal ve amorf bölgelerden oluşmaktadır. Kristalin bölge, serin ve tirozin amino asitleri ile birbirine bağlanmış glisin-alanin tekrarlarından oluşmaktadır (Kaplan, Adams, Farmer, Viney, 1994; Kaplan, Mello, Arcidiacono, Fossey, Senecal, Muller, 1998; Altman vd., 2003; Wanga vd., 2006).

Amorf bölge ise, aspartik asit gibi daha büyük amino asitlerden meydana gelmektedir. Alanin-glisin tekrarları antiparalel tabakanın-zincirin sekonder yapısını oluşturan kristalli alanlardır ve daha esnek amorf bölgelerin aralarına serpiştirilmiştir. Bu yapısal konfigürasyon, ipek fibroine esneklik özelliği ile yüksek mukavemeti içeren benzersiz mekanik özellikler kazandırmaktadır. Minoura ve Tsukada, 1990; Paulsson, 1992, Tsukada vd., 1994; Gobin vd., 2005).

İpek fibroin sahip olduğu yüksek mukavemet (doğada bilinen en güçlü fiber olarak 4.8 GPa'a kadar) ve kayda değer sertlik ve elastikiyet oranı (yaklaşık % 35'e kadar) ile mükemmel bir kombinasyon sağlamaktadır. Örneğin, lifli yapıdaki ipeklerin çekme mukavemeti, yüksek mukavemete sahip *Kevlar 49* gibi sentetik liflerinkiyle karşılaştırılabilir iken, esnekliği *Kevlar 49*'dan 4 ila 7 kat daha yüksektir ve kıvrık yapıdaki ipliği koparmak için gereken enerji, 3 ila 4 kat daha yüksektir. Fibroinin olağanüstü mekanik özelliklerine ek olarak, ipekler 250°C'ye kadar termal kararlılık göstererek yapılarını koruyabilir ve geniş bir sıcaklık aralığında işlem yapılmasına imkan sağlayabilmektedir (Winkler ve Kaplan, 1990; Kaplan vd., 1994; Kaplan vd., 1998; Kaplan, 1998; Vollrath, 1999; Foo ve Kaplan, 2002; Rising ve Nimmervoll, 2005).

Malzemenin mekanik özelliklerine ek olarak, çok yönlü işlenebilirlik ve yüzey modifikasyonu seçenekleri ile doku mühendisliğinde hücresel moleküler yapı ve morfolojiyi kontrol etme yeteneği yapılan çalışmalarda başarı yüzdelerini arttırmaktadır.

Çeşitli biçimlerde şekillendirilebilme (filmler, lifler, ağlar, membranlar, iplikler ve süngerler) özelliğiyle ipek fibroin, in vivo kök hücre adezyonunu, proliferasyonunu ve farklılaşmasını desteklediği ve doku rejenarasyonunu in vivo ortamlarda desteklediği gözlenmiştir. Özellikle, 3B ipek fibroin iskeleleri kullanarak kök hücre bazlı doku mühendisliği, deri gibi bağ dokuların yanı sıra kemik ve kıkırdak gibi iskelet dokularının bir dizi mühendislik çalışmalarıyla desteklenerek kullanımı rejeneratif tıp için oldukça umut vaad edicidir (Langer ve Vacanti, 1993; Wanga vd., 2006)

İpek fibroin lifleri su, etanol, seyreltik asitler ve bazlar gibi çoğu çözücüde çözünmezler, ancak formik asit, heksafluoroizopropanol (HFIP), kalsiyum nitrat veya LiBr çözeltilerinde çözünmektedirler (Haider, Megeed ve Ghandehari, 2004; Wanga vd., 2006)

Fibroinler 58 adet kalıntılı C-terminal dizisi içerir. Bu dizi amorf bölgeye homologtur. Bu diziden tamamen farklı olarak bir de N- terminal dizisi mevcuttur ve bu dizi de kristalin bölgesine homolog pozisyondadır. Her bir kristal alan GAGAGS hekzapeptidin tekrarları ile başlayıp ve GAAS tetrapeptid tekrarları ile sonlanmaktadır. Bu yapı ifadesi fibroin için klasik olan Pauling-Corey modelini güçlü bir şekilde desteklemektedir; burada Gly/Gly ve X/X kontaklarının birbirini izleyen katmanlarında birbiri üzerine beta-tabakalar(beta-sheet) paketlenmiştir. Her bir kristalin alanda bulunan beta-tabakaları, fibroin yapısının temelini oluşturan antiparalel zincirin oluşumunu desteklemektedir (Zhou vd., 2001).

Pauling-Corey modeli için Takahashi ve ark.(2001), beta-ipliklerini ve beta-tabakalarını paketlemenin dört yolunu test etmiştir: Bir beta-tabakanın içindeki bitişik şeritler paralel veya antiparalel olabilir ve yan zincirleri ya hepsi aynı yönde (polar mod) veya alternatif olarak Ala/Ser yan zincirleri ile yukarı ve aşağı (antipolar mod) işaret edebilmektedir. Bu ifade ile Pauling-Corey modelinde fibroinin zincir yapısının kutuplu ve antiparalel olduğu gösterilmektedir. Fibroin sekansının sadece poli- (Ala-Gly) olduğu varsayılarak bir dizi 26 kırınım yoğunluğuna en iyi uyumu sağlamaktadır.

Antipolar beta-yaprakların (tabakaların) glisin amino asidine sahip olmadığı için paketlenmeleri Pauling-Corey modeline göre daha az düzenlidir Yapıda bulunan kristalli alan, birbirinin üzerine ya bir beta-levha ya da iki adet beta-tabaka ihtiva etmektedir. Bu beta tabakalar yaklaşık 200Å boyutuna sahiptir ve 6 veya daha fazla alt alan içeren GX1, GX2, GX5, GX7, GX8 ve GX11 sekansları içermektedir. Beta-ipliklerinin ve beta-yapraklarının polariteleri fibroinin bağ kuvvetleri açısından oldukça önemlidir ve N-terminalden C-terminaline olan yönelimler ile desteklenmektedir (Zhou vd., 2001).

Bir uzun zincirli ve kompleks protein yapısını, paralel beta-tabakalarına katlamak için kullanılan doğal bir yol, iki katmanlı bir solenoid yapı oluşturmaktır. Üst ve alt katman arasında değişen ardışık beta-iplikçikleri ile katlanan polipeptit zinciri tarafından yapılan konformasyon, globüler al-beta proteinlerinde yaygındır.

İpek fibroin difraksiyonunda gözlemlenen ve tekrar eden ünitelerinin tek bir beta-ipliği olduğu tesbit edilmiştir. Bu yapıda bulunan aminoasit dizilerinden, sadece poli-(Ala–Gly) tek ipliklidir. Fibroin X-ray kırınım testine maruz kaldığında, düşük açıda poli-(Ala–Gly) birim hücre üzerinde indekslenemeyen zayıf yansımalara sahiptir. Bu yansımalar bu zincirin uzantılarında serinlerin varlığına atfedilmektedir (Rıchard ve Marsh, 1955; Lucas ve Shaw, 1958; Zhou vd., 2000; Zhou vd., 2001).

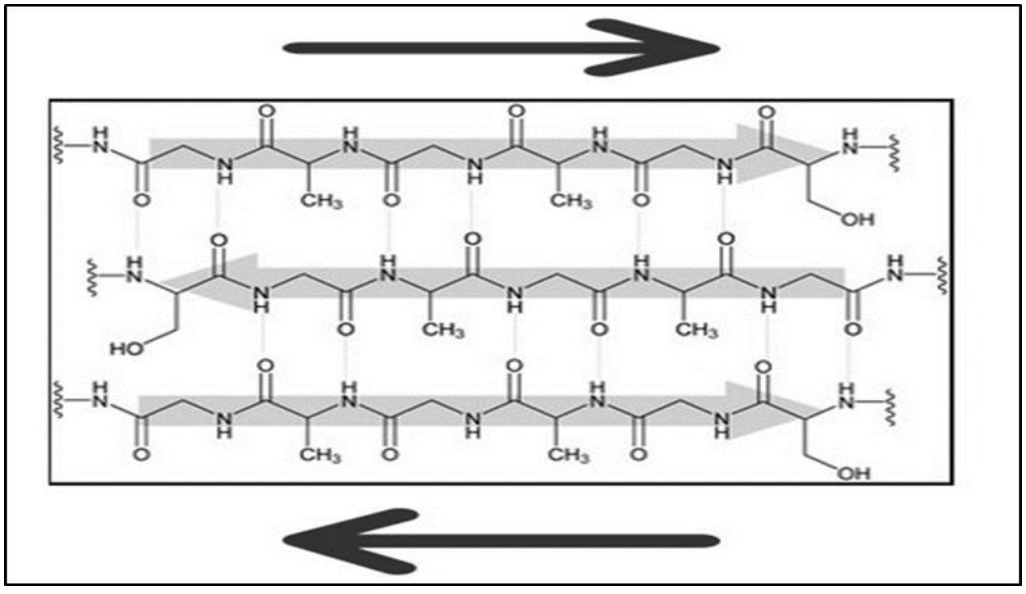
Fibroin molekülleri hidrofobik alanlardan ve az miktarlarda pozitif ve negatif yüklü amino asitlerden oluşur ve izoelektrik noktası pI = 4,5 civarındadır. Bu nedenle SF membranı amfobiktir. Genel olarak proteinler suda çözünmez ve amfoterdir. Bu proteinler –fibroin ve serisin- hem asitlerle hem de bazlarla birleşerek tuz oluşturmaktadırlar. Ham ipeğin kimyasal bileşiminde %2 oranında parafin(wax) de bulunmaktadır. Özellikle koza içerisindeki parafinin hidrofobik görev aldığı düşünülmektedir.

İpek fibroin protein membranı amfoterik iyon değişimine uygundur. Bu iyon değişimi yüzeylerinde bulunan zayıf asidik ve zayıf bazik gruplardan oluşan kimyasal bağlar ile mümkün olmaktadır. Ayrıca membranın pozitif veya negatif yükü, fibroin solüsyonunun pH değerine bağlıdır. Fibroin çözeltisinin pH'ı 4,5'in altında olduğunda, pozitif yüklü olan fibroin bulunduğu ortamlardaki anyonları algılar. Böylece, fibroin kullanılarak modifiye edilmiş tüm materyallerin mükemmel iyon değişim özellikleri vardır.

Fibroin proteinin yapısında bulunan polipeptit zincirleri çeşitli konfigürasyonlarda bulunur. Bu konfigürasyon deneysel olarak birçok lifli ve globüler proteinin ve sentetik polipeptidlerin ana yapısal bir bileşeni olarak gösterilmiştir. Konfigürasyonda bulunan amid gruplarının bazıları, C-C ve C-N tekli bağları etrafında belirli yönelimlere sınırlıdır (Lucas ve Shaw, 1958; Zhou vd., 2000; Zhou vd., 2001).

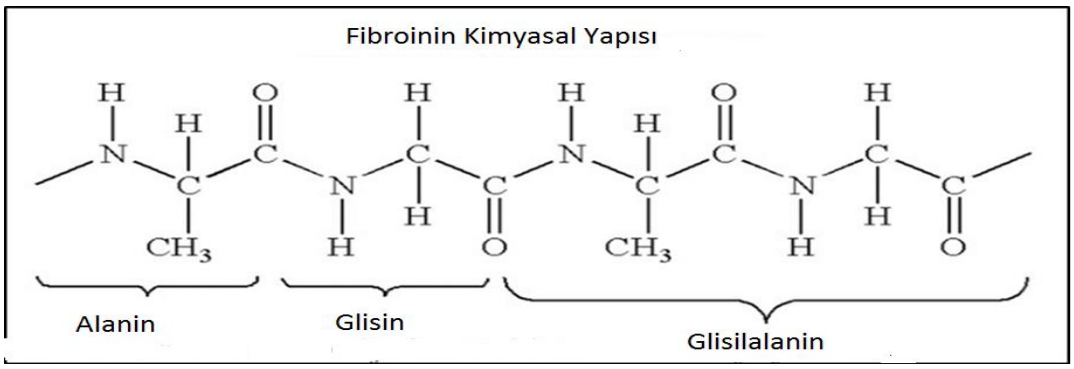
Polipeptit zincirinde bulunan bir diğer konfigürasyonda ise -C=O- ve -N-H- grupları ardışık biçimde yerleşmişlerdir. Ana zincirde –C-O- ve -N-H- grupları, bu konfigürasyon sarmallarının karşıt taraflarından çıkıntı yapar; onların yönelimi, sarmalın eksenine neredeyse dikdir. Bu pozisyon, bitişik sarmallar arasında yanal -C=O--N-H- hidrojen bağlarının oluşumu için elverişlidir. Bu şekilde birbirine bağlanmış bir sarmallar dizisi, iki tabaka yapısı oluşturabilir. Paralel zincir ve antiparalel zincir kıvrımlı tabakalar, bitişik sarmalların paralel veya antiparalel bir düzenine karşılık gelir, bu iki yapı orijinal olarak, muhtemelen -C-C- ve -C-N- tek bağları etrafında spesifik yönelimler göstermiştir (Rıchard ve Marsh, 1955; Lucas ve Shaw, 1958; Minoura ve Tsukada, 1990; Paulsson, 1992; Simmons ve Michal, 1996; Cooper, 2000; Zhou vd., 2000; Zhou vd., 2001; Bini, Knight ve Kaplan, 2004; Rising ve Nimmervoll, 2005; Vollrath, 2005).

Fibroin materyallerinin X ışını altında yapılan analizleri sonucunda ipek fibroinin temel zincir yapısının yanı sıra bu temel zincire antiparalel olan sanal bir protein zincirinin (Şekil 1.1) varlığı tesbit edilmiştir. Bu zincirde de yine C-O-N atomları spesifik şekilde dizilmişlerdir. Fibroinde bulunan bu antiparalel zincir amfoterik özelliğin oluşmasının ana sebebidir.



Şekil 1.1. Fibroinin yapısında bulunan beta-tabakalı antiparalel yapılı polipeptit zincirleri (Rıchard ve Marsh, 1955)

İpek fibroinin polipeptit zincirinde bulunan aminoasitlerin dizilişi şu şekildedir: Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Ala-Gly-[Ser-Gly-(Ala-Gly)n] sTyr. Ancak fibroinin yapısında genel olarak Şekil 1.2'de olduğu gibi glisin-alanin blokları oluşur ve ana zincir bunlar üzerinden devam etmektedir. Ana polipeptidin dizilişi ise, (Gly, Ser, Gly, Ala, Gly, Ala)n şeklinde bir hekzapeptidin tekrarı şeklindedir. Gözlenen bu 9'lu amino asit sekansı fibroine kristallik özelliği kazandırmaktadır (Lotz ve Cesari, 1979; Sashina, Bochek, Novoselov ve Kirichenko, 2006).



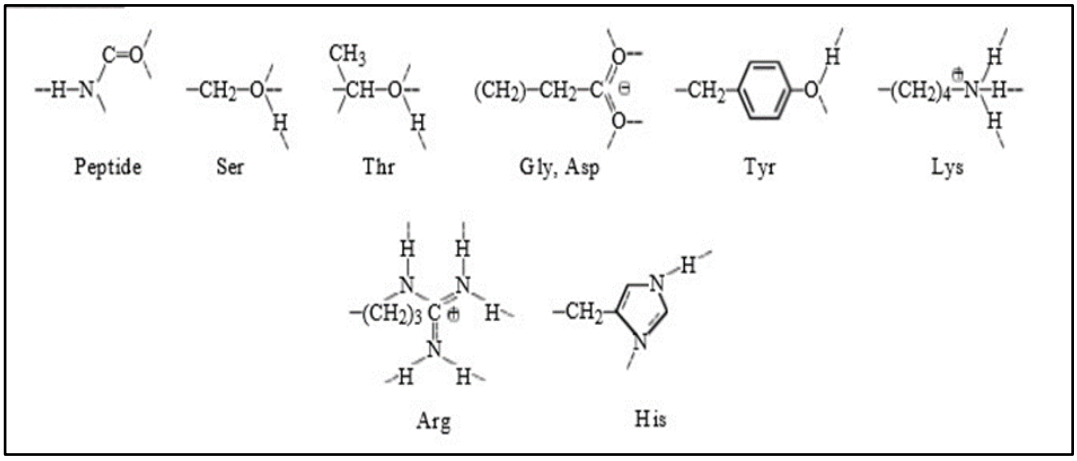
Şekil 1.2. Fibroinin amino asit dizileriyle beraber genel kimyasal yapısı (Lotz ve Cesari, 1979)

İpek fibroinin ana bileşeni glisindir. Tüm bileşenler ve bulunma oranları Tablo 1.1.'de verilmiştir. Fibroinin yapısında bulunan amino asit türlerinin temel kimyasal yapıları da Şekil 1.3.'te gösterilmiştir. Fibroinin yapısında az miktarlarda bulunan Tyr, Val, Arg ve Asp gibi aminoasitler ana peptit zincirinde büyük yan zincirler oluşturmaktadır. Bunlar yapının yer yer kristal düzeninden sapmasına sebep olmaktadır. (Lotz ve Cesari, 1979; Sashina, Bochek, Novoselov ve Kirichenko, 2006).

Tablo 1.1. *Fibroinin protein yapısında bulunan amino asit türleri, yapıda bulunma yüzdeleri ve molekül ağırlıkları (Rıchard ve Marsh, 1955)*

AMİNO ASİT	**BİLEŞİM % MOL**		
	Toplam	**Ağır zincir**	**Hafif Zincir**
Glisin	42,9	49,4	10,0
Alanin	30,0	29,8	16,9
Serin	12,2	11,3	7,9
Trosin	4,8	4,6	3,4
Valin	2,5	2,0	7,4
Aspartik Asit	1,9	0,65	15,4
Glutamik Asit	1,4	0,70	8,4
Treonin	0,92	0,45	2,8
Fenilalanin	0,67	0,39	2,7
Metiyonin	0,37	-	0,37
İsolösin	0,64	0,14	7,3
Lösin	0,55	0,09	7,2
Prolin	0,45	0,31	3,0
Arginin	0,51	0,18	3,8
Histidin	0,19	0,09	1,6
Lisin	0,38	0,06	1,5

İpek liflerin supramoleküler yapısının elemanları, 6,5 Å'a kadar genişliğe sahip olan makrofibrillerdir. Helezonik olarak paketlenmiş nanofibriller 170 nm çapındadır (Sashina vd., 2006). Nanofibriller, ipek fibroinlere artırılmış mukavemet kazandırmakta önemli bir rol oynamaktadır. İpek fibroinin molekül ağırlığı 370000 Da'ya ulaşır; fibroin makro zincir uzunluğu, 150 nm; ve makro halka çapı, 0,45 nm'dir (Tsukada, Gotoh ve Minoura, 1990; Gotoh, Niimi, Hayakawa ve Miyashita, 2004; Sashina, 2006). Fibroin içindeki polar karboksi ve amino grupları ayrıca, dipol etkileşimlerinde ve proton transferi durumunda da elektrostatik etkileşimlerde rol oynayabilmektedir. Fibroindeki asit ve baz gruplarının içeriği düşük olduğundan, sekonder yapının oluşumunda elektrostatik faktör belirleyici değildir; bununla birlikte, fibroin çözünmesinde bu durum belirleyici olabilmektedir (Dill, 1990).



Şekil 1.3. Fibroinin yapısında bulunan amino asit türlerinin temel kimyasal yapıları (Sashina vd., 2006)

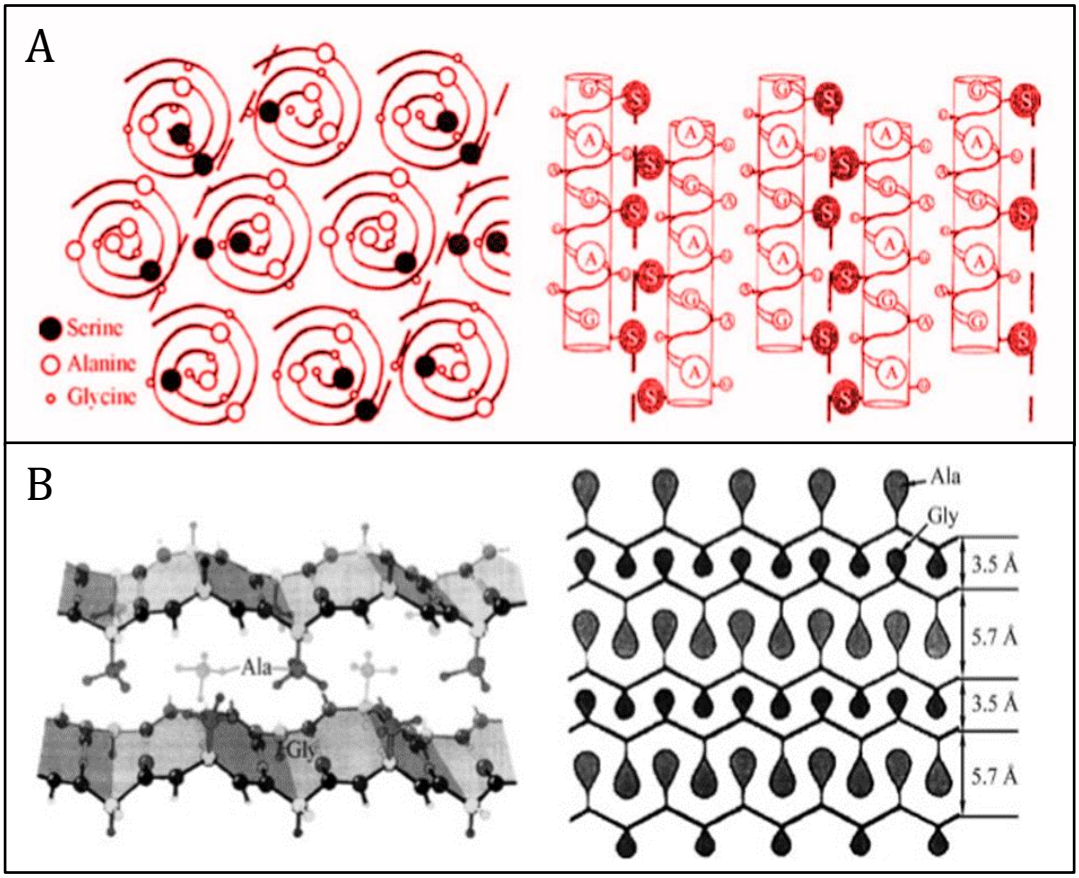
Tsukada ve ark. (1994), X-ışını saçılma verilerinden hesaplanan protein zincirlerinin çeşitli uyumları için interatomik mesafeleri ve bağ açılarını bildirmişlerdir. En enerjik olarak uygun model, alanin-glisin bloklarının (AlaGly) iki molekül içi ve bir moleküller arası hidrojen bağı oluşturduğu makro zincirlerin antiparalel düzenlemesi ile ve (AlaGly) 2-SerGly fragmanlarının oluşmasıdır. Ayrıca üç tane içyapıda ve bir de moleküller arası hidrojen bağları (Tablo 1.2.) bulunmaktadır (Sashina vd., 2006).

Tablo 1.2. *Fibroinde interatomik mesafeler, hidrojen bağları, yapısal model ve kristalin alanlar (Sashina vd., 2006)*

Fibroinin Yapısal Modeli	**Moleküller Arası Hidrojen Bağları**			**Molekül içi Hidrojen Bağları**		
	Bağ	**Atomlar arası Mesafe**	**Açı derecesi**	**Bağ**	**Atomlar arası Mesafe**	**Açı derecesi**
Ala-Gly	N(Ala)..O(Gly)	2,87	77,7	N(Gly)..O(Ala)	3,02	123,7
				N(Ala)..O(Ala)	2,84	83,6
$(Ala\text{-}Gly)_2$-Ser-Gly	N(Ala)..O(Gly)	2,98	76,9	N(Gly)..O(Ala)	3,13	125,6
				N(Ala)..O(Ala)	2,88	86,4
				O(Ser)..O(Ala)	2,65	88,5

Fibroinin izoelektrik noktası, çözelti hazırlama koşullarına bağlı olarak pH 3,6-5,2 aralığında değişirmektedir (Tsukada vd., 1990; Altman, Diaz, Jakuba ve ark., 2003; Gotoh, Niimi, Hayakawa ve Miyashita, 2004; Sashina vd., 2006).

Makromoleküller paralel veya antiparalel modda düzenlenir, katlanmış bir tabaka(alfa) oluşturmaktadır. İpek fibroin antiparalel beta-tabakaları yüz yüze, arka arkaya pozisyonunda paketlenmektedir. (Şekil 1.4.) Makromoleküllerin hidrofobik parçaları için bu yapı en düşük enerjiye sahip olduğu için en kararlı yapıyı sağlamaktadır (Lazo ve Downing, 1999; Dwyer, 1999).



Şekil 1.4. a. Fibroinin makromoleküler protein yapısında bulunan alfa-helix yapıların gösterimi b. Fibroinin makromoleküler protein yapısında bulunan beta-katman(beta-sheet) yapıları (Sashina vd., 2006)

Fibroin, konsantre sulu çözeltilerde (fosforik, formik, sülfürik, hidroklorik) ve konsantre edilmiş sulu, organik ve sulu-tuz çözeltilerinde çözülmektedir: [LiCNS, LiBr, $CaCl_2$, $Ca(CNS)_2$, $ZnCl_2$, NH_4CNS, $CuSO_4^+$, NH_4OH, $Ca(NO_3)_2$].

Sulu tuz sistemlerinin çözünebilirliği tuz konsantrasyonuna bağlıdır ve aşağıdaki sırayla artar: anyonlar için, sülfat < sitrat < tartrat < asetat < klorid < nitrit < bromür < iyodür < tiyosiyanat < dikloroasetat; katyonlar için, Ca_2^+ < Sr_2^+ < Ba_2^+ < Li^+ < Zn^+. Bazı tek bileşenli organik çözücülerde (heksafluoroizopropanol,

heksafluoroaseton), fibroin sadece ön aktivasyonundan sonra çözülebilmektedir. Fibroin aktivasyonu, proteinin bir sulu tuz çözeltisi içinde çözülmesinden sonra çözeltinin diyalizinden ve polimerin kuru çözelti ile sulu çözeltiden bir film olarak geri kazanılmasından oluşmaktadır.

Yüksek çözülebilirlik lityum halojenürlerin organik çözücüleri dimetilasetamid (DMAA) ve dimetilformamid (DMF) olarak adlandırılır. Kompleks bir çözücünün önemli bir özelliği, fibroin makromoleküllerinin elektrofilik merkezlerine (hidroksi, amid, amino grupları) saldıran anyonun nükleofilik olmasıdır. Protonsuz çözücülerde anyonlar çözülmez; bu nedenle nükleofilik özellikleri sulu çözeltilerden bile daha yüksek olabilmektedir. Organik tuz çözeltilerinin çözünebilirliği, bir anyona bağlı olarak aşağıdaki sırayla azalır: Cl > Br > SCN. Anyonun nükleofilikliğinde azalma ile korelasyon göstermektedir. Sulu çözeltilerde, bu eğilim terstir, çünkü su molekülleri, fibroin elektrofilik merkezleriyle rekabet eder ve daha nükleofilik anyonlar, suyla, polimerden daha güçlü bir şekilde etkileşmektedir.

Organik çözücüler içinde tiyosiyanatların çözeltileri, sulu bir LiSCN çözeltisinin polimeri kolaylıkla çözdüğü halde, verimsiz olduğunu kanıtlamıştır. Katyonların aktivitesi için, sulu ve organik sistemler de bu açıdan farklıdır. $ZnCl_2$'nin sulu çözeltileri en etkili çözücülerdir, oysa DMAA, DMF ve N-metil-2pirolidon içindeki $ZnCl_2$ çözeltilerinde, fibroin nispeten seyreltik çözeltiler (ağırlıkça %1-2) oluşturmak için sadece 155 °C'de çözülmektedir.

Çeşitli sistemlerde fibroin çözünmesinin spesifik özellikleri, moleküler yapısı ile ilişkilidir. Yoğunlaştırılmış asit çözeltilerinde, fibroin makromolekülleri güçlü bir iyon-iyon etkileşimi sayesinde çözülür, bu da polimerin amino ve amid gruplarının protonlanmasıyla mümkün olmaktadır. Tuz sistemlerinde çözünme, çözücü iyonlarının fibroin makromoleküllerin fonksiyonel grupları ile etkileşmesinden kaynaklanır.

DMAA, LiCl sisteminde selülozun çözünmesi ile benzer şekilde, anyonun nükleofilik saldırısının sonucu olarak fibroin yapısındaki moleküller arası ve moleküller arası hidrojen bağlarının koptuğu varsayılabilmektedir. Solvent iyonları,

polar ve yüklü fibroin zincirlerinden oluşan gruplarla etkileşime girerek, makromoleküller arasındaki hidrojen bağlarını koparmaktadır (Parker, 1969; Dawsey ve McCormic, 1990; Dwyer, 1999; Ohgo, Zhao, Kobayashi ve Asakura, 2003; Sashina vd., 2006).

LiCI, LiBr, NaSCN ve KSCN'nin sulu ve sulu-organik çözeltileri, ağırlıkça % 20 fibroine kadar çözülür; Karışımların çözünebilirliği çözücü içindeki suyun nispi içeriğinde bir azalma sağlanması ile artmaktadır (Matsumoto ve Uejima, 1949). Solüsyonların içsel viskozitesi, karışımların su muhtevası ile ters orantılıdır ve 30°C'de 0,3 – 0,7 dl g^{-1}'dir. *Huggins sabiti* kH, 0,5–1'dir, minimum %10 su içeriğinde gözlenmektedir. Bu nedenle, sulu ve susuz çözeltilerdeki iyonların çözünmesindeki farklılıklar nedeniyle, fibroin çözeltilerinin özellikleri, su:organik çözücü oranı ile farklılaşmaktadır. Fibroinin sulu çözeltilerinin moleküler karakteristik özellikleri Tablo 1.3.'te bulunmaktadır (Sashina vd., 2006).

Tablo 1.3. *Fibroinin sulu çözeltilerinin moleküler karakteristik özellikleri (Sashina vd., 2006)*

Özellik	**Diyaliz sonrası Akuajenik Fibroin Çözeltisi**
Moleküler Kütle, Da	**188 000**
Hidrodinamik Uzunluk, L_H, Å	**8 563**
Dönme Yarıçapı, R, Å	**81,5**
Enine Kesit Yarıçapı, R_C, Å	**43,0**
Kalıcı Uzunluk, a^*, Å	**37,3**
Hacim, $Vx10^{-6}$, $Å^3$	**2,3**
Enine Kesit Alanı, A, $Å^2$	**7,9**

Çözücü ile etkileşim, mutlaka fibroin makromoleküllerin ve bunların ikincil yapısının konformasyonunda bir değişikliğe yol açmaktadır. Polar olmayan çözücüler, fibroinin hidrofobik fragmanlarını çözmektedir.

Sonuç olarak, amid, hidroksi ve diğer polar gruplar, H bağları vasıtasıyla birbirleriyle etkileşir ve böylece alfa-helix sarmal yapısını sabitlemektedir.

Polar solventlerde, mevcut H bağları kırılır ve bu da alfa yapısına geçişi teşvik eder; işlemde, makromoleküller aynı düzlemde düzenlenir, bitişik makromoleküllerin hidrofobik grupları, düzlemler içinde birbirleriyle etkileşirler ve makromolekül düzleminin dışındaki polar gruplar, iç ve moleküller arası H bağları oluşturmaktadır.

Çözeltilerdeki fibroin makromoleküllerin konformasyonel durumu, çözücüye bağlıdır. Çözeltideki fibroin makromolekülleri, suludan organik çözücülere doğru gittikçe artmaktadır. Sulu tuz sistemlerinde, makromoleküller çoğunlukla rastgele globüller şeklinde bulunur ve düzensiz bir ikincil yapı gözlemlenmektedir. Bir veya başka bir fibroin yapısının prevalansı(oranı) belirli bir organik çözücüye bağlıdır. N-Metilmorfolin, N-oksit, lifler ve filmler halinde fibroin işlenmesi için bir teknolojinin geliştirilmesinde oldukça ümit vaat etmektedir, böylece tuz içeren sulu, sulu-organik ve organik çözücülerle gerekli olan tuz giderme aşaması, ortadan kaldırmaktadır (Matsumoto ve Uejima, 1949; Iizuka, 1966; Parker, 1969; Dawsey ve McCormick, 1990; Dwyer, 1999; Altman vd., 2003; Sashina vd., 2006).

1.1.2. Fibroinin Bombyx Mori İpek Böceğinden Elde Ediliş Yöntemleri

En çok çalışılan ipek türleri, ipekböceği *Bombyx Mori* ve örümcek *NepHila Clavipe*'lerinden elde edilen ipek kozalarıdır. İpekböceği kozası, fibroin olarak adlandırılan lifli bir protein içermektedir. İpek lifleri esas olarak iki protein şeklinde, serisin ve fibroinden meydana gelmektedir. Aynı zamanda az miktarda diğer amino asit kalıntıları ve çeşitli safsızlıklar da içermektedir: yağlar, mumlar, boyalar ve mineral tuzları (Wanga vd., 2006).

Koza türüne bağlı olarak, fibroin içeriği % 66,5-73,5 ve serisin içeriği % 26,5-33,5 oranlarında değişmektedir. Hem ağır hem de hafif iplik çekirdeklerini ve fibroin liflerini çevreleyen serişinler, tutkal benzeri proteinleri bir araya getiren zincirlerdir. Serisinler fibroin fiberleri arasına yerleşerek ipek kozasının bütünlüğünü korumaktadır.

İpek fibroin, evcilleştirilmiş ipekböceği Bombyx mori tarafından sentezlenen bir proteindir ve biyouyumluluk, biyo-bozunabilirlik ve minimum enflamatuar özelliklerinden dolayı umut veren bir biyomateryal olarak çalışılmıştır (Bhardwaj ve Kundu, 2011). Fibroinleri kullanmadan önce etraflarındaki serisin kaplamasının çıkarılması, ipek fibroinin doku mühendisliğinde trombojenik ve enflamatuar yanıtlarını ortadan kaldırmaktadır (Gobin, 2005).

1.1.3. Fibroinin Doku Mühendisliğinde Kullanım Alanları

Doku mühendisliğinde, hücrelerin birbirlerine bağlanması neo doku oluşumunu desteklemesi ve yeni doku büyümesi ile karşılaştırılabilir bir oranda bozunmak için yeterli mekanik stabilite amacıyla üç boyutlu gözenekli matrisler kullanılmaktadır. Ayrıca hücre migrasyonu ve genleşmesine yeterli bir fırsat sağlamak için gözeneklilik oldukça önemlidir. İskelelerin mekanik özellikleri aynı zamanda istenen doku onarım sahasındaki gereksinimleri de karşılamalıdır. Bu tasarım gereksinimlerinin bir kısmını karşılayan polimerlerdeki gözenekli üç boyutlu yapıların üretilmesi için bir takım metotlar Şekil 1.5'te bildirilmiştir (Ishaug, Crane, Miller, Yasko ve Yaszemski, 1997; Agrawal ve Ray, 2001; Nazarov, Jin ve Kaplan, 2004). Özellikle, kemik dokusu rejenerasyonu için düşünüldüğünde mekanik dayanım, iskele uygulamasında önemli bir rol oynamaktadır.

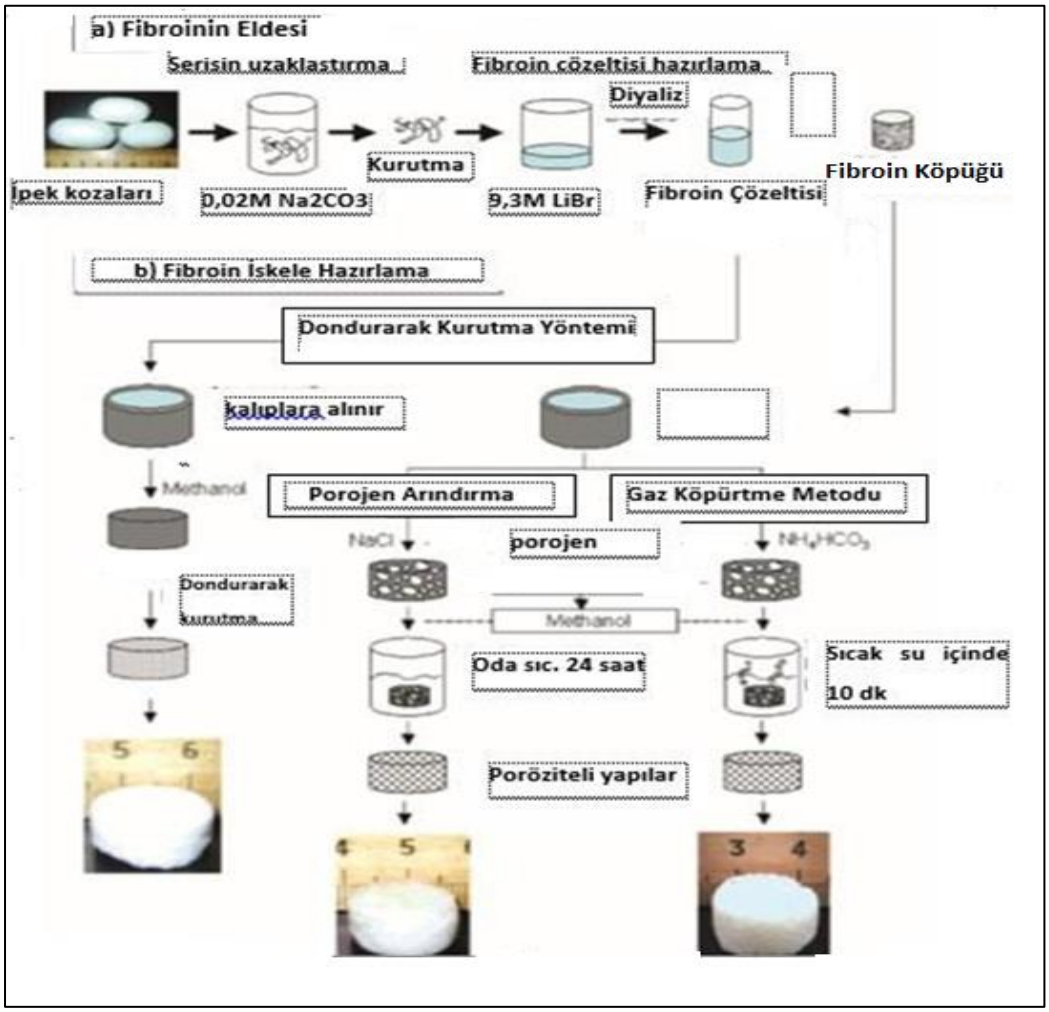
Kemiğin *in vivo* ortamında sıklıkla mekanik kompresyona maruz kalma bulunur; bu nedenle, yeterli bir gözeneklilik ve biyouyumluluk sağlarken, bir iskele bu kuvvete dayanacak şekilde tasarlanmalıdır. Kemik iskeleleri için birçok polimer düşünülmüştür. Bununla birlikte, bozunabilirlik, kontrol edilebilir gözeneklilik, dokunun büyümesi veya biyobozunmayla beraber rejenerasyon(yerine koyma-değiştirme), biyouyumluluk ve gözenekli matrislere işlenebilirlik sırasında uzun süre stabilite kombinasyonu çoğu polimerin kullanımını sınırlandırmaktadır. İpekler, geleneksel olarak tekstilde iplik malzemesi olarak ve binlerce yıldır biyomedikal ihtiyaçlar için ameliyat ipliği şeklinde kullanılmış olan ipekböceği Bombyx mori tarafından üretilen doğal liflerdir (Nazarov vd., 2004).

Son zamanlarda, geniş bir biyomedikal çeşitliliği için ipekler araştırıldığında osteoblast ve fibroblast hücre destek matrisleri ve ligament doku mühendisliği dahil olmak üzere oldukça geniş uygulama alanı bulmaktadır. Fibroin, mekanik özelliklerde bilinen en güçlü doğal elyafları ve diğer doğal polimerlere oranla yüksek performanslı sentetik lifleri temsil etmektedir. Kontrollü salım ilaç salınım sistemleri de ipek fibroin membranlar için bir uygulama alanıdır. İlaç salınım sistemlerinde fibroinin amfoterik özelliğinden yararlanılarak sistem kurulmaktadır.

Doku mühendisliğinde genel olarak fibroinler, başka bir biyobozunur polimer ile kompozit halinde kullanılmaktadır. Fibroin tabanlı kompozit iskelelerde, fibroin oranı toplam kütle içerisinde arttırıldığında iskelenin mekanik mukavemeti artmaktadır. Kompozitlenmiş iskeleler, saf ipek fibroine kıyasla daha yüksek gözenek boyutlarına sahiptir. Ancak fibroin oranı azaltıldığında basınç dayanımı ve modülünün kademeli olarak azaldığı tesbit edilmiştir (Cunniff, Fossey, Auerbach, Song, 1993; Nazarov vd., 2004; Bhardwaj ve Kundu, 2011).

Doku mühendisliğinde fibroin iskeleler, ekstraselüler matrikse (ECM) destek ve güç sağlayarak, homeostaziyi koruyarak ve doku gelişimi ve rejenerasyonunu yönlendirerek doğal dokularda önemli bir rol oynamaktadır. Doku rejenerasyonu için kullanılacak bir biyomateryal, ECM özelliklerinin çoğunu taklit etmesi gerektirmektedir.

Sıvıların fibroin üzerinde serbestçe yayılması yeteneği hücre-besin atıklarının ve besin maddelerinin taşınmasına olanak sağladığından, depolama hem doğal dokularda hem de biyomalzemelerde önemli bir faktördür. Buna ek olarak, sıvının depolanması büyüme faktörlerinin depolanmasına yardımcı olur ve dokunun sıkıştırıcı özelliklerini sağlamaktadır (Hubbell, 2003; Kleinman, Philp ve Hoffman, 2003; Rosso, Giordano ve Barbarisi, 2004; Gobin vd., 2005).



Şekil 1.5. Fibroinden 3 farklı yöntem ile doku iskelesi hazırlanması (Nazarov vd., 2004)

Genel olarak yapılan işlemler sonucunda ipek fibroin konsantrasyonu ne kadar yüksek olursa gözenekler o kadar az olduğu belirtilmiştir. NaCl ile porojen arındırma yönteminde elde edilen iskelelerin gözenek boyutunun, dondurarak kurutma yöntemiyle elde edilen iskelelere göre daha büyük olduğu gözlemlenmiştir (Nazarov vd., 2004).

2. FİBROİNİN pH DEĞİŞİMLERİNE TEPKİSİ

Fibroinin yapısında bulunan antiparalel zincirlerden dolayı amfoterik özellikler göstermektedir. Bu özelliği ile pH değişimlerine spesifik tepkiler vermektedir.

2.1. Fibroinin Protein Yapısında Meydana Gelen Oluşumlar ve Fibroinin Amfoterik Özelliğinin Etkinliği

Bir fibroin membranın izoelektrik noktası, pH 4,5 civarındadır. pH 4,5'in altında bir anyon değiştirici olarak çalışır ve pH 4,5 üzerinde olduğunda ise bir katyon değiştirici olarak görev almaktadır (Chen, Minoura ve Tanioka, 1994).

Chen ve ark.(1994)'nın yaptığı bir çalışmada Tablo 2.1'de belirtilen 5FU, Vc, Res, SPS, BTAC adlı pH etkileyici kimyasallar ile ipek fibroin muamele edilmiş ve fibroinin amfoterik özelliğiyle bu pH değişimlerine tepkileri incelenmiştir.

Tablo 2.1. *Fibroinin pH değimi için hazırlanan deney koşulları ve malzemeler (Chen vd., 1994)*

pH Etkileyici Kimyasallar	**MW**	**U.V. Dalga Boyu**	**pH(10^{-3}M)**
5FU: $C_4H_3FN_2O_2$	130,08	266	6
Vc: $C_6H_5O_6$	176,13	265 250(pH:3)	3,7
Res: $C_6H_4(OH)_2$	110,11	273	6,4
SPS: $HOC_6H_4SO_3Na$	196,19	230	5,8
BTAC: $C_6H_5CH_2N(CH_3)_3Cl$	185,70	208	6

BTAC, sulu çözelti içinde katyonik olduğundan, BTAC'nin geçirgenlik katsayısı, artan pH ile artmıştır. Bu artış, katyonik penetranlar ve membranda sabitlenmiş negatif yüklü gruplar arasındaki elektrostatik etkileşime atfedilebilmektedir.

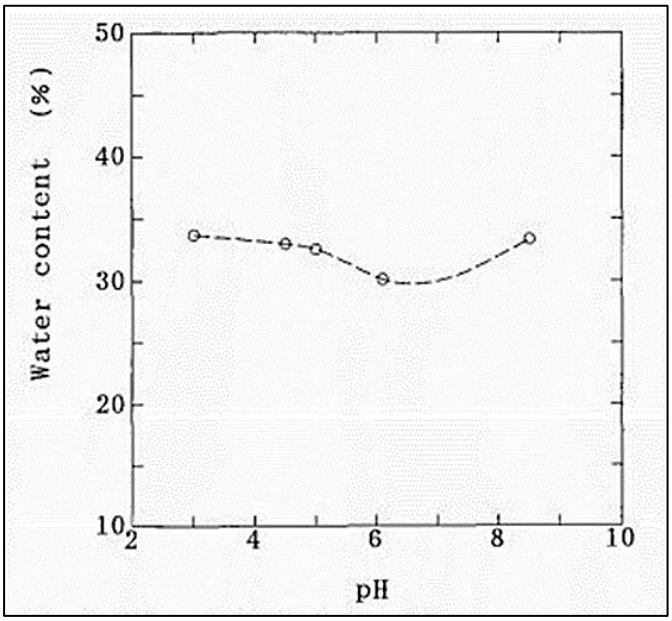
Ek olarak, izoelektrik noktada (yaklaşık pH 4,5), membran nötr hale gelir ve membran üzerindeki sabit yükün, geçirgenlik üzerinde hiçbir etkisi yoktur. SPS anyonun moleküler büyüklüğü, BTAC katyonununkiyle neredeyse aynı seviyededir (Chen vd., 1994).

İzoelektrik noktada SPS ve BTAC katsayıları hemen hemen aynıdır. 5FU'nun geçirgenlik katsayısı pH 7'nin altındaki pH'a bağlı değildir, pH 7'nin üzerinde ise geçirgenlik katsayısı azalmıştır. Bu işlem ile fibroinin izoelektrik noktasının etkilemediği gözlenmiştir.

5FU'luk geçirgenlik katsayısı, ancak pH 9'daki geçirgenlik, pH 6'daki bir faktörün 1/25'i kadar azaltılmıştır. 5FU'nun pH titrasyon deneyleri; ayrışma sabiti pK 8 civarındadır. Bu, 5FU'nun, pH 7'nin üzerinde bir anyon olarak varolduğu anlamına gelmektedir.

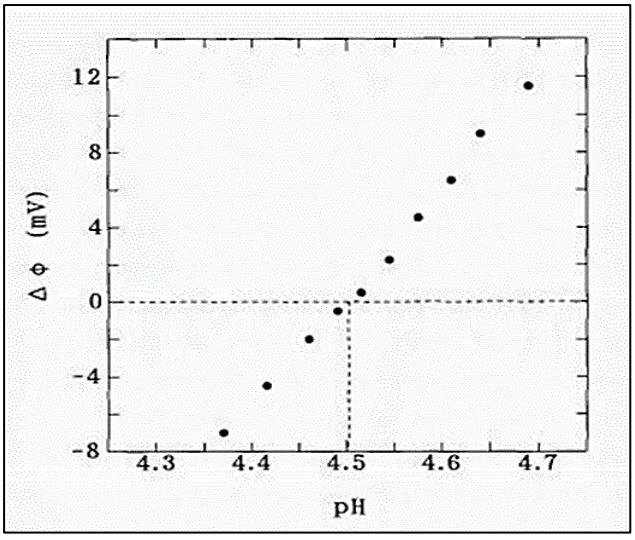
C vitamininin bir anyon (pKal = 4,25) olduğu bilinmektedir. C vitamininin geçirgenlik katsayısı aniden pH 4'ün üzerine düşmüştür. Bu düşüşün nedeni ise ipek fibroin membranının amfoterik iyon değiştirebilirlik özelliği nedeniyle, ipek fibroin membranının farmasötiklere geçirgenliğinin, harici çözeltinin pH değerinin değiştirilmesiyle düzenlenebileceği sonucuna varılmıştır (Chen vd., 1994).

Sulu ipek fibroin solüsyonunun, azalan pH (asidik durum) ile arttığı görülmüştür. Viskozite, pH 4 ve 6 arasında hızla değişmiştir. Sulu ipek fibroin çözeltisinin viskozitesi, pH 3'te yaklaşık 1.4×10^5(cps)'dir. pH < 4,5 çözeltilerinde elektrot pozitif yüklüdür. İpek fibroin protein membranı amfoterik iyon değişimine oldukça uygundur. Fibroin membranın su ile etkileşimi sonucu meydana gelen pH değerleri grafiği Şekil 2.1'de verilmiştir. Bu membran zayıf asidik ve zayıf bazik gruplardan oluşmaktadır. Membranın pozitif veya negatif yükü, pH değerine bağlıdır.



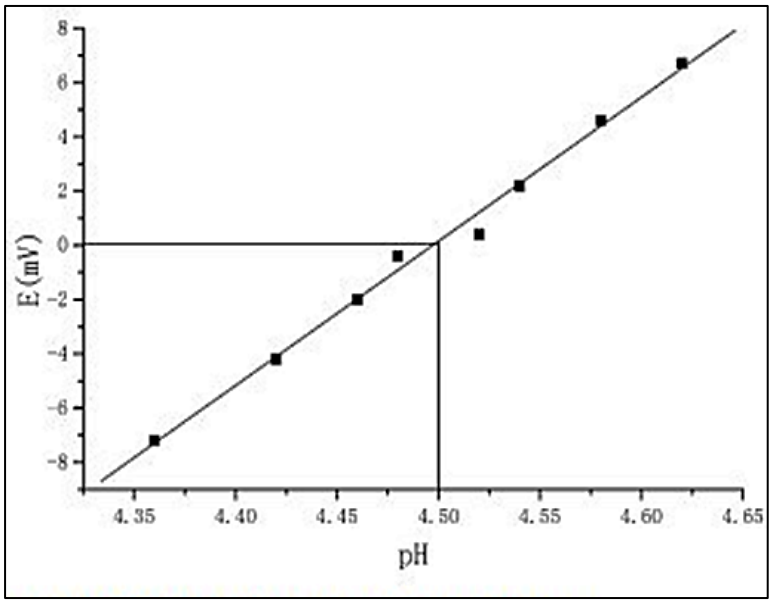
Şekil 2.1. Fibroin membranın su ile etkileşimi sonucu meydana gelen pH değerleri grafiği (Chen vd., 1994)

Zar ile ayrılan sulu KCl çözeltisi arasında üretilen potansiyel, membrandaki sabit yük grubundan etkilenmektedir. Izoelektrik nokta, sulu KCl çözeltisinin pH'sinin bir fonksiyonu (Şekil 2.2) olarak membran potansiyelinden belirlenmektedir. İzoelektrik nokta yaklaşık olarak pH 4,5'dir. Bu, membranın pH 4,5'in altında bir anyon değiştirici ve pH 4,5 üzerinde bir katyon değiştirici olabileceğini düşündürmektedir. Çözelti pH'ı 4,5'in üzerinde olduğunda, negatif yüklü olan fibroin modifiye elektrot, katyonları tespit etmek için kullanılabilmektedir.



Şekil 2.2. Fibroin membranın 0,01 M KCl ve HCl ile titrasyonu neticesinde meydana gelen pH değişim grafiği (Chen vd., 1994)

Çözelti pH'ı 4,5'in altında olduğunda, pozitif yüklü olan fibroin modifiye edilmiş elektrot, anyonları algılamaktadır. Böylece, fibroin modifiye edilmiş elektrotun mükemmel iyon değişimi özellikleri vardır. Analitik uygulamada yüksek seçiciliğe sahiptir ve enterferansa karşı dayanıklıdır. Fibroin elektrodu, *in-vivo* biyoanalizde nörotransmitterleri seçici olarak tespit etmek için kullanılmıştır. İpek fibroin elektrotunun iyon değişimi özellikleri, analitik ve biyoanalitik kimyada çok fazla potansiyele sahip olduğu anlamına gelmektedir (Chen vd., 1994). Terry ve ark.(2004) yaptıkları bir çalışmada hazırladıkları ipek fibroin solüsyonun belirli sürelerde (yaklaşık 5 dk) buhara maruz kaldığında pH dengesine ve son pH'a (2 veya 11) ulaşması için çeşitli işlemler yapılmıştır.



Şekil 2.3. Fibroin membranın pH potansiyel grafiği (Chen vd., 1994)

pH'taki azalma, ipek fibroin yapısının homojen olarak jelleşmesi için yeterli oluştur. Jel oluşumu, sabit gerilme ve frekansta dinamik modülleri ölçerek pH'ın bir fonksiyonu olarak izlenebilmiştir. Sırasıyla asetik asit (pH-2) ve amonyak (pH-11) ile pH düşürülmüş ve yükseltilmiştir. Bombyx mori ipek fibroindeki temel yapısal protein olan H-zinciri fibroin, oldukça düşük tahmin edilen bir pI noktası (4,2) ve asidik yan zincirlerle amino asitlerin ilginç bir dağılımına sahiptir. Oldukça hidrofilik N-terminali, bu bölgedeki temel değerleri fazlasıyla aşan yüksek bir asidik yan zincir yoğunluğu içermektedir.

Molekülün merkez bölgesinde, asitli amino asit grupları sadece uzun hidrofobik bloklar arasında yer alan kısa hidrofilik ara parçaların her birinde görülmektedir. Bu ara parçaların sadece ilk ve sonları da pozitif yüklü amino asitler içermektedir. Böylece, nötr pH'ların yakınında, protein-protein etkileşimlerine güçlü bir itici bileşen sağlayarak negatif yükler ağır basmaktadır.

pH'ın düşürülmesi, asidik grupların iyonizasyonunu, mevcut olduğu düşünülen sıvı kristalin durumunun korunmasından sorumlu olan itici ve çekici kuvvetlerin dengesini bozmaktadır. Bu, hidrofobik blokların, jelin başlangıçta stabilize olması, önerilen hidrofobik etkileşimler üretmek için birbirine yaklaşmasına izin vermektedir.

Belirli prosedürlerle elde edilen fibroin jeli aside daha uzun süre maruz kaldıkça, hidrofobik blokların kısımlarının giderek, içi ve moleküller arası hidrojen bağları ve dolayısıyla jel tabakasını daha güçlü bir şekilde stabilize eden alfa-tabaka formunu oluşturduğu yerlerde denatürasyon meydana gelmektedir. Ayrıca, pH değişikliği katyonların, proteinlerin agregasyonu ve ikincil yapısal geçişleri üzerindeki bilinen etkilerini de modüle edebilmektedir (Vollrath ve Knight, 2001; Terry, Knigh,, Porter ve Vollrath, 2004).

pH'ın, Bombyx mori ipekböceği fibroinin reolojisi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. pH'ın düşürülmesi, aside maruz kalmanın nispeten kısa olması durumunda tekrar pH yükseltilerek tersine çevrilebilen bir jelin oluşumunu indüklemektedir. Jel, fibroin molekülünün iki bölgesinde negatif yüklerin bastırılması, komşu moleküllerin daha yakın bir yaklaşımına izin verilmesi ve böylece hidrofobik etkileşimlerin oluşumu ve daha sonra moleküller arasındaki hidrojen bağlarının bir sonucu olarak oluşturulabilmektedir. pH kontrolünün, fibroin iskelelerin üretimi aşamasında oldukça önemli olduğu belirlenmiştir (Vollrath ve Knight, 2001; Terry, Knigh,, Porter ve Vollrath, 2004).

3. FİBROİNİN SICAKLIK DEĞİŞİMLERİNE TEPKİSİ

Fibroinler supramoleküler kompleks bir protein yapısındadır. Proteinler ise bağ kuvvetlerinin güçlerine bağlı olarak belirli seviye sıcaklıklarda degrede olabilmektedir. Degrede olmaya başlayan protein yapısıyla birlikte fibroinlerin standart yapılarında da değişiklikler meydana gelmektedir. Meydana gelen bu değişiklikler fibroinlerin her alanda özellikle doku mühendisliğinde tek başına veya diğer polimerlerle kompozit olarak kullanımını etkilemektedir.

3.1. Fibroinin Protein Yapısında Meydana Gelen Farklılıklar ve Doku İskelesi Üretimi Üzerindeki Etkileri

Yeo ve ark.(2003) ve Hino ve ark.(2003), yaklaşık 85 ve 120 °C sıcaklıkta püskürtmeli kurutma sistemi ile oluşturulan fibroin mikroküreleri genel konformasyon yapısı incelemesinde sırasıyla βeta-tabakaların konformasyonlarının değiştirebildiğini bildirmişlerdir. Suda çözünmeyen fibroin mikroküreleri elde etmek için metanol işlemi gerçekleştirilmiştir. IF mikroküreleri FTIR spektrumunda metanol muamelesi sonrası βeta-tabakaların karakteristik bantlarını arttırdığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak bu çalışma, konformasyonun rastgele bobin içinden βeta-tabaka formunun değiştiğini kısmen göstermiştir (Srısuwan, Srıhanam ve Baımark, 2009).

Camsı geçiş sıcaklığı, ipek fibroin matrisi içindeki gözeneklerin oluşumunda oldukça önemlidir. Sulu bir çözelti içindeki ipek fibroinin camsı geçiş bölgesi -20 ile -34 °C arasındadır.. Camsı geçişinin üzerindeki donma sıcaklığı ne kadar yüksek olursa buzun oluşması ve büyümesi o kadar uzun sürmektedir. Bu nedenle, buz parçacıklarının gözeneklerin büyüklüğü üzerinde daha büyük bir etkisi olacaktır (Nazarov vd., 2004).

Dondurma süresi ne kadar uzun olursa gözenekler o kadar büyümektedir. Sıcaklık, camsı geçiş bölgesinin altında olduğunda, gözenek boyutu artık sıcaklığa bağlı değildir. Sıcaklığın -80 °C'ye düşürüldüğü zaman, gözenek çaplarının 15 μm'ye düştüğünü (Tablo 3.1) ve ipek fibroinin küçük agregalar oluşturduğunu

göstermektedir. Donma sıcaklığı arttıkça, gözenek çapı artmaktadır. Buz parçacıklarının büyüklüğü büyüme hızına ve zamanına bağlıdır (Cunniff, Fossey, Auerbach, Song, 1993; Ishaug, Crane, Miller, Yasko ve Yaszemski, 1997; Agrawal ve Ray, 2001; Hubbell, 2003; Nazarov vd., 2004).

Tablo 3.1 *Fibroin iskelenin gözenek boyutu ölçümleri (Nazarov vd., 2004)*

Metot	**Örnekler**	**Gözenek boyutu(µm)**
Porojen Arındırma	NaCl/Fibroin	155 ± 114
Dondurarak Kurutma (-20°C'de 4 saat)	Fibroin	50 ± 20
Dondurarak Kurutma (-20°C'de 1 saat)	Fibroin	15 ± 7

Camsı geçiş sıcaklığı üzerinde, çözelti makro gözenekli bir yapı oluşturan buz kristallerinin yavaş büyümesine neden olduğu stabil bir bölgede bulunmaktadır. Camsı geçiş sıcaklığı bölgesinin altında, hızlı dondurma işlemi, buz kristallerinin büyüme süresini kısaltır, bu da büyük buz parçacıklarının büyümesini zorlaştırır, dolayısıyla mikro gözenekli birbirine bağlı yapıların oluştuğu dengesiz bir bölgeye neden olmaktadır (Cunniff, Fossey, Auerbach, Song, 1993; Ishaug, Crane, Miller, Yasko ve Yaszemski, 1997; Agrawal ve Ray, 2001; Hubbell, 2003; Nazarov vd., 2004).

Dondurarak kurutma ile hazırlanan iskeleler, incelenen değişkenlere bakılmaksızın % 99'luk gözenekliliklere neden olmuştur. Tuz linçi:porojen arındırma (porojen maddeyi değiştirerek) ve gaz köpürtme yöntemi sonucunda, gözenekler 84 µm'dir. Dondurarak kurutulmuş iskelelerin yapısı, köpük benzeri ve çok gözeneklidir (Nazarov vd., 2004).

Yüksek oranda 3B gözenekli ağlar oluşturmak için kullanılan başka bir yol da, *kriyotropik jelleşme* veya *kriyojenizasyon* olarak bilinen düşük sıcaklıklı jelleştirme tekniğidir. Bu yöntem Lozinsky ve çalışma arkadaşlarının öncü çalışmalarından bu yana, bir yüksek sıcaklık ve süper hızlı tepki veren makro gözenekli jeller (kriyojeller) üretmek için yaygın olarak kullanılan bir kriyolasyon tekniğidir.

Bu teknikle, polimerizasyon ve/veya çapraz bağlanma reaksiyonları gerçekleştirilmektedir.

Kimyasal bir çapraz bağlayıcı içeren sulu polimer çözeltisinin dondurulması sırasında, polimer zincirleri ve çapraz bağlayıcı molekülleri, buz kristalleri arasındaki sıvı kanallar içindeki buz konsantratından dışarı atılır, böylece çapraz bağlanma reaksiyonları sadece bu donmamış bölgeler içinde ilerlemektedir. Çapraz bağlandıktan ve buz çözüldükten sonra, mikro yapısı oluşan buzun negatif kopyası olan makro gözenekli bir malzeme üretilmektedir (Cunniff, Fossey, Auerbach, Song, 1993; Ishaug, Crane, Miller, Yasko ve Yaszemski, 1997; Ishaug-Riley, Crane-Kruger, Yazemski ve Mikos, 1998; Agrawal ve Ray, 2001; Hubbell, 2003; Yeo, Lee, Lee ve Kim, 2003; Hino, Tanimoto ve Shimabayashi, 2003; Nazarov vd., 2004).

Faz ayırma tekniği ile hazırlanan mekanik olarak zayıf makro gözenekli jellerin aksine kriyojenler çok serttir ve kalıcı deformasyon veya kırılma olmaksızın çok büyük suşlara dayanmaktadır. Bu teknik ile % 90 gözeneklilik ve sıkıştırma sonrası yüksek mekanik stabilite gösteren makro gözenekli fibroin kriyojenler üretilmiştir. Zayıf ve kırılgan fibroin hidrojellerinin aksine, kriyojellerin içinde su bulunduğu kriyojenler çatlak oluşmadan yaklaşık % 100 suşa kadar sıkıştırılabilmektedir. Sıkıştırılmış kriyojel, orijinal şeklini geri kazanmak için boşaltma sırasında hemen şişmektedir. Fibroin kriyojellerin dondurarak kurutulmasıyla elde edilen çökeltiler, sentez parametrelerine bağlı olarak 50 ila 10 um arasında değişen, birbiriyle bağlantılı çaplarda gözenekler içermektedir. 50 MPa'ya kadar çok yüksek bir basınç modülü sergilemektedirler ve bu da onları kemik doku iskelesi materyalleri olarak iyi bir aday haline getirmektedir (Ak, Öztoprak, Karakutuk ve Okay, 2013).

Fibroin kriyojellerinin şişmesi, esnekliği ve ağ yapısı incelendiğinde ise, jel örnekleri standart fibroinlere göre daha fazla sıkıştırıldığı için önemli farklar gözlemlenmiştir. Fibroin hidrojel, 50°C'de, düşük deformasyon altında kırılarak, uygulanan mekanik stresin, etkili dağılım olmadan lokalize olduğunu göstermektedir. Önemli nokta, kriyojenin pistonun altında veya el ile sıkıştırılmasıyla, jelin tüm suyu serbest bırakarak tamamen sıkıştırılabilmesidir.

Kriyojellerde hiçbir enerji dağıtma mekanizması kullanılmamasına rağmen, stres altındaki gözeneklerden suyun salınması büyük deformasyon oranlarında çatlak oluşumunu önlemektedir. Yükün serbest bırakılmasından sonra jel örneği, serbest bırakılan suyu emerek orijinal şeklini hemen geri kazanmaktadır.

Sıkıştırılmış kriyojel, orijinal şeklini geri kazanmak için boşaltma sırasında hemen şişmektedir. Sıkıştırma döngülerinin % 0 ile % 99,8 arasında değişmesi, fibroin kriyojellerin ayırma işlemlerinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Kriyojellerin dondurularak kurutulması ile elde edilen çökeltiler, sentez parametrelerine bağlı olarak 50 ila 10 um arasında değişen, birbiriyle bağlantılı çaplarda gözenekler içermektedir (Ak, Öztoprak, Karakutuk ve Okay, 2013).

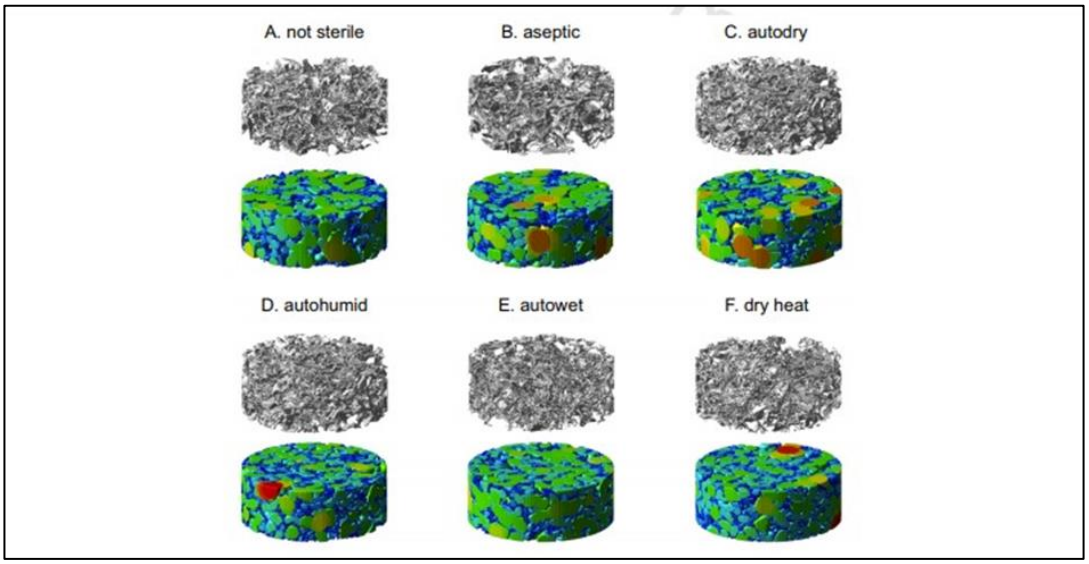
Fibroin çözeltileri veya fibroin iskeleler sterilizasyon işlemlerinde kullanılan sıcaklık ve basınç değerlerine maruz bırakıldığında herhangi bir çapraz bağlayıcı veya reaktif kullanmadan gözenek yapısının arttığı, beta sheet (beta tabakalar)ın arttığı, bağların farklı şekillerde kırılarak yeni bağlar oluşturduğu ve bu sayede mekanik mukavemet kazandığı yapılan çeşitli çalışmalar ile tesbit edilmiştir. Otoklavlama yöntemi, ipek fibroinin kritik yapısal yeniden düzenlemelerine yol açarak, bozunma ve mekanik özellikleri etkilemektedir (Hofmann, Stok, Kohler, Meinel ve Müller, 2014).

3.2. Buharlı Otoklav Yöntemi

İskeleler kuru halde, su ile nemlendirildikten sonra nemli halde, su içerisine daldırıldıktan sonra ıslak halde cam petri kaplarda paketlenmiştir. Buhar sterilizasyonu 121 °C'de ve 20 dakika boyunca 1 bar basınçta gerçekleştirilmiştir.

3.3. Kuru Hava Etüvlerinde Isıl Sterilizasyon

Kuru iskeleler bir cam petride paketlenmiş ve etüvde 30 dakika 180 ° C'de ısıyla sterilize edilmiştir (Hofmann vd.,2014). Sterilizasyon işlemleri sonucunda elde edilen iskelelerin muhtemel yapısal görüntüleri Şekil 3.1'te verilmiştir.



Şekil 3.1. Sterilizasyon işlemleri sonucunda elde edilen iskelelerin yapısal görüntüleri (Hofmann vd.,2014)

İskele sterilizasyonundan sonra iskele morfolojisinde bariz farklılıklar tespit edilememiştir. Tüm iskeleler, % 80'lik bir makroporoziteye sahip, oldukça düzensiz bir gözenek sistemi göstermiştir. Ortalama gözenek çapının 200 µm'ye yakın olduğunu ve bu nedenle de porojen çapından (300-400 µm) çok daha küçük olduğunu göstermiştir. Bu parametreler iskelenin kuru durumunda değerlendirildiğinden, bu fark kurutma işlemi sırasında iskele büzülmesine atfedilebilmektedir.

Sadece nemli bir durumda otoklavlanmış iskelelerin, gözenek büyüklüğü dağılımının belirgin olmayan bir genişlemesi ve daha küçük bir ortalama gözenek çapına doğru bir kayma ile işaret edilen sterilizasyon işleminden etkilenmiş gibi görünmektedir.

Kruskal-Wallis testi, iskele gözenekliliğinin sterilizasyon yönteminden etkilendiğini doğrulamıştır ($p < 0,05$). Mann-Whitney testi ile eş zamanlı karşılaştırması, nemli bir durumda otoklavlanmış iskelelerin, sterilize edilmemiş iskeleler ya da herhangi bir başka sterilizasyon metodu (her bir karşılaştırma için $p < 0,05$) ile karşılaştırıldığında sterilizasyon dışında önemli ölçüde azalmış gözeneklilik olduğunu göstermiştir.

Ortalama iskele gözenek çapı ve iskele yüzey yoğunluğu, sterilizasyondan önce veya sonra önemli bir farklılık göstermemiştir. Genel olarak, çoğu sterilizasyon metodu, derecelendirilmemiş iskelelere kıyasla artan bir varyansa doğru bir eğilim göstermiştir.

Farklı sterilizasyon prosedürlerinden önce ve sonra iskelelerin yüzey topografisi SEM(Taramalı Elektron Mikroskobu) ile değerlendirilmiştir. Görüntüler, iskelelerin yüksek gözenekliliğini ve gözenek ara bağlantılarını doğrulamaktadır. Yüzey topoğrafyasının ayrıntılı bir görünümü, yüzeyin pürüzsüz olmadığı, daha çok tabaka olduğu ve 1 ila 10 μm arasında çok sayıda çapa sahip olduğunu göstermiştir. Morfometrik parametreler, tüm sterilizasyon yöntemlerinden sonra daha küçük bir gözenek boyutu dağılımına doğru bir eğilim göstermişlerdir.

Özellikle iskelenin mekanik özellikleri önem taşıdığında, bu yöntem uygun olduğundan ve iskelenin ilk mekanik özelliklerini etkilemeyecek ve hatta düşürmeyecek şekilde, iskelelerin kuru bir durumda otoklavlanması önerilmektedir. Sterilizasyon yönteminin hücre farklılaşması ve hücre dışı matris üretimi üzerindeki etkisi her hücre tipi ve doku incelemesi için ayrı ayrı belirlenmelidir.

Mekanik, termal, optik ve dielektrik özellikleri gibi ipek ipliklerin fiziksel özellikleri, ipeğin yapısına ve beta-sheet tabaka kristallerinin içeriğine bağlı olarak değişmektedir. Bu tabakalar, çeşitli yöntemler ile indüklenmektedir. En yüksek β-tabaka kristallik (% 60), tabakaların hem yüksek sıcaklık hem de yüksek basınç tarafından indüklendiği buhar-otoklavlama yoluyla elde edilmektedir. Düşük β yaprak içerikli materyal, oda sıcaklığında suyla tavlama yöntemiyle elde edilmektedir; bu, büyük miktarda ipek I sarmal yapısı ile karıştırılmış % 30 β yaprak içeriğine yol açmaktadır (Hu, Shmelev, Sun, Gil, Park, Cebe ve Kaplan, 2011).

Hoffman ve ark.(2014), nemli haldeki otoklavlamanın fibroin iskele gözenekliliğini etkilediğini, kuru hallerde otoklavlamanın mekanik özellikleri etkilediğini ve tüm sterilizasyon tekniklerinin ipek fibroin iskelelerinin fiziksel özelliklerinde değişkenliği artırdığını tesbit etmişlerdir.

Moraes ve ark.(2013), sıkıştırılmış köpük ve liyofilizasyon ile yapılan yoğun ipek fibroin filmleri ve gözenekli ipek fibroin membranları üzerinde farklı sterilizasyon tekniklerinin (otoklavlama, UV veya gama irradyasyonu, etilen oksit ve % 70 hacim-% etanol içine daldırma) etkilerini araştırmıştır. Etanol, otoklavlama ve etilen okside maruz kalmanın, iskelelerin kristallenmesini ve mekanik özelliklerini etkilediğini ve bu etkilerin biyomateryalin türüne bağlı olduğunu kanıtlanmışlardır.

Zhao ve ark.(2011), farklı sterilizasyon tekniklerinin ipek fibroin fiberleri üzerindeki etkilerini incelemiş ve lifler otoklavlama ile sterilize edildiğinde sekonder yapıda ve mekanik özelliklerdeki değişikliklerini bulmuşlardır. [66] Bu çalışmanın amacı, farklı sterilizasyon tekniklerinin liyofilize 3 boyutlu gözenekli ipek fibroin iskelelerinin özellikleri üzerindeki etkilerini değerlendirmektir. Liyofilize ipek fibroin iskeleleri yumuşak doku implantları için geniş açıdan araştırılmaktadır.

Liyofilize ipek fibroin iskeleleri sulu ipek fibroin solüsyonunun dondurulmasıyla üretilir, ardından suyu uzaklaştırmak için liyofilizasyon yapılır ve böylece buz kristalleri uzaklaşırken gözeneklere dönüştürmektedir. Gözenek büyüklüğü ve şekli, donma hızının bir fonksiyonudur ve bir dizi gözenek büyüklüğüne ve hizalanmış gözeneklere sahip iskeleler oluşturmak için yönlü dondurma seçeneği de değerlendirilmektedir. Ayrıca, liyofilizasyon ipek fibroin iskelelerinin yapısal bütünlüğünü de korumaktadır (Rnjak-Kovacina, DesRochers, Burke ve Kaplan, 2015).

Steril ipek fibroin iskeleleri iki şekilde hazırlanabilir: ipek fibroin solüsyonu sterilize edilebilir, ardından steril koşullar altında iskele oluşumu yapılır ya da iskeleler oluştuktan sonra sterilize edilebilmektedir. Sterilizasyon tekniğinin avantajları ve dezavantajları Tablo 3.2'de verilmiştir. Sıvı ipek fibroin çözeltisinin sterilizasyonu, yüksek basınçta doymuş bir buhar çevriminde 20 dakika süreyle 121°C'de otoklavlama yoluyla yapılmaktadır (Rnjak-Kovacina vd., 2015).

Tablo 3.2. *Sterilizasyon tekniğinin avantajları ve dezavantajları (Rnjak-Kovacina vd., 2015)*

	Teknik	**Sterilizasyon Koşulları**	**Sterilizasyon Prensipleri**	**Avantajlar**	**Dezavantajlar**
Sıvı Fibroin	Otoklavlama	Yüksek basınç doymuş buhar; 121°C, 20 dk. sıvı döngüsü	Koagülasyon hayati mikrobik proteinler ve hücresel bileşenler	Hazır, sitotoksik olmayan, maliyetli	Fiziksel özellikleri,MW ve değişir, protein agregasyonu , mekanik özellikleri değişir.
Fibroin İskele	Otoklavlama	Yüksek basınç doymuş buhar; 121°C, 20 dk. katı döngü	Koagülasyon hayati mikrobik proteinler ve hücresel bileşenler	Hazır, sitotoksik olmayan, maliyetli	İpek fibroin iskelelerinin fiziksel özelliklerini değiştirir: bozunma oranı ve sıkıştırma modülü değişir.
Fibroin İskele	Kuru Sıcak	Yüksek Sıcaklık, 180°C, 30 dk	Hücresel bileşenlerin oksidasyonu-pıhtılaşması	Hazır, uygun maliyetli	Biyolojik moleküller ile fonksiyonel hale getirilmiş ipek fibroin iskeleleri için geçerli değildir.

Termal sterilizasyon protokolleri, özellikle otoklavlama yoluyla buhar sterilizasyonu biyomedikal polimerler ve özellikle proteinler için mekanik ve bozunma özelliklerinde büyük değişikliklere neden olmaktadır (Rogers, 2012).

Bununla birlikte, ipek fibroininin benzersiz mekanik ve stabilite özelliklerinden ötürü, otoklavlama, ipek fibroin esaslı biyomateryalleri sterilize etmek için, beta-tabaka içeriğini en üst düzeye çıkarmak ve böylece sertlik ve dayanıklılık için rutin olarak kullanılmaktadır. Bir dizi sentetik ve doğal polimerin fiziksel özelliklerini etkilediğini ve bunun da moleküler ağırlık dağılımı, bozunması ve mekanik özelliklerinde değişikliklere neden olduğunu göstermiştir (Zhao, Yan, Ding, Yang ve Gu, 2011; Rogers, W., 2012; Moraes, Weska ve Beppu, 2013; Rnjak-Kovacina vd.,2015).

Otoklavlanmış iskeleler, her zaman noktasında sterilize olmayan iskelelere kıyasla kütle olarak önemli ölçüde daha az kayıpla birlikte bozunmaya karşı en dirençli olmuştur. Diğer sterilize edilmiş iskeleler, zaman içinde bozulma derecesinde, steril olmayan iskelelerle benzer durumda kalmıştır. Otoklavlamayı takiben ipek fibroinindeki değişiklikler muhtemelen ipek fibroinin amorf bölgelerindeki değişikliklerin bir sonucudur. Otoklavlamanın, ipek fibroin zincir ağının amorf bölgelerindeki inter ve intra-moleküler etkileşimlerinde daha büyük bir kısıtlamayı teşvik ettiğini, böylece beta-tabaka içeriğinden bağımsız olarak, ipek fibroin iskelelerinin mekanik özelliklerini ve degradasyonunu etkilediğini göstermiştir (Rnjak-Kovacina vd.,2015).

Yüksek sıcaklıklarda ipek liflerinin ısıl işleminin, amorf bölgelerde yoğunlaşan moleküler hizalanma kaybına yol açtığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Bununla birlikte, sheet-yaprak kristal yapıları da etkilenir ve bunlar kademeli olarak rastgele yapılara dönüşmektedir (Hashimoto, Taniguchi, Kameda ve Tamada, 2015; Jaramillo-Quicenoa, Álvarez-López ve Restrepo-Osorio, 2017).

4. FİBROİNİN BASINÇ DEĞİŞİMLERİNE TEPKİSİ

4.1. Fibroinin Yapısında Meydana Gelen Farklılaşmalar ve Doku İskelesi Üretimi Üzerindeki Etkileri

Elastik modül, iskele tamamen elastik olduğunda stresin gerilime oranıdır; aynı zamanda sertlik ve sıkıştırma mukavemetinin bir ölçüsü, kırılma olmaksızın sürdürülebilen maksimum mühendislik gerilmesidir.

Yapılan çalışmalar neticesinde NaCl ile porojen arındırma yöntemiyle üretilmiş iskelelerin gözenekliliği % 84 ile % 98 arasında değişen bir basınç dayanımı ile 175 (3 kPa) arasında değişmiştir ve gaz köpürtülmüş iskeleler % 87-97 arası gözeneklere ve 280'e kadar basınç dayanımına sahip olduğu bulunmuştur. Bu iskelelerin gözenekliliği % 99'a kadar ve maksimum basınç dayanımı 30'dur. (2 kPa). Tuz ile porojen arındırma yöntemi ile yüksek sıkıştırma mukavemeti, birbirine bağlı gözenekler ve gözenek büyüklüklerinin faydalı bir kombinasyonuna sahip iskeleler üretilmiştir. Çapı 100 mikrondan daha yüksek olan gözenek boyutları biyomedikal uygulamalarda kullanım için ideal fibroin bazlı 3 boyutlu matrislerin oluşturulabildiğini göstermektedir.

Fibroin için şimdiye kadar bulunan en büyük basınç modülü ve basınç mukavemeti gaz köpürtme tekniği ile üretilen skalalar sırasıyla 3 MPa ve 60 kPa'dır. Bu çalışmada hazırlanan kriyojenizasyon tekniği ile kriyojel skalaları 16 kat daha büyük modül ve mukavemet göstermektedir (48 ± 10 MPa ve sırasıyla 970 ± 50 kPa). Kriyojel çekirdeğinin olağanüstü mukavemeti, gözenek duvarlarının yüksek fibroin konsantrasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu aynı zamanda, şişmiş hallerinde kriyojenlere yüksek derecede sertlik sağlamaktadır (Ak vd., 2013).

Yapılan başka bir çalışmada, -80°C'de hazırlanan, %15 ve % 25 konsantrasyonlarda metanol ve 2-propanol ile muamele edilen fibroin iskelelerin basınç dayanımı ve basınç katsayısında bir artış söz konusudur. Bu artış, sıcaklık düşüşünün neden olduğu artan donma hızına bağlı olmaktadır.

Mekanik olarak ezildiğinde, iskeleler parçalara ayrıldığında ve porojen arındırma yöntemiyle üretilen iskelelerde, % 87 gözenekli, % 97 gözenekli iskeleler arasındaki basınç gerilmelerinde önemli bir fark bulunmaktadır. Yüksek gözenekli iskeleler, düşük gözenekli iskelelerden daha düşük bir basınç dayanımına sahiptir (Nazarov vd., 2004).

Gaz köpüklü iskeleler, porojen arındırma yöntemiyle elde edilen iskelelerden daha yüksek bir sıkıştırma mukavemetine ve basınç modülüne sahiptir. Mekanik özelliklerdeki bu farklılığın nedenleri, daha tutarlı mekanik özelliklere veya gözenek boyutlarındaki farklılıklara yol açan gaz köpürtme iskeleleri içindeki gözeneklerin homojen dağılımı olabilmektedir. Matrise uygulanan stres gözenek ara yüzeylerinde yoğunlaşır ve eğer gözenek dağılımı eşit değilse, bu durumda polimer matrisi tipik olarak daha düşük bir basınç dayanımı ile deforme olabilmektedir. Tuzla yıkanmış-porojen arındırma işlemi ile elde edilen iskeleler hem açık hem de kapalı gözenekli yapılardan oluştuğundan sıkıştırma kuvvetlerinin dağılımı eşitsizdir ve bu da iskelenin daha az stres altında çökmesine neden olmaktadır.

Genellikle doku mühendisliği çalışmalarında göz önüne alınan gözenekli biyolojik olarak parçalanabilir polimerik iskelelere kıyasla, ipek fibroin gözenekli iskeleler % 1 ve % 2 suşta benzer özelliklere sahiptir. Gaz köpüklü iskeleler en yüksek basınç katsayısını göstermiştir. Bu veriler aynı zamanda kortikal kemik ve kıkırdak gücü ile karşılaştırılabilmektedir (Nazarov vd., 2004).

5. MATERYAL ve METOD

5.1. Kimyasal ve Reaktifler

Çalışmalarda doku mühendisliği uygulamalarına yönelik biyomalzeme üretimi hedeflendiğinden hücre kültüründe test edilmiş, yerine göre mikroskopi saflığında, analitik saflıkta (ya da daha yüksek saflık düzeyindeki) kimyasallar ve reaktifler kullanılmıştır.

Hücreler, kültür kaplarından pasajlama sırasında Tripsin ve EDTA (Sigma, ABD) kullanılarak ortamdan ayırılmışlardır.

İpek fibroini, Kozabirlik Sınırlı Sorumlu Bursa Koza Tarım Satış Koop. Birliğinden temin edilen ipek kozasından kimyasal ayrıştırma, çözme ve saflaştırma işlemleri ile elde edilerek kullanılmıştır.

Hücrelerin in vitro kültüründe kullanılmak üzere hazırlanan kültür sıvısında; MEM (Gibco, UK), fetal sığır serumu (FBS) (Sigma, ABD), penisilin/streptomisin/amfoterisin (Sigma, ABD), DMEM (Sigma) kullanılmıştır.

SEM örneklerinin hazırlanması aşamasında, hücrelerin tespiti için %2,5'lik glutaraldehit (Sigma, ABD) çözeltisi kullanılmıştır.

Hücrelerin mitokondriyal dehidrojenaz aktiviteleri, MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür]'ye dayalı ticari bir kit (Sigma, ABD) kullanılarak ölçülmüştür.

Biyobozunurluk süresinin tesbiti için Hank'in dengeli tuz çözeltisi (Sıgma-Aldrıch, ABD) kullanılmıştır.

5.2. Deney Planı

Tez çalışması kapsamında yapılacak işlemlerde belirli bir düzen takip edilmiştir. Bu işlemler aşağıda listelenmiştir. Söz konusu işlemlerin akabinde elde edilen numunelerin karekterizasyon işelmeleri yapılmıştır.

1. Bombyx Mori İpek böceği kozasından fibroin eldesi
2. Ajisawa çözeltisinin hazırlanması
3. Fibroin çözeltisinin eldesi
4. Fibroin çözeltisinde pH değişimlerinin yapılması
5. Liyofilizasyon ile fibroin iskele üretimi
6. Vakumlu etüv ile fibroin iskele üretimi
7. Fibroin ve fiboin iskelelerin buharlı otoklav ile muamelesi
8. Fibroin iskelelerin Etüv-sterilizatör ile muamelesi
9. Analizler

5.3. Bombyx Mori İpek Böceği Kozasından Fibroin Eldesi

İpek iki tip proteinden oluşmaktadır. Birincisi ipeğin yapısını oluşturan lifli yapıdaki fibroin ve diğeri bu yapıyı sararak birarada tutan, yapışkan özelliğe sahip serisin proteinidir. Öncelikli olarak yapıyı birarada tutan serisin uzaklaştırılmıştır. Akabinde geriye kalan fibroin lifler suda çözünür hale getirilerek saflaştırılmıştır.

5.3.1. Bombyx Mori İpek Böceği Kozasından Serisinin Uzaklaştırılması

Fibroinin, saf olarak elde edilerek biyomalzeme yapımında kullanılabilmesi için ipeğin yapısından serisinin uzaklaştırılması gerekmektedir. Serisin, alkali tuz çözeltileri ya da deterjanlar kullanılarak yapıdan yıkama işlemleri ile bertaraf edilerek fibroin lifler elde edilmektedir.

Serisin, Wang ve ark. (2008), tarafından verilen genel prosedüre göre, koza parçalarının 0,02 M Na_2CO_3 (Mw: 105,99 g/mol, Sıgma-Aldrıch, USA) çözeltisi içerisinde sıcakta yıkanması suretiyle uzaklaştırılmıştır. Bu işlem için aşağıdaki işlem basamakları takip edilmiştir:

1. 500 ml kaynayan su içerisine derişimi 0,02 M olacak şekilde 1,06 g Na_2CO_3 dikkatlice eklendi.
2. Kozalar makas yardımıyla kesilerek içerisindeki böcek kalıntıları temizlendi. Bu aşamada kozaların kirli kısımları kullanılmayarak atıldı. Temizlenen kozalar diseksiyonla küçük parçalara ayrıldı. Kaynayan çözelti içerisine 10 g ince kesilmiş ipek kozası eklenerek magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak 30 dk kaynatıldı. Sürenin aşılması durumunda verimde kayba neden olduğu, sürenin kısa olmasında ise serisinin yapıdan tam olarak uzaklaştırılamadığı tespit edildiğinden kaynama süresine özellikle dikkat edilmiştir.
3. Tuzun uzaklaştırılması için lifler 20 dk karıştırıcı üzerinde destile su ile 2 kez yıkandı.
4. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra lifler fazla suyu sıkıldıktan sonra oda sıcaklığında çeker ocak içerisinde yaklaşık 3 gün süreyle kurumaya bırakıldı.
5. Kuruyan fibroin lifleri tartılarak verim ve uzaklaştırılan serisin miktarı hesaplandı. Serisinin yapıdan tamamen uzaklaşması FTIR ile test edildi.

5.3.2. Fibroin Liflerinden Saf Fibroin Çözeltisinin Hazırlanması

Fibroin liflerin ise tam olarak saflaştırılarak malzeme yapımında kullanılabilmesi için saf çözelti haline getirilmesi gerekmektedir. Fibroin, konsantre asit çözeltilerinde (fosforik, formik, sülfürik, hidroklorik) ve konsantre edilmiş sulu-tuz çözeltilerinde çözülmektedir. LiSCN, LiBr, $CaCl_2$, $Ca(SCN)_2$, $ZnCl_2$, NH_4SCN, $CuSO_4$, NH_4OH, $Ca(N0_3)_2$ fibroini çözmek için kullanılmaktadır.

Sulu tuz sistemlerinin çözünebilirliği tuz konsantrasyonuna bağlıdır ve aşağıdaki sırayla artar: anyonlar için, sülfat < sitrat < tartrat < asetat < klorid < nitrit < bromür < iyodür < tiyosiyanat < dikloroasetat; katyonlar için, $Ca_2^+ < Sr_2^+ < Ba_2^+ < Li^+ < Zn^{2+}$ (Langer ve Vacanti, 1993; Vollrath, 1999; Wanga vd., 2006).

Bazı tek bileşenli organik çözücülerde-heksafluoroizopropanol, heksafluoroaseton-fibroin sadece ön aktivasyonundan sonra çözülebilmektedir. Fibroin aktivasyonu,

proteinin bir sulu tuz çözeltisi içinde çözülmesinden sonra çözeltinin diyalizinden ve polimerin kuru çözelti ile sulu çözeltiden bir film olarak geri kazanılmasından oluşmaktadır (Bini, Knight ve Kaplan, 2004; Rising ve Nimmervoll, 2005).

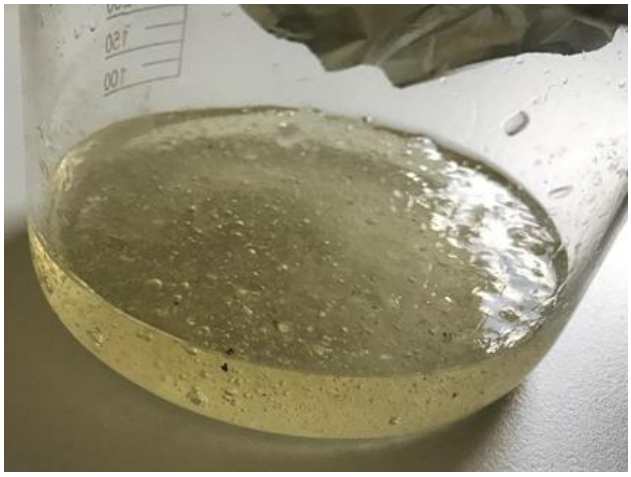
Yürütülen tez çalışmasında LiBr ve Ajisawa çözeltisi kullanılarak fibroin suda çözünür hale getirilmiştir. Çözme işleminin ardından ortamda yüksek konsantrasyonda bulunan tuzlar diyaliz işlemi ile ortamdan uzaklaştırılmıştır.

5.3.2.1. Ajisawa metodu ile fibroin çözeltisinin eldesi

Akıyoshı AJISAWA (1998), fibroinin sulu çözeltilerinin, polipeptit zincirlerini kırmadan sadece moleküller arası bağların ayrışmasıyla elde edilmesi üzerine çalışmalar yaparak, hafif koşullar altında kolayca fibroin çözen bir çözücü elde etmiştir. Ajisawa, bir $CaCl_2$-H_2O-EtOH (Sigma-Aldrıch, GERMANY), sisteminde fibroinin çözünürlüğünü incelemiş ve en yüksek çözünürlüğü l:8:2'lik mol oranına sahip bir çözücünün ortaya çıkardığını bulmuştur. Optimum deney şartlarını ise 55 °C'ye, 1 saat olarak belirlemiştir. Literatürdeki Ajisawa'nın deney şartları esas alınarak farklı deney prosedürleri hazırlanıp test edilmiştir ve sonuç olarak 1:8:2 mol oranı ve 1:8:1 mol oranına göre yapılan işlemlerin yüksek verimle fibroinin çözünmesini sağladığı tespit edilmiştir.

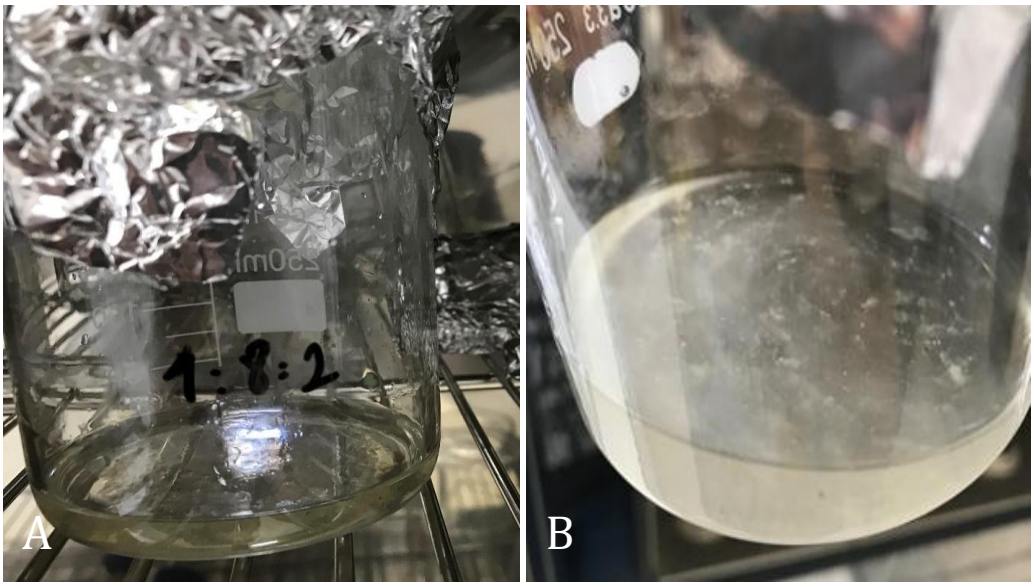
Ajisawa çözeltisi, $CaCl_2$-H_2O-EtOH kullanılarak 1:8:2 mol oranına göre hazırlandı ve toplam kütlesi 383 gr, toplam çözelti hacmi 300 ml olarak ölçüldü. Burada yapılan hesaplama sonucunda toplam çözelti miktarının kaç gram fibroini çözebileceğine yönelik 7 farklı oransal yöntem izlendi.

Sonuç olarak, 1,67 gr fibroinin 25 ml Ajisawa çözeltisi içerisinde, 55°C'ta çözünmesi ile en uygun sonucun elde edildiği (Şekil 5.1) tespit edildi.



Şekil 5.1. Ajisawa çözeltisi kullanılarak fibroin çözeltisinin elde edilmesi

Ajisawa'nın $CaCl_2$-H_2O-EtOH karışımından alkol oranını azaltmak için 1:8:1'lik molar oranına göre de hesaplamalar yapıldı ve bu miktarlara göre yeni bir Ajisawa çözeltisi (Ajisawa-1) hazırlandı. Bu çözelti kullanılarak yine 1,67 gr fibroin 25 ml Ajisawa-1 çözeltisi kullanıldı ve ortam sıcaklığı 55 °C'ye ayarlandı. Her iki çözelti ile elde edilen sonuçlar Şekil 5.2'de karşılaştırmalı olarak verildiği üzere, benzer verimde fibroin çözeltisi elde edildi. Bu nedenle sonraki aşamalarda Ajisawa-1 çözeltisi kullanılarak işlemlere devam edildi.



Şekil 5.2. 1:8:2 mol (A) ve B. 1:8:1 mol (B) Ajisawa çözeltisiyle hazırlanan fibroin çözeltilerinin karşılaştırılması

5.3.2.2. Diyaliz işlemi

Fibroin çözeltisi, içerisindeki tuzdan arındırılması için diyaliz membran içerisine alınarak saf suda 3 gün süresince diyaliz edildi. Diyaliz işlemi için diyaliz membran içerisindeki fibroin çözeltisi 500 ml bidestile su içerisine alınarak Şekil 5.3'te verildiği gibi magnetik karıştıcı üzerinde inkübe edildi. Diyaliz suyu ilk gün için: 1inci, 3üncü, 4üncü ve 8inci saatte sonrasında ise 12 saatte te bir olacak şekilde değiştirildi. Diyaliz işleminin bitimine müteakip fibroin çözeltisi 50 ml'lik santrifüj tüp içerisine alınarak 4500 rpm'de 20 dk santrifüjlenerek pelletten (kirlilikler vs.) arındırıldı. Hazırlanan fibroin çözeltisinden 500 µl'lik 2 örnek alınarak iki farklı tartım kabına konuldu ve etüvde kurutularak analitik terazide tartıldı. Elde edilen tartım sonucuna göre çözeltinin % derişimi tespit edildi.



Şekil 5.3. Ajisawa çözeltisiyle hazırlanan fibroin çözeltisinin diyaliz membran kullanımı ile osmoz olayı kullanılarak saflaştırılması işlem adımları.

5.4. Fibroin Çözeltilerinin Farklı pH'larda Ayarlanması

Fibroin, oldukça özgün protein yapısıyla etkileşimde olduğu malzemelere karşı amfoterik özellik göstermektedir. Bu özellik doğrultusunda fibroinin pH değişimlerinin yapılması planlanarak meydana gelebilecek davranışsal farklılıkları ve doku iskelesi hazırlığında yapıya ne gibi etkileri olacağı FTIR. TGA ve SEM ile incelendi.

Standart koşullarda elde edilen bir fibroin çözeltisinin pH değerİ 6-6,5 arasındadır. Fibroin çözeltilerinde pH 5'in altına inildiğinde ve pH 8'in üzerine çıkıldığında jelleşme gözlendiğinden pH değişimleri için planlanan pH aralığı 5, 6, 7 ve 8 olarak seçildi. pH değişimleri 1N HCl ve 1N NaOH çözeltileri kullanılarak elektronik pH metre (Hanna Instruments, ABD) cihazı ile yapıldı.

5.5. Fibroin İskelelerinin Üretim Yöntemleri

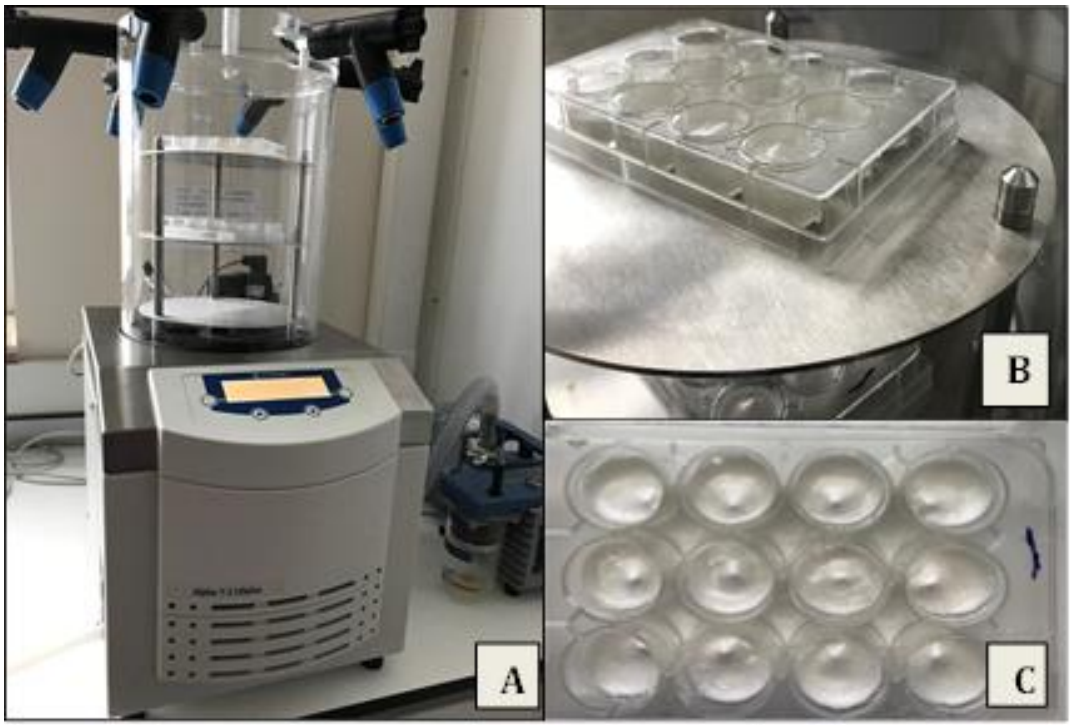
Planlanan deney prosedüründe fibroin doku iskelelerinin üretimi için 7 yöntem belirlendi. Yöntemler genel hatlarıyla standart liyofilizasyon, vakumlu etüv, buharlı otoklav ve etüv kullanılarak gerçekleştirilen işlemlerden oluşmaktadır. Hazırlanan iskelelerin morfolojik yapıları ışık mikroskobu ve SEM; termal özellikleri termogravimetrik analiz; yüzey özellikleri civalı porozimetre ve helyum piknometre ile analiz edilmiştir.

Üretim yöntemleri ve ortamdaki fizikokimyasal şartlar şöyledir:

1. Standart Liyofilizasyon Standart Liyofilizasyon İşlemi (Vakum-Çok düşük sıcaklık etkisi)
2. Porojen Arındırma Yöntemi ve Vakumlu Etüv İşlemi (Oda koşulları-sıcak vakum etkisi)
3. Standart Liyofilizasyondan Sonra Kuru Haldeki İskelelerin Otoklavlanması (Çok düşük sıcaklık, vakum-kuru ortam-yüksek sıcaklık, vakum etkisi)
4. Standart Liyofilizasyondan Sonra Islak Haldeki İskelelerin Otoklavlanması (Çok düşük sıcaklık, vakum-sulu ortam-yüksek sıcaklık, vakum etkisi)
5. Standart Liyofilizasyondan Sonra Nemli Haldeki İskelelerin Otoklavlanması (Çok düşük sıcaklık, vakum-nemli ortam-yüksek sıcaklık, vakum etkisi)
6. Standart Liyofilizasyondan Sonra Kuru Haldeki İskelelerin Etüvde Yüksek Sıcaklık Muamelesi (Çok düşük sıcaklık, vakum-kuru ortam-yüksek sıcaklık etkisi)
7. Fibroin Çözeltisinin Otoklavlanmasından Sonra Liyofilizasyon ile Kurutulması (Sıvı form-yüksek sıcaklık, vakum etkisi- Çok düşük sıcaklık, vakum)

5.5.1. Liyofilizasyon ile 3B İskele Üretimi

pH değişimleri tamamlanan 5, 6, 7 ve 8 pH larındaki fibroin çözeltilerinden 3'er ml alınarak 12'li kuyucuklu petrilere aktarıldı. Hazırlanan numuneler -20°C'de 3-4 saat, ardından -86°C'de 24 saat bekletildi. Bu işlemler tamamlandıktan sonra numuneler liyofilizasyon işlemi için Şekil 5.4'de verildiği gibi liyofilizatöre (Christ AlpHa 1-2 LD Freeze Dryer) alındı ve 24 saat süreyle -55°C'de kurutuldu.

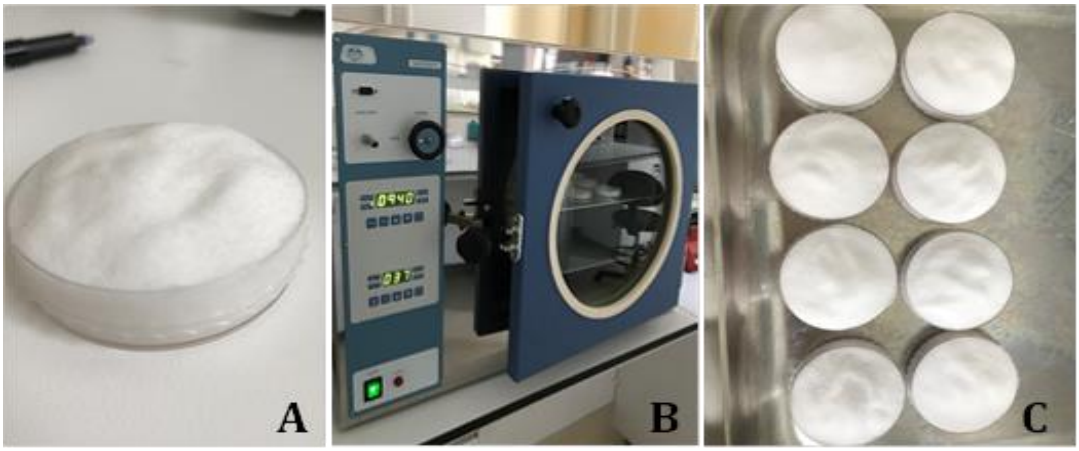


Şekil 5.4. A. Liyofilizasyon cihazı B. Liyofilizasyon işlemi için liyofilizatör cihazına yüklenen numuneler C. Liyofilizasyon işlemi sonrası elde edilen fibroin iskeleler.

5.5.2. Vakumlu Etüvde 3B İskele Üretimi

Çapları 5 cm olan cam petrilerin tabanlarına tanecik boyutları 300-425 nm olan NaCl'den 10'ar gram tartıldı ve yayıldı. Farklı pH'larda (5, 6, 7 ve 8) hazırlanan fibroin çözeltilerinden her bir petriye 10'ar ml düzgün ve yavaşça döküldü. Daha sonra 45'er gram NaCl tartılarak tüm fibroin üzerine homojen olarak yayıldı, ıslak bir bölge kalmayana kadar tuz ilavesi yapıldı (Şekil 5.5-A). Hazırlanan numuneler daha sonra kurutulmak üzere vakumlu etüv cihazına(J.P. SELECTA,s.a-4001490)

koyuldu(Şekil 5.5-B). İşlem 37°C'de tam vakum(%100) altında 24 saat kurumaya bırakıldı.



Şekil 5.5. A.ve C. Vakumlu etüve yüklenmek üzere hazırlanan numuneler B. Vakumlu Etüv içerisine kurutma işlemenin gerçekleştilmesi.

24 saat sonunda numuneler NaCl'den arınmaları için distile su içerisinde yıkamaya alındı. Günde 2 kez olmak üzere distile su yenilendi. NaCl fibroin iskelelerden tamamen arındığında iskeleler petrilerden alınıp çeker ocakta kurutuldu. Kurutulan fibron iskeleler Şekil 5.6'da verilmiştir.



Şekil 5.6. Vakumlu etüvde kurutulan pH5 (A), pH6 (B), pH7 (C), ve pH8 (D) porojen arındırma işlemiyle hazırlanmış, distile su içerisinde NaCl'den arındırılmış ve çeker ocakta kurutulmuş fibroin iskeleler

5.5.3. Fibroin İskelelerin Yapısına Sıcaklığın Etkisi

Fibroin yapılar üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için sterilizasyon yöntemleri de dikkate alınarak etüv ve otoklavda kullanımı içeren deney prosedürleri tercih edildi. Bu işlemlerde sıcaklık ve basınç etkilerinin fibroin çözeltisi ve fibroin iskeleleri üzerindeki etkileri incelendi. Uygulanan yöntemler Tablo 5.1'de gösterildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 5.1. *Fibroin çözeltisi ve fibroin iskelelere uygulanan ısıl işlemler*

Kullanılan Cihaz	**Numunenin Durumu**	**Uygulanan İşlem**
Buharlı Otoklav	Kuru İskele	121°C'de, 1 bar, 20 dk
Buharlı Otoklav	Nemli İskele	121°C'de, 1 bar, 20 dk
Buharlı Otoklav	Islak İskele	H_2O İçine daldırılmış iskeleler; 121°C'de, 1 bar, 20 dk
Buharlı Otoklav	Sıvı Fibroin	121°C'de, 1 bar, 20 dk
Kuru Hava-Etüv Sterilizatör	Kuru İskele	180°C'de, 60 dk

5.5.3.1. Buharlı otoklav kullanımı

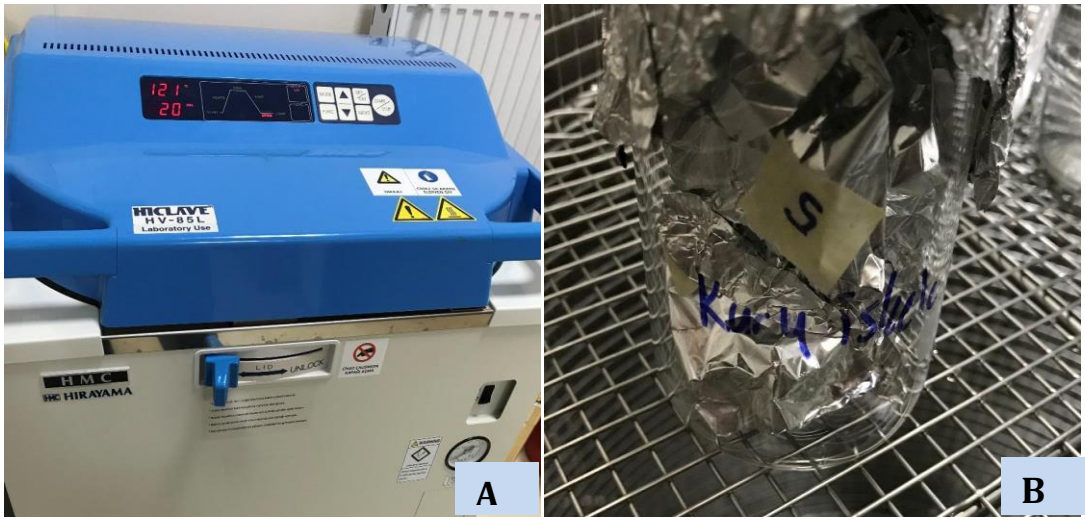
Otoklav işlemleri yüksek buhar basıncı ve yüksek sıcaklık altında gerçekleşmektedir. Deney prosedüründe otoklav işlemleri fibroin iskelelerinin kuru, ıslak ve nemli halde yapılması planlandı. Ayrıca, liyofilizasyon öncesinde sıvı fibroine de otoklavlama işlemi yapıldı. İşlemlerin sonunda elde edilen numunelerin yapısındaki değişimler FTIR, TGA ve SEM analizleri ile tespit edildi.

5.5.3.1.1. Liyofilizasyon işlemi sonrası otoklav kullanımı

Standart liyofilizasyon işlemleri sonucunda elde edilen fibroin iskeleler kullanıldı. Tablo 5.1'de belirtildiği gibi bu yöntem kuru, ıslak ve nemli fibroin iskele kullanımı ile 3 farklı şekilde planlandı.

Kuru haldeki iskelelerin otoklav işlemi

pH'ları 5, 6, 7 ve 8 olan kuru fibroin iskeleler alüminyum folyolara sarıldı. Cam bir petri içerine konuldu. Ardından buharlı otoklava (Hirayama, JAPAN) alındı(Şekil 5.7). İşlem 121°C'de, 1 bar basınç altında, 20 dakika sürede yapıldı.



Şekil 5.7. A. Buharlı otoklav B. Liyofilizasyon sonrasında elde edilen fibroin iskelelerin kuru halde otoklav işlemi için hazırlanmış numuneler

Islak haldeki iskelelerin otoklav işlemi

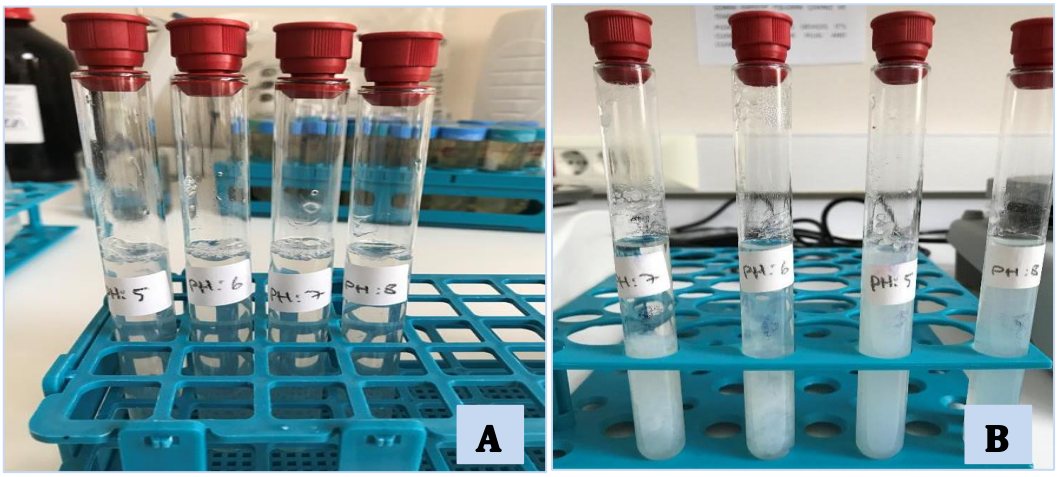
pH'ları 5, 6, 7 ve 8 olan kuru fibroin iskeleler distile su (dH_2O) içine daldırılarak ıslanması sağlandı. Ardından alüminyum folyolara sarıldı. Cam bir petri içerine konuldu. Sonrasında buharlı otoklava (Hirayama, JAPAN) alındı. İşlem 121°C'de, 1 bar basınç altında, 20 dakika sürede yapıldı.

Nemli haldeki iskelelerin otoklav işlemi

pH'ları 5, 6, 7 ve 8 olan kuru fibroin iskeleler 30 dakika süre ile distile su buharına maruz bırakılarak nemli hale getirildi. Ardından alüminyum folyolara sarıldı. Cam bir petri içerine konuldu. Sonrasında buharlı otoklava (Hirayama, JAPAN) alındı. İşlem 121°C'de, 1 bar basınç altında, 20 dakika sürede yapıldı.

5.5.3.1.2. Fibroin çözeltilerinin otoklavlanması sonrası liyofilizasyon

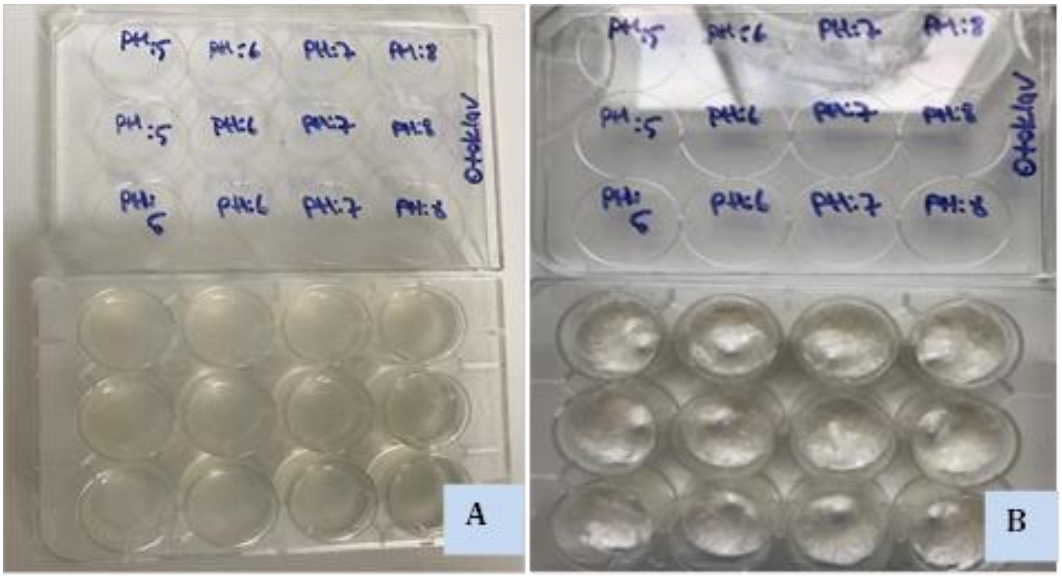
pH'ları 5, 6, 7 ve 8 olan fibroin çözeltileri 10'ar ml olacak şekilde cam deney tüplerine koyuldu. Cam tüplerin ağızları delikli tıpa ile kapatıldı ve alüminyum folyoya sarıldı. Bir beher içerisinde buharlı otoklava (Hirayama, JAPAN) alındı(Şekil 5.8). İşlem 121°C'de, 1 bar, 20 dk gerçekleştirildi.



Şekil 5.8. A. Sıvı fibroinin otoklavlama işlemine hazırlanması B. Otoklavlama işlemi sonrası sıvı fibroinler

Otoklavlama işlemi tamamlanan fibroin çözeltileri oda sıcaklığına ulaşana kadar bekletildi. Ardından kuyucuklu petrilere koyuldu. 4 saat süreyle -20°C donduruya, sonrasında bir gece boyunca -86°C dondurucuya alındı. Dondurma işleminden sonra numuneler kurutulmak üzere liyofilizatöre konuldu(Şekil 5.9).

24 saat süreyle kurutma işlemi gerçekleştirildi. Liyoflizatörden çıkartılan numuneler çeker ocak içerisnde kapağı yarı açık olacak şekilde 1 gece bekletildi.



Şekil 5.9. A. Otoklavlanan sıvı fibroinin liyofilizasyon işlemine hazırlanması B. Otoklavlanan sıvı fibroinden liyofilizasyon ile elde edilen iskeleler

5.5.4. Etüv-Sterilizatör İşlemleri

Standart liyofilizasyon işlemleri sonucunda elde edilmiş pH'ları 5, 6, 7 ve 8 olan kuru fibroin iskeleler alüminyum folyolara sarıldı. Cam bir petri içerine koyuldu. Ardından etüv-sterilizatör cihazına (Universal Oven UN110, GERMANY) alındı. İşlem kuru sıcak altında 180°C'de, 30 dakika sürede gerçekleştirildi.

5.6. Biyouyumuluk Analizi

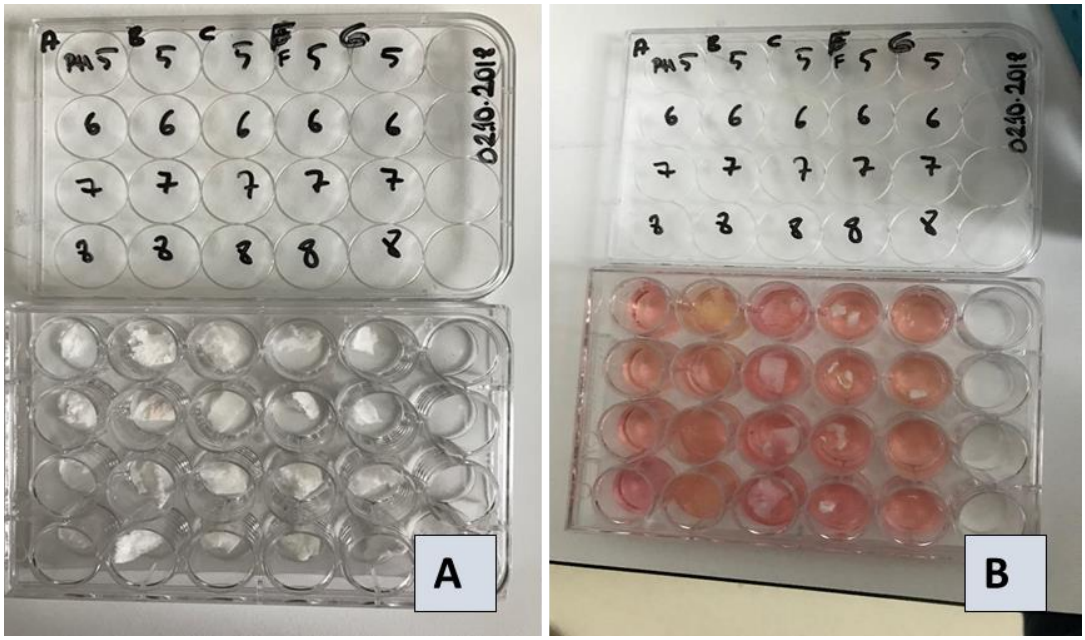
MTT, 1983 yılında memeli hücrelerinin hayatta kalmalarını ve proliferasyonlarını belirlemek için kantitatif kolorimetrik bir ölçüm olarak Mossman tarafından önerilmiştir ve günümüzde hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz aktivitelerini belirlemek sıklıkla kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (Mossman, 1983). Hücre kaynağından izolasyon sonrasında çeşitli hücre kültürü serilerindeki hücrelerin, mitokondriyal dehidrojenaz aktiviteleri, MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür]'ye dayalı ticari bir kit (Sigma) kullanılarak ölçülmüştür. Bu test için 96-kuyucuklu bir petri kabı kullanıldı. Aşağıdaki işlem basamakları takip edildi.

- Hazırlanan her bir fibroin iskeleden eş boyutlarda (0,5 cm^3) 4'er adet numune kesiti alındı. UV Sterilizasyon yapıldı.
- Proliferasyonu devam eden kiMKH'i Tripsin-EDTA ile kültür kaplarından kaldırılarak yıkandı ve süspanse edildi.
- Süspanse hücreler kullanılarak $1x10^5$ hücre/iskele olacak şekilde ekim yapıldı.
- Ardından 1., 3., 7. ve 14. Günlerde MTT testi ile prolifere olan hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri ve canlılıkları takip edildi.
- Petrinin kuyucuklarına temiz, taze hazırlanmış vasat konularak üzerine %10 konsantrasyonu sağlayacak şekilde MTT kiti ilave edildi.
- Kuyucukların her birine numuneden alınan örnekler konularak 4 saat süresince karbondioksit inkübatöründe bekletildi. Ancak, kuyucuklardan birine örnek konulmayarak içerisindeki vasat kör olarak kullanıldı.
- 4 saatin sonunda oluşan formazan kristalleri invert ikroskop ile görüntülendikten sonra, MTT çözücüsü (izopropanolde %1'lik HCl) kullanılarak çözüldü.
- Başka bir 96 kuyucuklu petri içerisine her örnekten 250 µl eklendi. 570 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucuda absorbans değerleri ölçüldü.

5.7. Biyobozunurluk Testi

Fibroin biyomateryalinin doğal bir polimer olduğu ve biyobozunur olduğu bilinmektedir. Analiz ile bu özellik üzerine fibroin iskelelerinin hazırlanış şartlarının bir etkisinin olup olmayacağı incelenecektir. Biyobozunurluk süresinin tesbiti için *Hank's Balanced Salt Solution* (Sıgma-Aldrıch, Unıted Kıngdom) kullanılmıştır.

Numunelerden belirli boyutlarda kesitler alındı ve her numunenin ağırlıkları ölçüldü. Ardından üzerlerine 2'şer ml Hank's Dengeli Tuz Çözeltisi eklendi (Şekil 5.10). Hazırlanan numuneler 37° C'de etüvde inkübe edildi. İşlemin başlama saati baz alınarak her 24 saat sonunda kuyucuklardaki solüsyon alındı. Fibroin iskeleler etüvde kurutulduktan sonra tekrar ağırlık ölçümü yapıldı. Bu işlem 14 gün süresince yapıldı.



Şekil 5.10. Solda(A) Gruplara ait 5, 6, 7 ve 8 pH'larda numunelerden kesitler, Sağda(B), hazırlanan numuneler üzerine Hank's dengeli tuz çözeltisi eklenmiş görüntüsü.

6. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yedi farklı deney prosedürü ile elde edilen fibroin iskeleleri gözeneklilik yapısı ve oranı, beta ve alfa-sheet tabakaları, biyouyumluluk ve biyobozunurluklarının belirlenmesi amacıyla çeşitli analizlere tabi tutuldu. Her bir deney prosedürü ile hazırlanan numunelere alfabetik adlandırma yapıldı. Bu adlandırmalar Tablo 6.1'de yer almaktadır.

Tablo 6.1. *Deneylere göre yapılan alfabetik adlandırmalar*

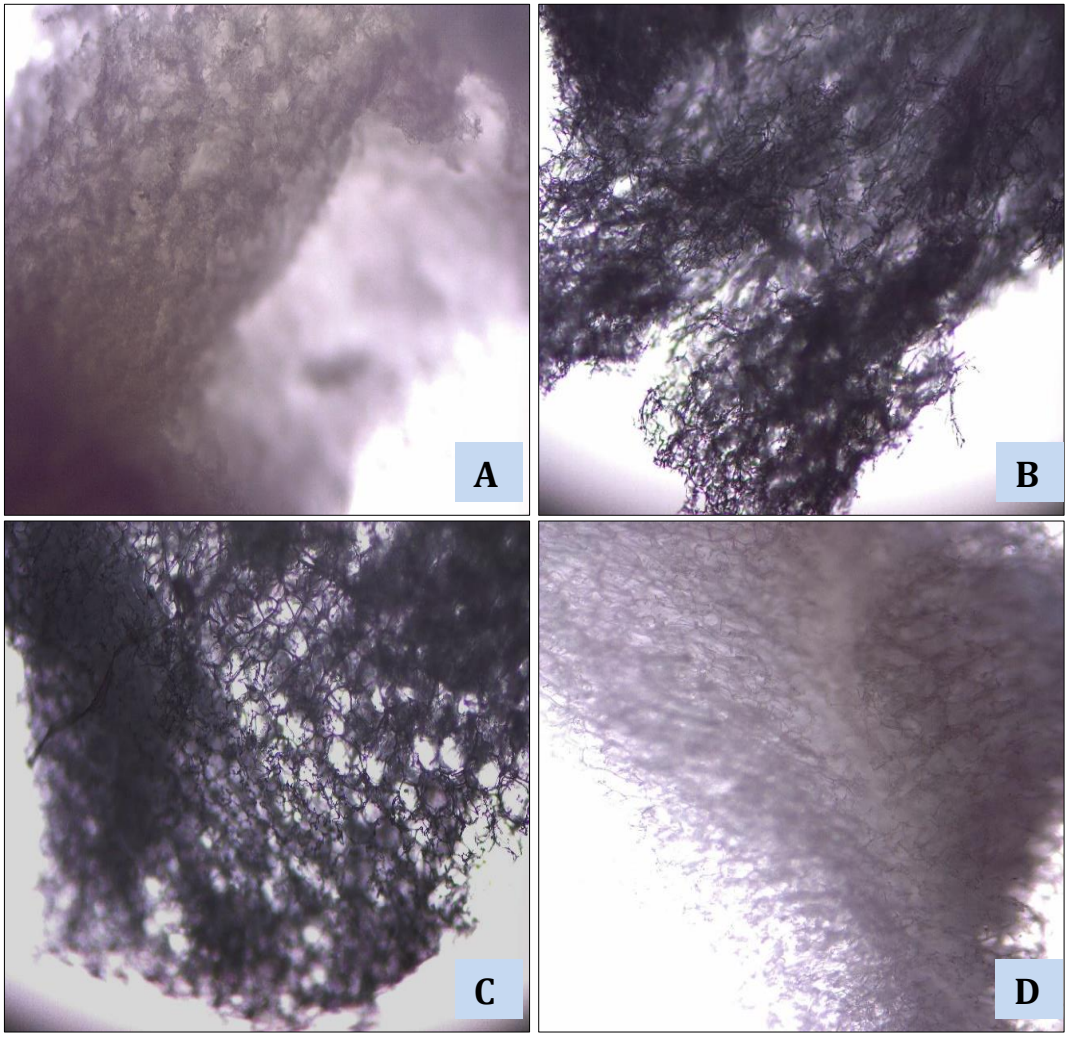
Alfabetik Adlandırma	**Yapılan Deneyler**
A Serisi	Standart Liyofilizasyon İşlemi (Vakum-Çok düşük sıcaklık etkisi)
B Serisi	Porojen Arındırma Yöntemi ve Vakumlu Etüv İşlemi (Oda koşulları-sıcak vakum etkisi)
C Serisi	Standart Liyofilizasyondan Sonra Kuru Haldeki İskelelerin Otoklavlanması (Çok düşük sıcaklık, vakum-kuru ortam-yüksek sıcaklık, vakum etkisi)
D Serisi	Standart Liyofilizasyondan Sonra Islak Haldeki İskelelerin Otoklavlanması (Çok düşük sıcaklık, vakum-sulu ortam-yüksek sıcaklık, vakum etkisi)
E Serisi	Standart Liyofilizasyondan Sonra Nemli Haldeki İskelelerin Otoklavlanması (Çok düşük sıcaklık, vakum-nemli ortam-yüksek sıcaklık, vakum etkisi)
F Serisi	Standart Liyofilizasyondan Sonra Kuru Haldeki İskelelerin Etüvde Yüksek Sıcaklık Muamelesi (Çok düşük sıcaklık, vakum-kuru ortam-yüksek sıcaklık etkisi)
G Serisi	Sıvı Fibroinin Otoklavlanmasından Sonra Liyofilizasyon ile Kurutulması (Sıvı form-yüksek sıcaklık, vakum etkisi- Çok düşük sıcaklık, vakum)

D ve E grubuna ait numuneler, deneyler sonucunda yapısal bütünlüklerini koruyamadıkları ve analizlere uygun olmadıkları tespit edildiğinden sonuçlar verilmemiştir.

6.1. Işık Mikroskobisi İle Görüntüleme

Hazırlanan fibroin iskelelerin gözeneklilikleri ve iç tabakalarının tesbiti amacıyla morfolojik analizlerde faz kontrast ışık mikroskobu ile (Leica DMIL) incelenmiştir. Yapının makroskobik görüntüsü tespit edilmeye çalışılmıştır.

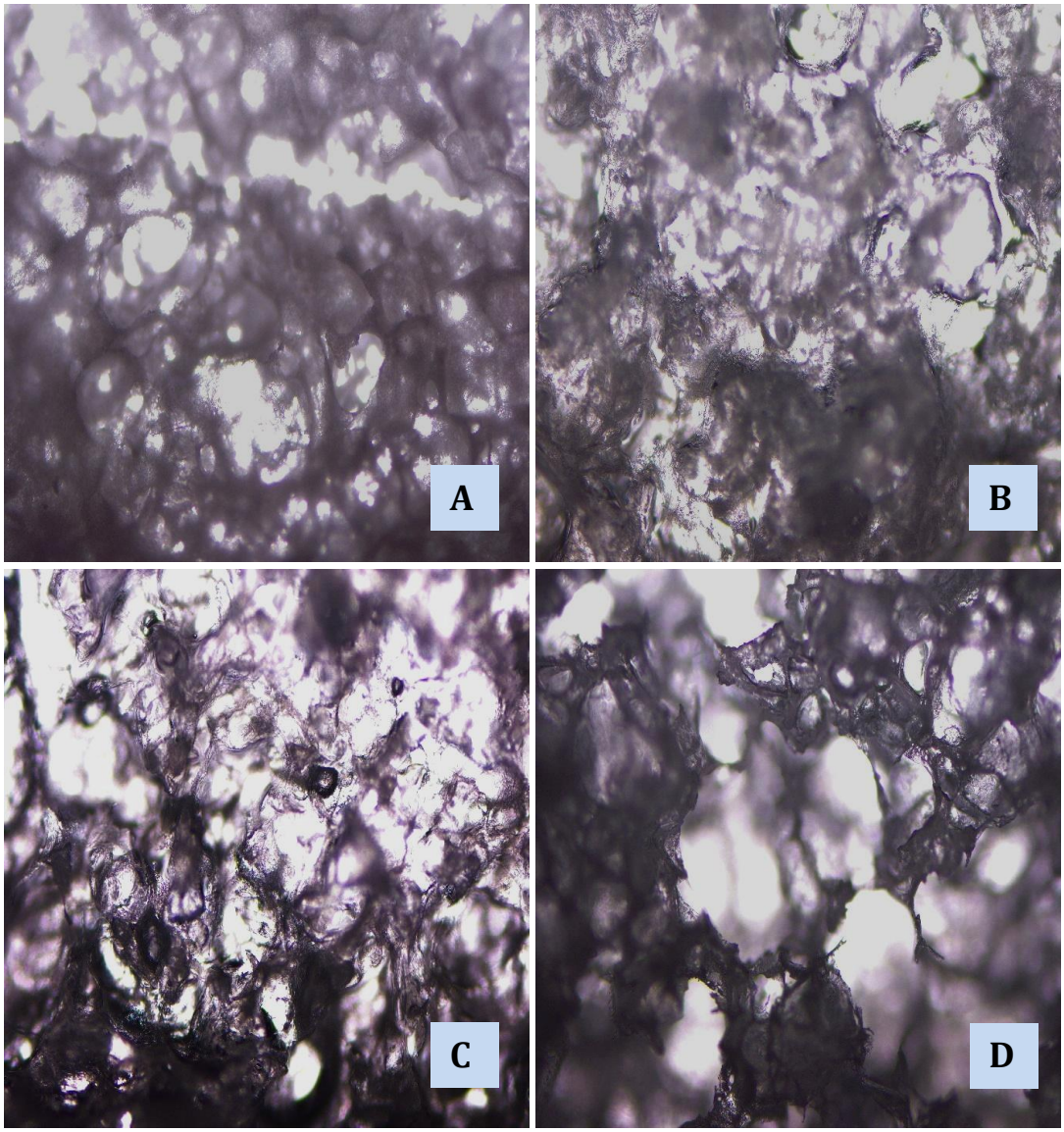
A Serisine ait iskele örneklerinin 10x büyütme ile çekilmiş fotoğrafları şekil 6.1'de verilmiştir. İskelelerden özellikle pH 6 ve pH 7 değerine sahip iskelelerin morfolojik olarak benzer ve yüksek gözeneklilikte süngerimsi bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Asidik ve bazik pH değerlerinde ise gözenek boyutunun küçüldüğü tespit edilmiştir. Kullanılan üretim yöntemi her iskele için aynı olduğu halde yöntemden bağımsız olarak gözenekliliğin pH değerlerine bağlı olarak değişiklik gösterdiği anlaşılmaktadır.



Şekil 6.1. A Serisi için yapılan işlemleri sonunda elde edilen iskelelerin ışık mikroskobisi görüntüleri. A. pH 5, B. pH 6, C. pH 7, D. pH 8.

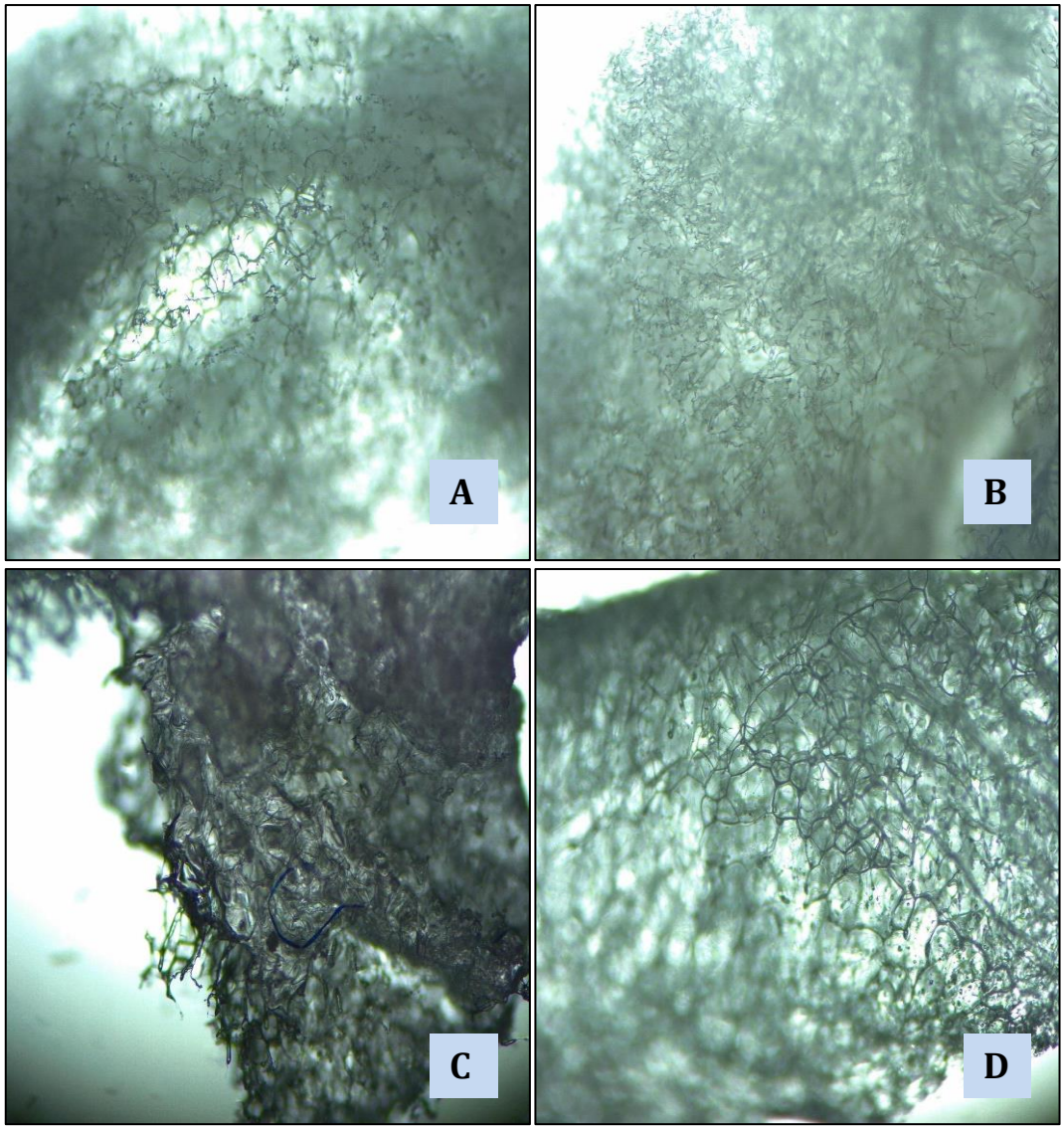
B Serisine ait iskele örneklerinin 10x büyütme ile çekilmiş fotoğrafları şekil 6.2'de verilmiştir. Yapıdaki gözenek boyunun A serisine oranla daha büyük olduğu ve artan pH değeriyle gözenek büyüklüğünün de arttığı fotoğraflarda açıkça görülmektedir. Bu durum gözenekliliğe sadece porojen boyutunun etkili

olmadığını, kullanılan polimer çözeltisinin asiditesinin de gözenek boyutuna etki ettiğini açıkça göstermektedir.



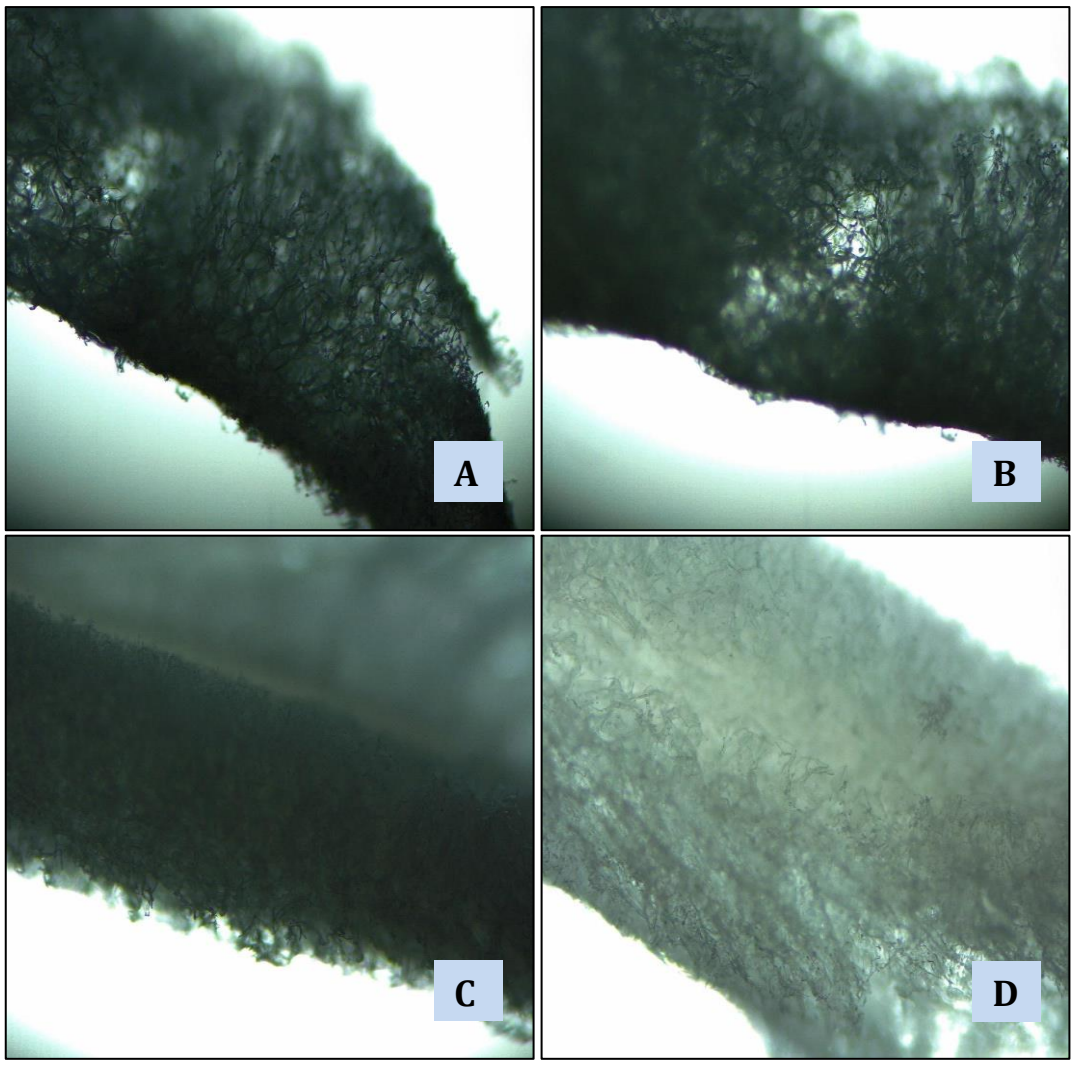
Şekil 6.2. B grubu işlemleri sonunda elde edilen iskelelerin ışık mikroskobisi görüntüleri. A. pH 5, B. pH 6, C. pH 7, D. pH 8.

C Serisine ait iskele örneklerinin 10x büyütme ile çekilmiş fotoğrafları Şekil 6.3'te verilmiştir. İskeleler üzerinde A serisinden farklı olarak gözenekliliği oluşturan liflerin inceleştiği ve otoklavdaki nispeten düşük dış basınç, yüksek buhar basıncı ve yüksek sıcaklık etkisiyle ağ yapıların oluştuğu görülmüştür. Örnekler karşılaştırıldığında ise sadece nötral pH değere sahip örnekte ağ yapıların çok daha az oranda oluştuğu dikkat çekmektedir.



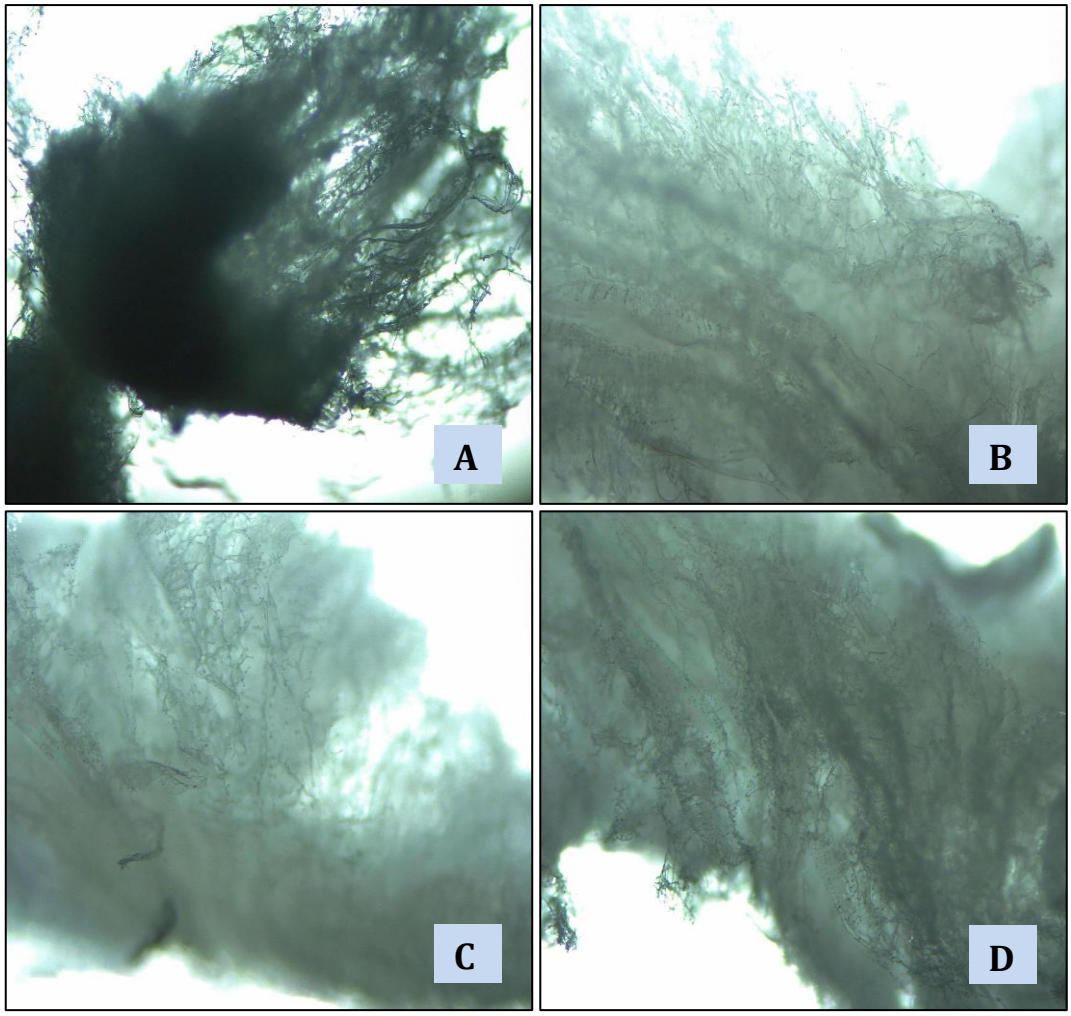
Şekil 6.3. C grubu işlemleri sonunda elde edilen iskelelerin ışık mikroskobisi görüntüleri. A. pH 5, B. pH 6, C. pH 7, D. pH 8.

F Serisine ait iskele örneklerinin 10x büyütme ile çekilmiş fotoğrafları şekil 6.4'te verilmiştir. İsklelerin morfolojik olarak C serisi örnekleri ile benzerlik göstermekle birlikte daha yoğun bir fibriler ağa sahip olduğu tespit edilmiştir. Lifsi yapıların bazik pH değerine yaklaştıkça mikroporoz yapıdan tabakalı yapıya kısmen de olsa geçiş yaptığı görülmüştür.



Şekil 6.4. F grubu işlemleri sonunda elde edilen iskelelerin ışık mikroskobisi görüntüleri. A. pH 5, B. pH 6, C. pH 7, D. pH 8.

G Serisine ait iskele örneklerinin 10x büyütme ile çekilmiş fotoğrafları şekil 6.5'te verilmiştir. İskelelerin morfolojik olarak F serisi örnekleri ile benzerlik göstermekle birlikte lifli yapıların süreklilik kazandığı ve lifler arası ağ yapısında bozulmalar olduğu dikkat çekmiştir. Asidik pH değerlerinde sürekli liflerden oluşan tabakalı morfoloji dikkat çekerken bazik pH değerlerinde liflerin nispeten daha ince olduğu ve yapının yoğunluğunda artış olduğu görülmüştür.



Şekil 6.5. G grubu işlemleri sonunda elde edilen iskelelerin ışık mikroskobisi görüntüleri. A. pH 5, B. pH 6, C. pH 7, D. pH 8.

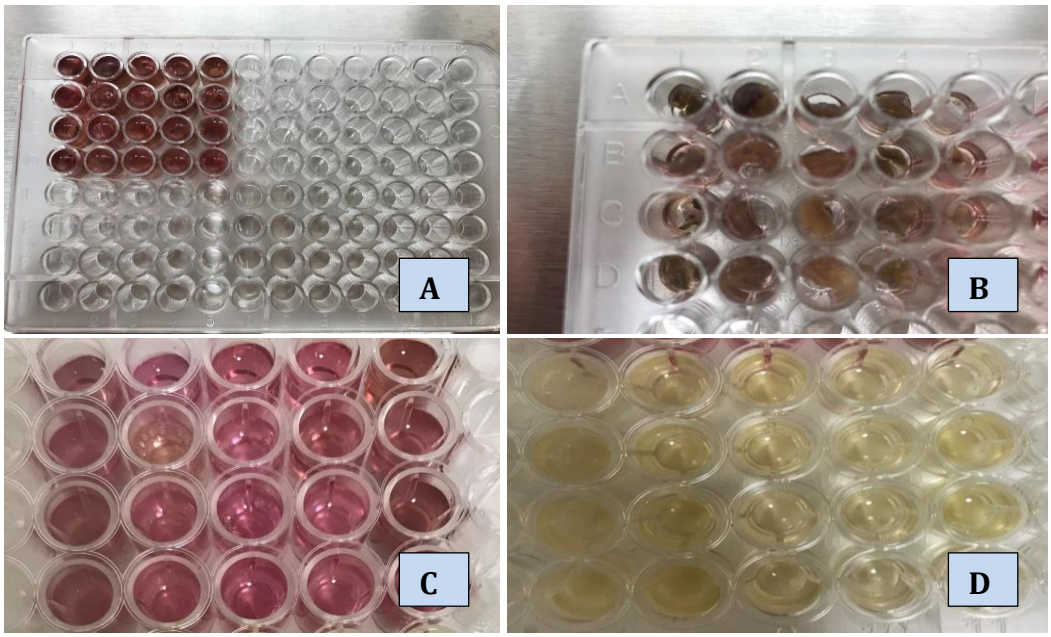
6.2. Biyouyumluluk Testi: MTT (Mitokondriyal Dehidrojenaz Aktiviteleri) Analizi

MTT testinin temelini, prolifere olan hücrelerin durağan fazdaki hücrelerden daha yüksek mitokonriyal dehidrogenaz aktivitesi göstermesi oluşturur. Ayrıca bu reaksiyon mitokondrisi bozulmamış, yaşayan ve yeterli oksijeni bulunan hücrelerde gerçekleşir. Bundan dolayı bu test hücrelerin farklı mitokondriyal metabolik oranlarını ölçmek için uygundur.

Hücrelerin canlılığının fazla olması, mitokondriyal aktivitenin artmasına neden olacağından, hücre canlılığını takip etmek içinde kullanılan bir yöntemdir.

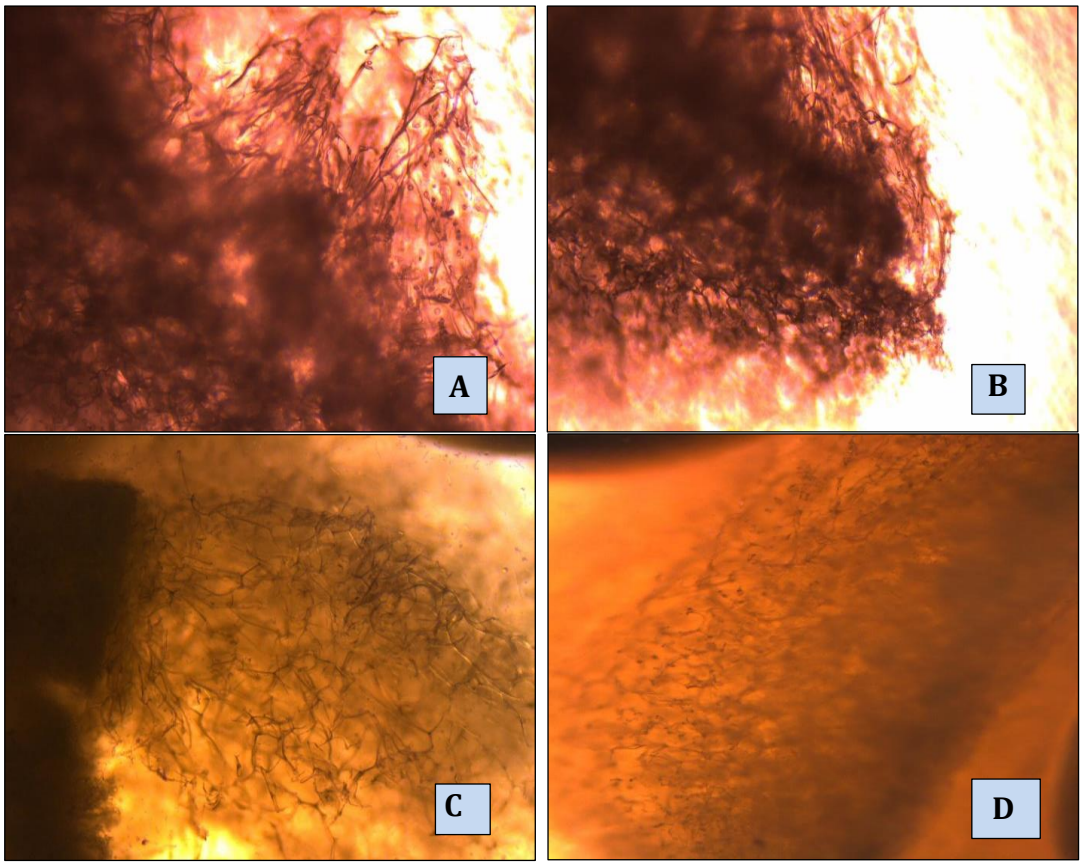
Hazırlanan fibroin iskelelerin biyouyumluluklarının belirlenmesi amacıyla hücresel denemeler gerçekleştirildi. Ardından 1., 3., 7. ve 14. günlerde MTT testi ile prolifere olan hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri ve canlılıkları takip edildi.

Petrinin kuyucuklarına temiz, taze hazırlanmış vasat konularak üzerine %10 konsantrasyonu sağlayacak şekilde MTT kiti ilave edildi. Kuyucukların her birine numuneden alınan örnekler konularak 4 saat süresince karbondioksit inkübatöründe bekletildi. Ancak, kuyucuklardan birine örnek konulmayarak içerisindeki vasat kör olarak kullanıldı (Şekil 6.6). MTT testi, üç-boyutlu fibroin iskele üzerindeki MKH kültürlerinden alınan yaklaşık olarak aynı ölçülerdeki örneklere uygulanmıştır.



Şekil 6.6. 14.gün MTT testi, A. MTT ilave edilen hücre iskelelerinin 4 saatlik inkübasyon sonrası görüntüsü, B. Kuyucuklardan çözeltinin uzaklaştırılması ve iskeleler üzerindeki renk değişiminin(formazan kristallerinin) gözlenmesi, C. Kuyucuklardan uzaklaştırılan çözeltilerin görüntüsü, D. İskelelerde oluşan formazan kristallerinin MTT solventi ile çözülmesi ve çözeltinin farklı kuyucuklara aktarılmış halinin görüntüsü.

İnkübasyonun sonunda formazan kristallerinin oluşumu faz-kontrast mikroskobunda incelenmiştir (Şekil 6.7). Sonrasında ise koyu mavi formazan kristalleri MTT çözücüsü ile çözülerek renk şiddeti 570 nm'de UV-spektrofotometresinde 3 tekrarlı olarak ölçülmüştür.

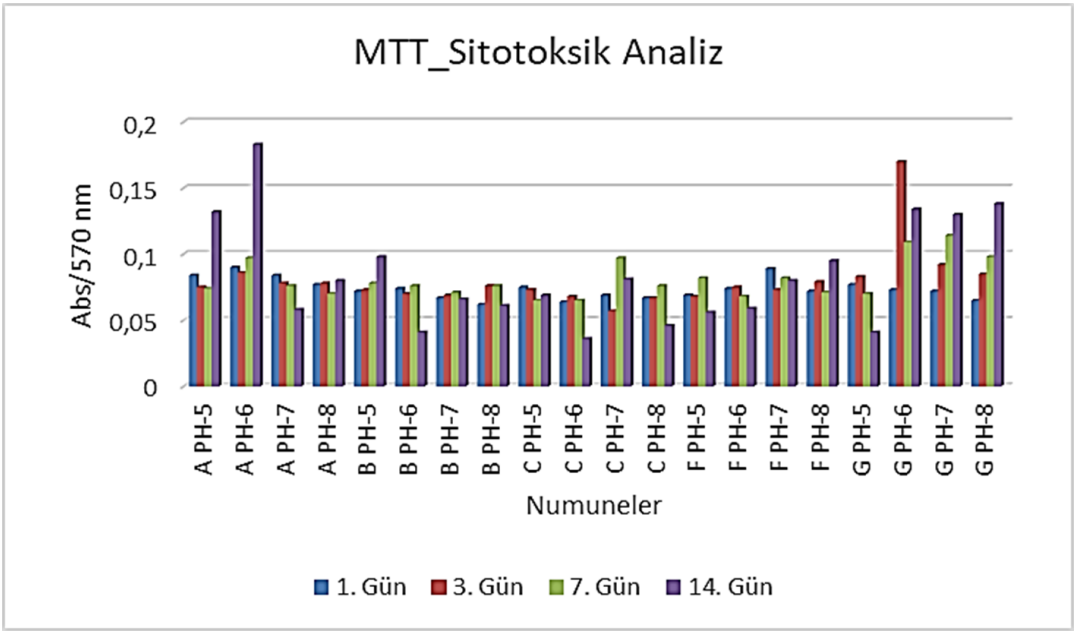


Şekil 6.7. 14.gün MTT testi sonrasında iskeleler üzerinde oluşan formazan kristallerinin görüntülenmesi

Formazan kristalleri çözülerek UV-spektrofotometresinde absorbans değerleri ölçümlerinin sonucunda elde edilen grafik Şekil 6.8'de gösterilmektedir. Spektrofotometrik ölçümlerde mitokondriyal aktivitenin 3. günde arttığı ilerleyen zaman noktalarında değerlerde kısmi bir düşüş olmak birlikte fazla bir değişim olmadığı tespit edilmiştir.

En yüksek mitokondriyal aktivitenin A serisinde pH-6 değerine sahip örnekte elde edildiği tespit edildi. Ayrıca G serisi örneklerinde de genel olarak 14. günde mitokondriyal aktivitenin yüksek olduğu görülmekle birlikte farklı olarak pH-5 değerine sahip örneke azalma gözlendi.

Diğer örneklerde en düşük metabolik aktivite B, C ve F serisisi için doğal pH değeri olan pH-6 değerine sahip örneklerde gözlemlendi. Bu durum pH değişimi ile numunelerin kimyasal konfigürasyonlarında olan değişimin biyouyumluluğuna da etki ettiğini göstermektedir.



Şekil 6.8. Fibron iskelelerde oluşan formazan kristallerinin UV-spektrofotometresinde absorbans değerlerinin numune türü ve günlere göre dağılımı

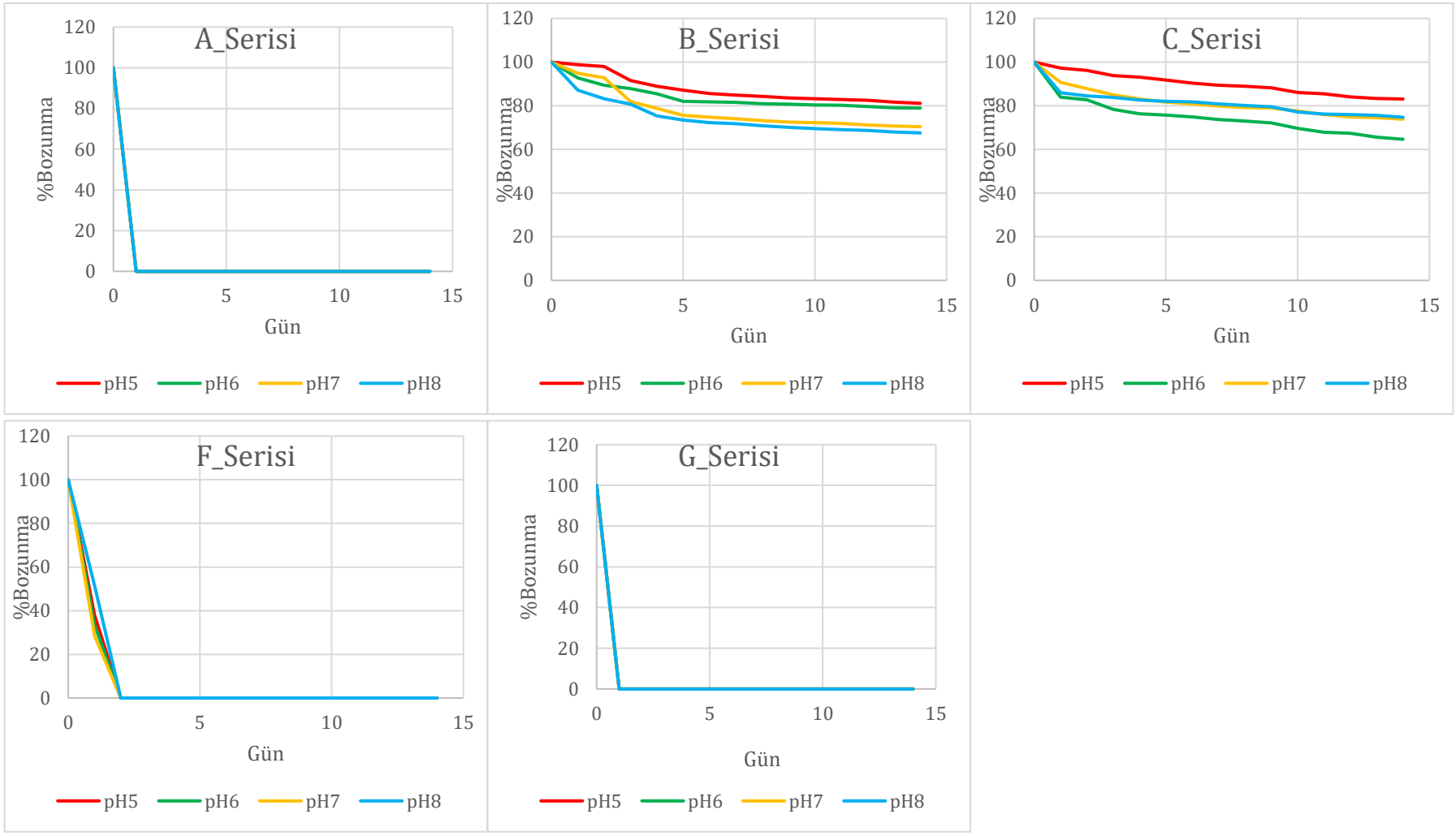
6.3. Biyobozunurluk Süresi Tesbiti

Hazırlanan numunelerin biyobozunurluk süreleri *in vivo* ortamı en iyi şekilde taklit ettiği ve literatürde sıklıkla karşılaşıldığı üzere Hank'in dengeli tuz çözeltisi ile 14 gün süreyle test edilmiştir. Uygulama günlük olarak numunlerin kuru kütlelerinin tespiti ve taze tampon çözelti ile yeniden süspanse edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Günlük olarak gerçekleştirilen tartım sonuçları yüzde bozunma şeklinde hesaplanarak deney prosedürleri olarak serilere göre ve pH değişimlerine göre ayrı ayrı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 6.9 ve 6.10).

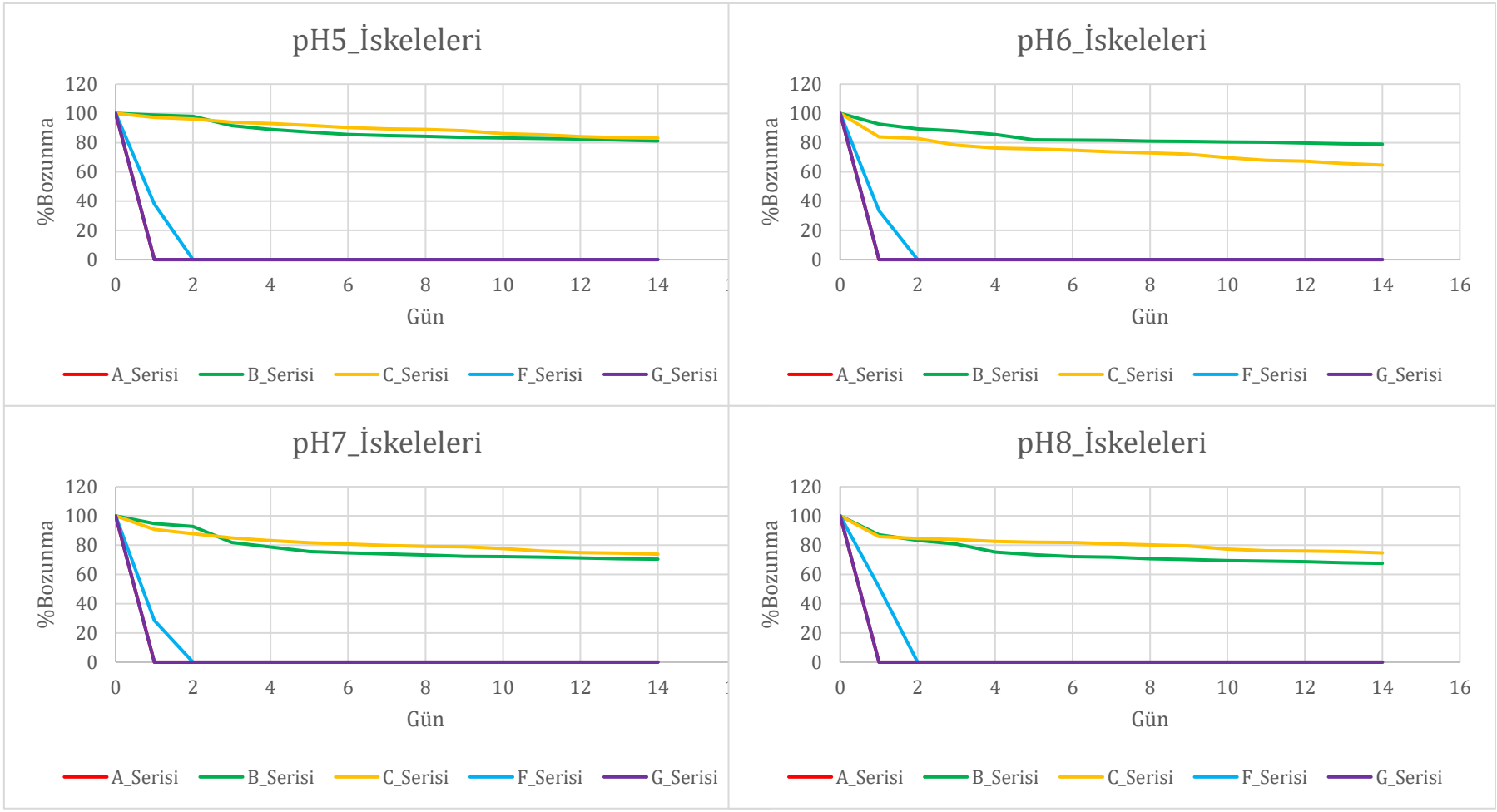
A ve G serisi numunelerinin pH'tan bağımsız olarak ilk 24 saatin sonunda tamamen bozunduğu tespit edildi. Bu durum A ve G serisi numunlerinde yapının stabilitesini artırıcı molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanmaların olmadığını göstermekle birlikte bu etkinin pH değişimlerininden bağımsız gerçekleştiğini de işaret etmektedir. A ve G serisi numunelerinin hepsi son işlem olarak standart liyoflizasyon yöntemine tabi tutulmuş olup, soğuk vakum sisteminin çapraz bağlanmaları desteklemediği anlaşılmaktadır.

F serisi numunelerinin de kısa bozunma süresine sahip olduğu ve 48 saatin sonunda tüm numunelerin bozundğu tespit edildi. Ancak ilk 24 saatlik zamanda bozunmaların kısmen de olsa pH değişiminden etkilendiği anlaşılmaktadır.

B ve C serisi numelerinin bozunma sürelerinin diğer gruplara oranla daha uzun sürede gerçekleştiği ve 14 günün sonunda B serisi pH 8 iskelelerin %32,5'i, C serisi pH 6 iskelelerin ise %36'sının bozunduğu hesaplandı. Ayrıca B ve C serisi örneklerinde bozunmaların pH değerleri ile değişim gösterdiği de hesaplamalar sonucu bulundu. pH 6 değerine sahip örneklerde en yüksek bozunma C serisinde gerçekleşirken diğer pH değerlerinde bozunma oranın B serisinde daha fazla olduğu görüldü. Bu sonuçlar, fizyolojik sıcaklıkta vakum etkisinin ve katı iskelelerin yüksek buhar basıncında vakuma tabi tutulması ile moleküller arası ve içi çapraz bağlanmaların gerçekleşmesi ile açıklanabilmektedir.



Şekil 6.9. Biyobozunurluk süresinin deney serileri bazında günlere göre yüzde bozunmalarının grafikler ile gösterimi.



Şekil 6.10. Aynı pH değerine sahip fibroin iskelelerin hazırlanma yöntemlerinin bozunma sürelerine bağlılığının, bozunma yüzdelerinin günlere göre grafikler ile karşılatırmalı olarak gösterimi.

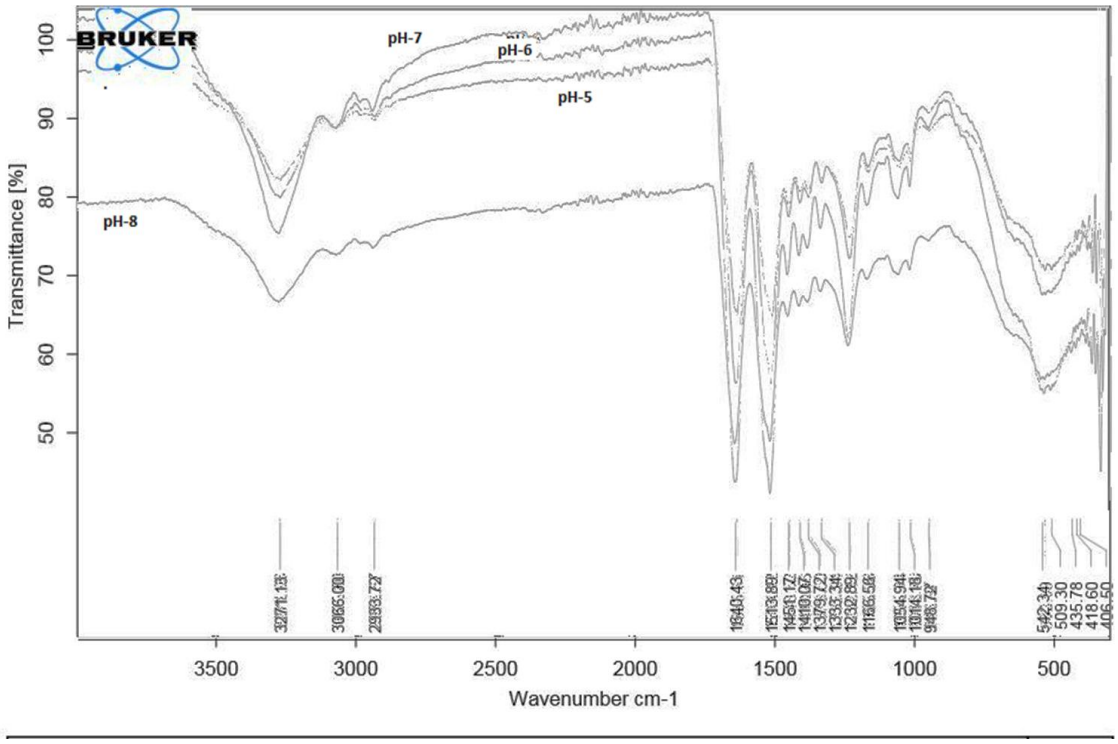
6.4. Fourıer Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) Analizi

Deney prodürüne göre üretimlerindeki fiziksel koşulları değişen fibroin iskelelerin yapılarında bulunan moleküllerdeki çeşitli bağların titreşim frekanslarını ölçmek ve moleküldeki fonksiyonel grupları tespit etmek amacıyla elektromanyetik spektrumunda 4000-450 cm^{-1} dalga boyu arasında Bruker Marka AlpHa model ATR FTIR spektroskopisi ile numunelerin ölçümü yapıldı.

Serisinden ayrıştırılmış ve Ajisawa çözeltisiyle çözülerek saflaştırılan ve liyofilizasyon ile kurutulan fibroine ait FTIR spektrumunda, amid bağlarının 1615 ve 1616 cm^{-1} bölgesinde, -CH gerilmelerinin 2914 ve 2551 cm^{-1} bölgelerinde görüldüğü ve –CH gerilmelerinin saflaştırılmamış fibroine göre daha zayıf gözlendiği, -NH gerilmelerinin 3270 cm^{-1} bölgesinde olduğu görülmüştür. Serisine özgü 1650, 1400 ve 1070 cm^{-1} bölgesinde çıkan piklerin görülmemesi Serisin proteininin başarılı şekilde uzaklaştırıldığını göstermiştir. Ayrıca, fibroine özgü olan, kozada serisin tarafından baskılanan gly-gly ve –gly-ala- peptit motiflerinin 1000 ve 970 cm^{-1} bölgesinde görüldüğü tespit edilmiş olup, bu durum serisinin ortamda olmadığı ya da büyük oranda uzaklaştırıldığını göstermektedir.

6.4.1. A Serisi Fibroin İskelelerin FTIR Grafikleri

A serisi numunelerin spektrumlarında Amid I, II ve III, hidroksil, karboksil ile aromatik ve alifatik fonksiyonel grupları hakkında önemli absorbsiyon pikleri görülmüştür. Bu numunelere ait FTIR spektrumları karşılaştırılmalı olarak Şekil 6.11'de verilmiştir.



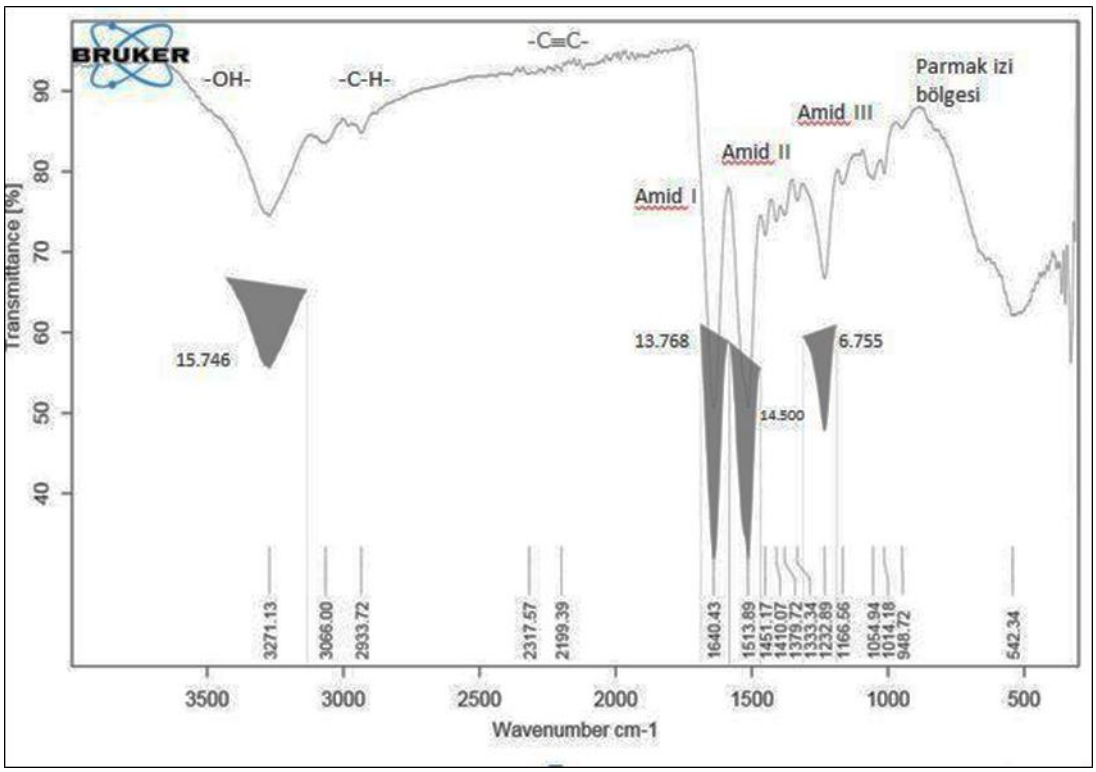
Şekil 6.11. A grubunda tüm pH'lara ait fibroin iskelelerin FTIR spektrumları

A grubuna ait pH 5'te hazırlanan fibroin iskelenin FTIR grafiğinde –OH bağlarının gerilme titreşimleri 3271,26 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik -C-H'nin gerilme titreşimleri 3065,80 cm^{-1} ve 2933,67 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. 1635,61 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1514,42 cm^{-1}, 1448,52 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1410,45 cm^{-1}, 1379,60 cm^{-1}, 1332,24 cm^{-1}, 1232,12 cm^{-1}, 1165,38 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Bu bağ yapıları ve fonksiyonel gruplar fibroinin protein yapısına özgü kimyasal yapılardır. Yapılan deneysel aşamalarda fibroinin kimyasal yapısının korunduğu görülmektedir. Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki Parmak izi bölgesinde, ölçümü yapılan numuneye ait kimlik bilgilerini içeren özel bölgeler de izlenmiştir. Parmak izi bölgesinde numune için 946,97 cm^{-1}, 532,99 cm^{-1}, 435,78 cm^{-1}, 418,60 cm^{-1}, 406,50 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür.

FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların bulunduğu ve birbirleri arasında geçiş bölgelerinde oluşan alanlar da sayısal olarak belirlenmiştir. Bu alanların her numune için farklı olduğu görülmüştür.

A grubu pH 5 fibroin iskelede –OH- ve –C-H- grupları arasında ve 3271,26 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 9.643'tür. Amid I ve Amid II arasında ve 1635,61 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 8.772'dir. Amid II ve Amid III arasında ve 1514,42 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 9.740'dır. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1232,12 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 4.937'dir.

A grubuna ait pH 6'da hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumunda(Şekil 6.12) –OH bağlarının gerilme titreşimleri 3271,13 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik -C-H'nin gerilme titreşimleri 3066,00 cm^{-1} ve 2933,72 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. 1640,43 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1513,89 cm^{-1}, 1451,17 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1410,07 cm^{-1}, 1379,72 cm^{-1}, 1333,34 cm^{-1}, 1232,89 cm^{-1}, 1166,56 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Bu bağ yapıları ve fonksiyonel gruplar fibroinin protein yapısına özgü kimyasal yapılardır.



Şekil 6.12 A grubuna ait pH 6'da hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumları ve oluşan spesifik alanlar ve alan ölçüleri.

Yapılan deneysel aşamalarda fibroinin kimyasal yapısının korunduğu görülmektedir. Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki Parmak izi bölgesinde

numune için 948,72 cm^{-1}, 542,34 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür. FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların bulunduğu pik alanları; A grubu pH 6 fibroin iskelede –OH ve –C-H- grupları arasında ve 3271,13 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 15.746'dır. Amid I ve Amid II arasında ve 1640,43 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 13.768'dir. Amid II ve Amid III arasında ve 1513,89 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 14.500'dır. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1232,89 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 6.755'dir.

A grubuna ait pH 7 numunesinde; –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3271,98 cm-1 ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 3065,04 cm^{-1} ve 2935,46 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. 1639,09 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1513,55 cm^{-1}, 1451,73 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1409,98 cm^{-1}, 1379,68 cm^{-1}, 1333,52 cm^{-1}, 1232,60 cm^{-1}, 1166,11 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Bu bağ yapıları ve fonksiyonel gruplar fibroinin protein yapısına özgü kimyasal yapılardır. Yapılan deneysel aşamalarda fibroinin kimyasal yapısının korunduğu görülmektedir. Ayrıca, spektrumda 1000-400 cm^{-1} arasındaki parmak izi bölgesinde numune için 946,86 cm^{-1}, 532,45 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür.

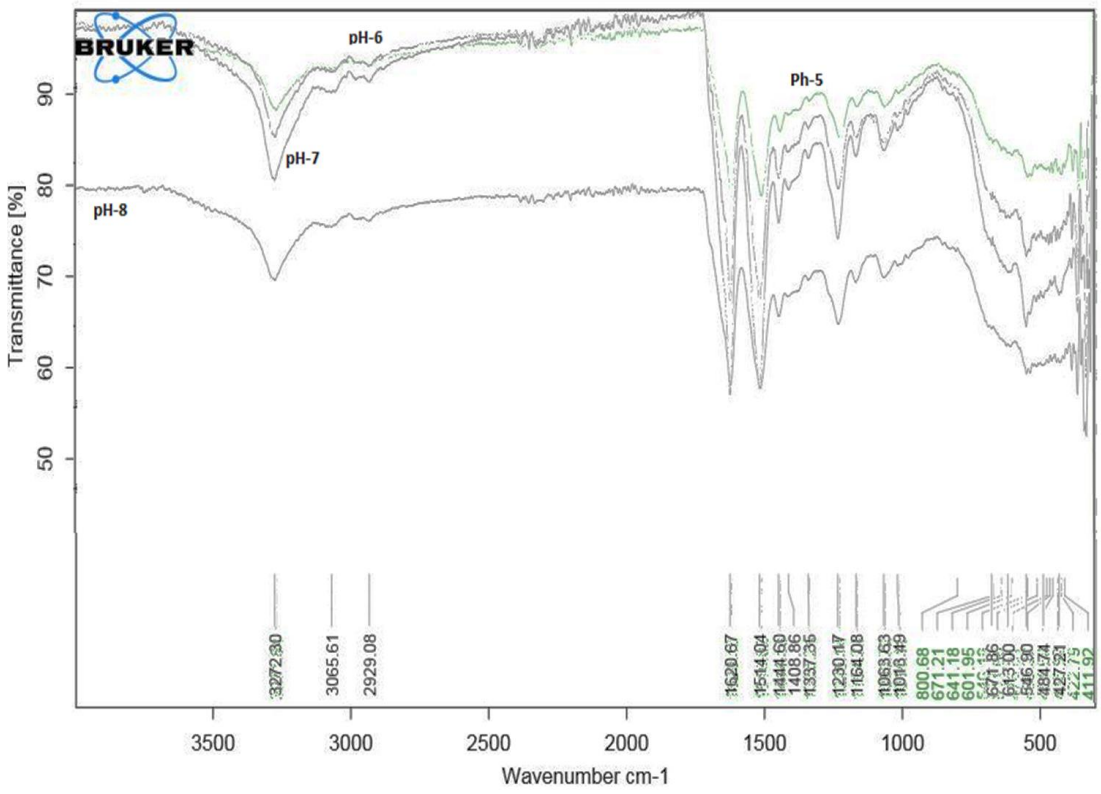
A grubu pH 7 fibroin iskelede –OH ve –C-H- grupları arasında ve 3271,98 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 18.700'dür. Amid I ve Amid II arasında ve 1639,06 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 13.979'dur. Amid II ve Amid III arasında ve 1513,55 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 16.221'dir. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1232,60 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 7.846'dır. A grubuna ait pH 8'de hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumunda –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3270,68 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 3065,25 cm^{-1} ve 2935,21 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. 1639,09 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1513,99 cm^{-1}, 1451,30 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1410,11 cm^{-1}, 1379,36 cm^{-1}, 1333,40 cm^{-1}, 1233,56 cm^{-1}, 1165,74 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Bu bağ yapıları ve fonksiyonel gruplar fibroinin protein yapısına özgü kimyasal yapılardır. Yapılan deneysel aşamalarda fibroinin kimyasal yapısının korunduğu görülmektedir. Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400

cm^{-1} pikleri arasındaki parmak izi bölgesinde numune için 946,08 cm^{-1}, 544,64 cm^{-1} 434,96 cm^{-1} , 419,16 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür.

A grubu pH 8 fibroin iskelede –OH- ve –C-H- grupları arasında ve 3270,68 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 12,297'dir. Amid I ve Amid II arasında ve 1639,09 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 14.768'dir. Amid II ve Amid III arasında ve 1513,99 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 13.506'dır. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1233,56 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 6.020'dir.

6.4.2. B Serisi Fibroin İskelelerin FTIR Grafikleri

B grubunda pH'ları 5, 6, 7 ve 8 olan numunelerin spektrumlarında Amid I, II ve III, hidroksil, karboksil ile aromatik ve alifatik fonksiyonel grupları hakkında önemli absorbsiyon pikleri görülmüştür. Bu numunelere ait FTIR spektrumları karşılaştırılmalı olarak Şekil 6.13'de verilmiştir.



Şekil 6.13. B grubunda tüm pH'lara ait fibroin iskelelerin FTIR spektrumları

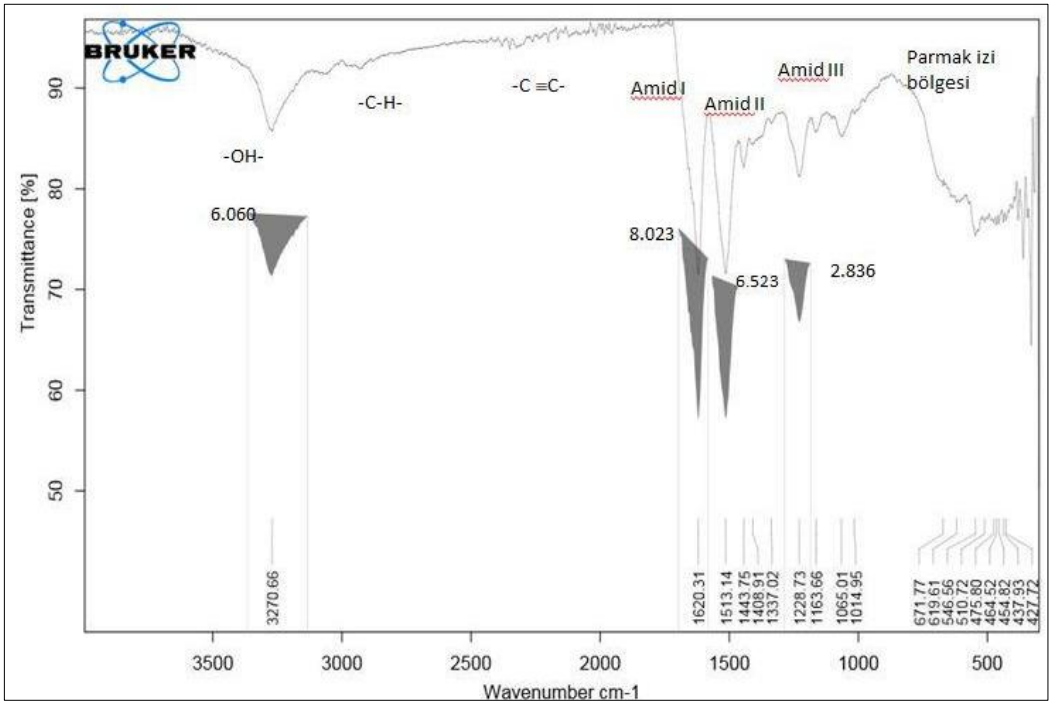
B grubuna ait pH 5'te hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumlarında –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3271,84 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri izlenmemiştir. 1620,18 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1510,82 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1444,10 cm^{-1}, 1338,24 cm^{-1}, , 1228,14 cm^{-1}, 1164,73 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Bu bağ yapıları ve fonksiyonel gruplar fibroinin protein yapısına özgü kimyasal yapılardır. Yapılan deneysel aşamalarda fibroinin kimyasal yapısının korunduğu görülmektedir. Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki parmak izi bölgesinde numune için 800,68 cm^{-1}, 671,21 cm^{-1}, 641,18 cm^{-1}, 601,95 cm^{-1}, 546,19 cm^{-1}, 511,66 cm^{-1}, 476,31 cm^{-1} , 465,27 cm^{-1} , 454,60 cm^{-1} , 436,92 cm^{-1} , 422,79 cm^{-1} , 411,92 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür.

FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların alanları sayısal olarak belirlenmiştir. B grubu pH 5 fibroin iskelede –OH- grupları ve 3271,84 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 4.332'dir.

Amid I ve Amid II arasında ve 1620,18 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 5.384'dür. Amid II ve Amid III arasında ve 1510,82 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 4.952'dir. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1228,14 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 2.170'dir.

B grubuna ait pH 6 fibroin iskelenin FTIR spektrumunda(Şekil 6.14) –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3270,66 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri izlenmemiştir. 1620,31 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1513,14 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1443,75 cm^{-1}, 1408,91 cm^{-1}, 1337,18 cm^{-1}, 1228,73 cm^{-1} ,1163, 66 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Bu bağ yapıları ve fonksiyonel gruplar fibroinin protein yapısına özgü kimyasal yapılardır. Spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki parmak izi bölgesinde numune için, 671,77 cm^{-1}, 619,61 cm^{-1}, 546,55 cm^{-1}, 510,72 cm^{-1}, 475,80 cm^{-1}, 464,52 cm^{-1}, 454,82 cm^{-1} , 437,93 cm^{-1} , 427,72 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür.

FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların alanları sayısal olarak belirlenmiştir. Bu alanlar her numune için farklıdır. B grubu pH 6 fibroin iskelede OH- grupları ve 3270,66 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 6.060'dir. Amid I ve Amid II arasında ve 1620,31 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 8.023'dür. Amid II ve Amid III arasında ve 1513,14 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 6.523'dir. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1228,73 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 2.836'dir.



Şekil 6.14. B grubuna ait pH 6'da hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumları ve oluşan spesifik alanlar ve alan ölçüleri.

B grubuna ait pH 7'de hazırlanan fibroin iskelenin FTIR grafiğinde –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3272,30 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 3065,61 cm^{-1} 2929,08 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. 1620,67 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1514,04 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1444,60 cm^{-1}, 1408,85 cm^{-1}, 1337,35 cm^{-1}, 1230,17 cm^{-1} ,1164,08 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Bu bağ yapıları ve fonksiyonel gruplar fibroinin protein yapısına özgü kimyasal yapılardır. Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki parmak izi bölgesinde numune için, 671,86 cm^{-1} 613,00 cm^{-1}, 546,90 cm^{-1} 510,72 cm^{-1} , 484,74 cm^{-1}, 427,21 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür.

FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların alanları sayısal olarak belirlenmiştir. B grubu pH 7 fibroin iskelede –OH- grupları ve 3272,30 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 8.261'dir. Amid I ve Amid II arasında ve 1620,67 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 8.212'dür. Amid II ve Amid III arasında ve 1514,04 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 9.480'dir. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1230,17 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 3.740'dir.

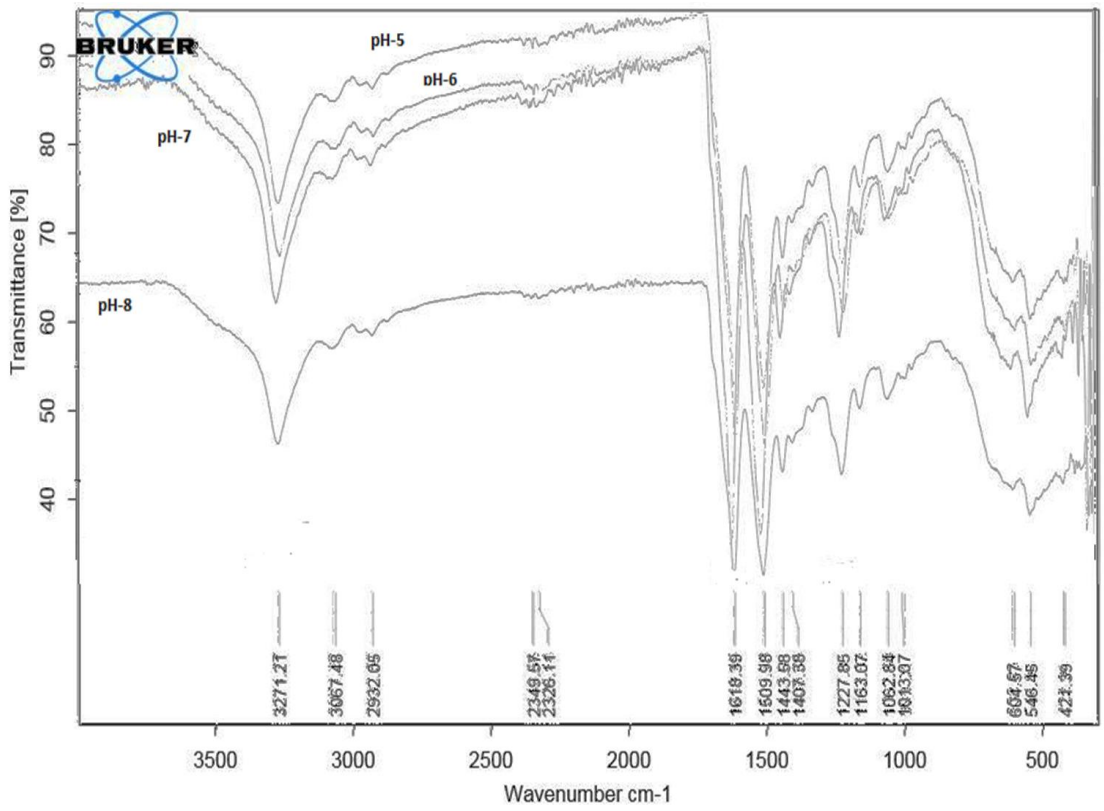
B grubuna ait pH 8'de hazırlanan fibroin iskelenin FTIR grafiğinde –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3271,15 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 3065,55 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. 1619,75 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1511,57 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1443,99 cm^{-1}, 1409,61 cm^{-1}, 1337,61 cm^{-1}, 1228,01 cm^{-1}, 1164,27 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Bu bağ yapıları ve fonksiyonel gruplar fibroinin protein yapısına özgü kimyasal yapılardır.

Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki parmakizi bölgesinde numune için, 975,98 cm^{-1}, 801,20 cm^{-1}, 603,56 cm^{-1}, 545,87 cm^{-1}, 532,15 cm^{-1}, 509,37 cm^{-1} , 454,57 cm^{-1}, 436,61 cm^{-1} , 426,17 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür.

FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların alanları sayısal olarak belirlenmiştir. B grubu pH 8 fibroin iskelede –OH- grupları ve 3271,15 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 6.366'dir. Amid I ve Amid II arasında ve 1619,75 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 6.835'dür. Amid II ve Amid III arasında ve 1511,57 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 6.445'dir. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1228,01 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 3.179'dir.

6.4.3. C Serisi Fibroin İskelelerin FTIR Grafikleri

C grubunda pH'ları 5, 6, 7 ve 8 olan numunelerin spektrumlarında Amid I, II ve III, hidroksil, karboksil ile aromatik ve alifatik fonksiyonel grupları, karbon üçlü bağlar hakkında önemli absorbsiyon pikleri görülmüştür (Şekil 6.15).



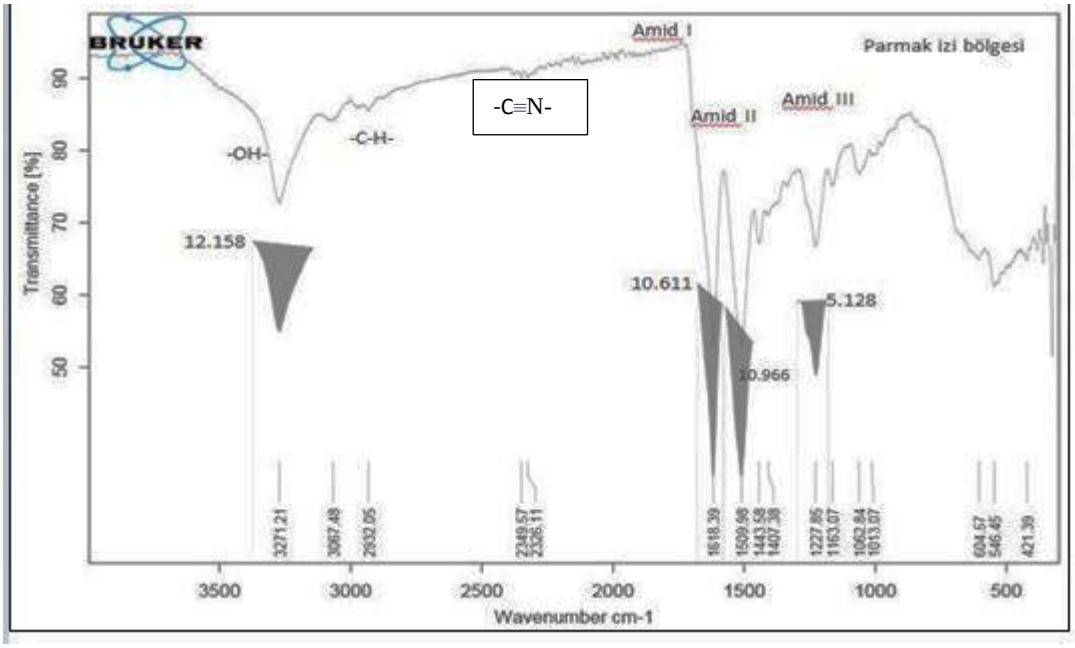
Şekil 6.15. C grubunda tüm pH'lara ait fibroin iskelelerin FTIR spektrumları

C grubuna ait pH 5'te hazırlanan fibroin iskelenin FTIR grafiğinde –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3271,77 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 3071,27 cm^{-1} , 2932,57 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. Karbon üçlü bağların gerilme titreşimleri 2349,56 cm^{-1} , 2326,44 cm^{-1} ile 2500-2000 cm^{-1} pikleri aralığında bulunmaktadır. 1619,45 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1511,70 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1443,01 cm^{-1}, 1408,66 cm^{-1}, 1227,01 cm^{-1}, 1162,60 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki parmakizi bölgesinde numune için, 999,01 cm^{-1}, 608,93 cm^{-1}, 544,94 cm^{-1}, 422,94 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür

FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların bulunduğu alanlar sayısal olarak belirlenmiştir. C grubu pH 5 fibroin iskelede –OH- ve –C-H- grupları arasında ve 3271,77 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 12.557'dir. Amid I ve Amid II arasında ve 1619,45 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 9.686'dır.

Amid II ve Amid III arasında ve 1511,70 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 10.034'dür. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1227,01 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 5.286'dır.

C grubuna ait pH 6'da hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumunda (Şekil 6.16) –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3271,21 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 3067,48 cm^{-1} , 2932,05 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. Karbon üçlü bağların gerilme titreşimleri 2349,57 cm^{-1}, 2326,11 cm^{-1} ile 2500-2000 cm^{-1} pikleri aralığında bulunmaktadır. 1618,39 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1509,98 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1443,58 cm^{-1}, 1407,38 cm^{-1}, , 1227,85 cm^{-1}, 1163,07 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki parmakizi bölgesinde numune için, 604,57 cm^{-1}, 546,45 cm^{-1}, 421,39 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür (Şekil 6.2.).



Şekil 6.16 C grubuna ait pH 6'da hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumları ve oluşan spesifik alanlar ve alan ölçüleri.

FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların bulunduğu alanlar sayısal olarak belirlenmiştir. C grubu pH 6 fibroin iskelede –OH- ve –C-H- grupları arasında ve 3271,21 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 12.158'dir.

Amid I ve Amid II arasında ve 1618,39 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 10.611'dir. Amid II ve Amid III arasında ve 1509,98 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 10.966'dır. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1227,85 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 5.128'dir.

C grubuna ait pH 7'de hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumlarında –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3271,57 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 2928,90 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. Karbon üçlü bağların gerilme titreşimleri 2354,29 cm^{-1} , 2328,12 cm^{-1} ile 2500-2000 cm^{-1} pikleri aralığında bulunmaktadır. 1619,70 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1514,20 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1444,56 cm^{-1}, 1409,87 cm^{-1}, 1337,84 cm^{-1}, 1164,84 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki parmakizi bölgesinde numune için, 608,12 cm^{-1}, 546,29 cm^{-1}, 421,00 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür.

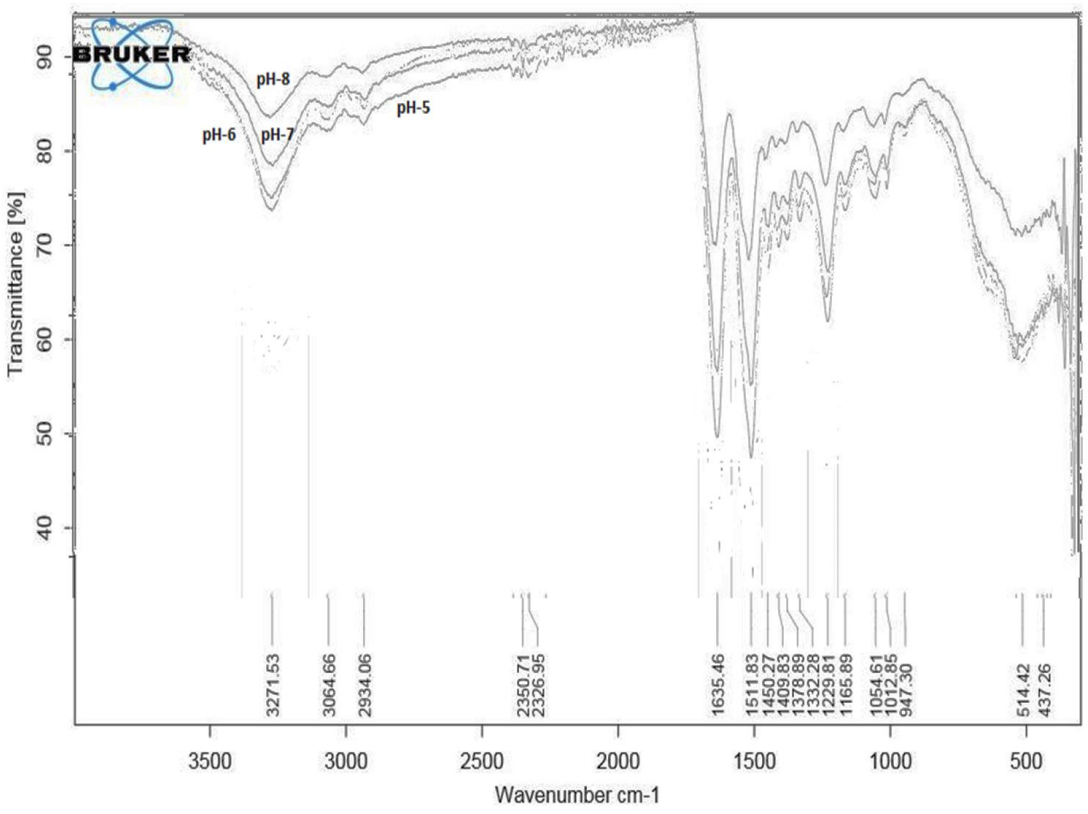
FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların bulunduğu alanlar sayısal olarak belirlenmiştir. C grubu pH 7 fibroin iskelede –OH- ve –C-H- grupları arasında ve 3271,57 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 10,199'dur. Amid I ve Amid II arasında ve 1619,70 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 12.623'dür. Amid II ve Amid III arasında ve 1514,20 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 10.815'dır. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1229,78 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 4.765'dir.

C grubuna ait pH 8'de hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumlarında –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3272,73 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 3077,37 cm^{-1}, 2933,04 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. Karbon üçlü bağların gerilme titreşimleri bulunmamaktadır. 1618,99 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1511,71 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1443,36 cm^{-1}, 1408,10 cm^{-1}, 1336,70 cm^{-1}, 1229,20 cm^{-1} 1163,83 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki parmakizi bölgesinde numune için, 975,10 cm^{-1}, 607,45 cm^{-1}, 545,76 cm^{-1}, 425,80 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür.

C grubu pH 8 fibroin iskelede –OH- ve –C-H- grupları arasında ve 3272,73 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 17.723'dür. Amid I ve Amid II arasında ve 1618,99 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 13,739'dur. Amid II ve Amid III arasında ve 1511,71 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 13,833'dür. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1229,20 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 6.948'dir.

6.4.4. F Serisi Fibroin İskelelerin FTIR Grafikleri

F grubunda pH'ları 5, 6, 7 ve 8 olan numunelerin spektrumlarında Amid I, II ve III, hidroksil, karboksil ile aromatik ve alifatik fonksiyonel grupları, karbon üçlü bağlar hakkında önemli absorbsiyon pikleri görülmüştür (Şekil 6.17).



Şekil 6.17. F grubunda tüm pH'lara ait fibroin iskelelerin FTIR spektrumları

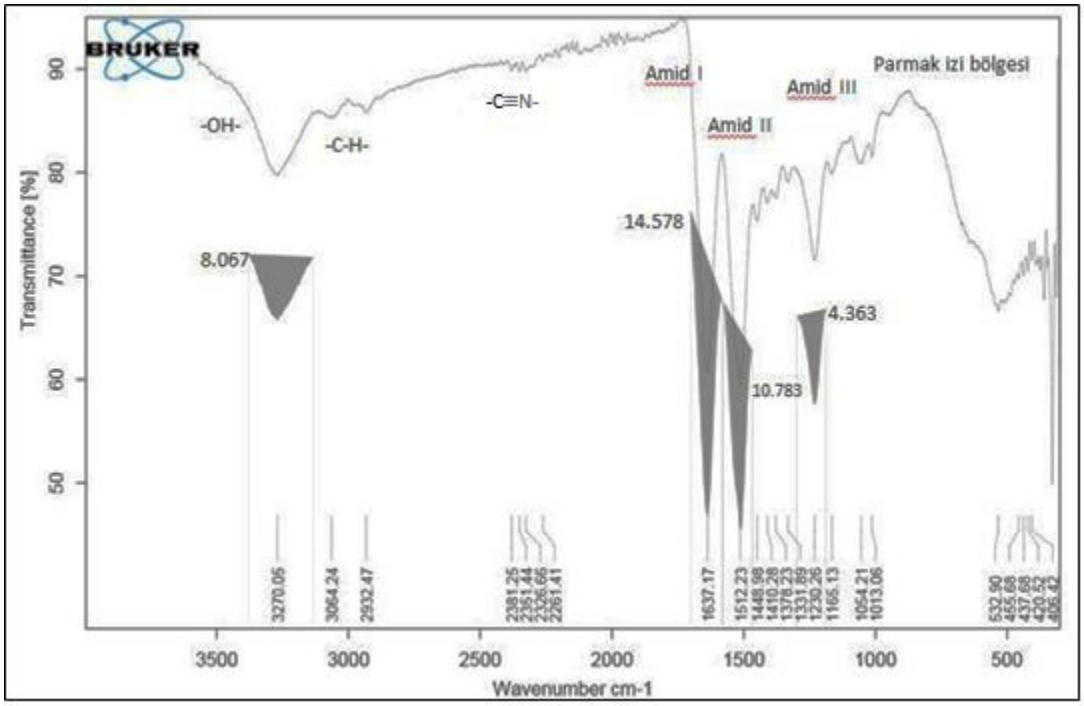
F grubuna ait pH 5'te hazırlanan fibroin iskelenin FTIR grafiğinde –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3271,53 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 3064,66 cm^{-1}, 2934,06 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir.

Karbon üçlü bağların gerilme titreşimleri 2360,71 cm^{-1}, 2326,95 cm^{-1} ile 2500-2000 cm^{-1} pikleri aralığında bulunmaktadır. 1635,46 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1511,83 cm^{-1} 1450,27 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1409,83 cm^{-1}, 1378,89 cm^{-1}, 1332,28 cm^{-1} 1229,81 cm^{-1} 1165,89 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki parmakizi bölgesinde numune için, 947,30 cm^{-1}, 514,42 cm^{-1}, 437,26 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür.

FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların bulunduğu alanlar sayısal olarak belirlenmiştir. F grubu pH 5 fibroin iskelede –OH- ve –C-H- grupları arasında ve 3271,53 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 16.215'dir. Amid I ve Amid II arasında ve 1635,46 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 14.752'dir. Amid II ve Amid III arasında ve 1511,83 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 13.692'dir. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1229,81 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 6.588'dir.

F grubuna ait pH 6'da hazırlanan fibroin iskelenin FTIR grafiğinde –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3270,05 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 3064,24 cm^{-1}, 2932,47 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. Karbon üçlü bağların gerilme titreşimleri 2381,25 cm^{-1}, 2351,44 cm^{-1}, 2326,66 cm^{-1} 2261,41 cm^{-1} ile 2500-2000 cm^{-1} pikleri aralığında bulunmaktadır. 1637,14 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1512,23 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1448,98 cm^{-1} 1410,28 cm^{-1}, 1378,23 cm^{-1}, 1331,89 cm^{-1} 1320,26 cm^{-1} 1165,13 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki parmakizi bölgesinde numune için, 532,90 cm^{-1}, 455,68 cm^{-1}, 437,68 cm^{-1} 420,52 cm^{-1}, 406,42 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür (Şekil 6.18).

FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların bulunduğu alanlar sayısal olarak belirlenmiştir. F grubu pH 6 fibroin iskelede –OH- ve –C-H- grupları arasında ve 3270,05 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 8.067'dir. Amid I ve Amid II arasında ve 1637,17 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 14.578'dir. Amid II ve Amid III arasında ve 1512,23 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 10.783'dir. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1230,26 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 4.363'dir.



Şekil 6.18. F grubuna ait pH 6'da hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumları, oluşan spesifik alanlar ve alan ölçüleri.

F grubuna ait pH 7'de hazırlanan fibroin iskelenin FTIR grafiğinde –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3270,75 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 3063,97 cm^{-1}, 2932,93 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. Karbon üçlü bağların gerilme titreşimleri bulunmamaktadır. 1635,60 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1513,34 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1448,58 cm^{-1} 1410,30 cm^{-1}, 1379,17 cm^{-1}, 1336,83 cm^{-1} 1229,43 cm^{-1} 1165,12 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki parmakizi bölgesinde numune için, 532,31 cm^{-1}, 510,65 cm^{-1}, 436,86 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür.

FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların bulunduğu alanlar sayısal olarak belirlenmiştir. F grubu pH 7 fibroin iskelede –OH- ve –C-H- grupları arasında ve 3270,75 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 7.126'dir. Amid I ve Amid II arasında ve 1635,60 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 7.515'dir. Amid II ve Amid III arasında ve 1513,34 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 7.104'dir. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1229,43 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 3.993'dir.

F grubuna ait pH 8'de hazırlanan fibroin iskelenin FTIR grafiğinde –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3269,73 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 3063,64 cm^{-1}, 2933,42 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. Karbon üçlü bağların gerilme titreşimleri bulunmamaktadır. 1633,00 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1512,63 cm^{-1} 1452,55 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1409,95 cm^{-1}, 1378,94 cm^{-1}, 1335,47 cm^{-1} 1229,02 cm^{-1} ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki parmakizi bölgesinde numune için, 531,35 cm^{-1}, 508,46 cm^{-1}, 487,25 cm^{-1}, 437,44 cm^{-1}, 421,91 cm^{-1}, 406,99 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür.

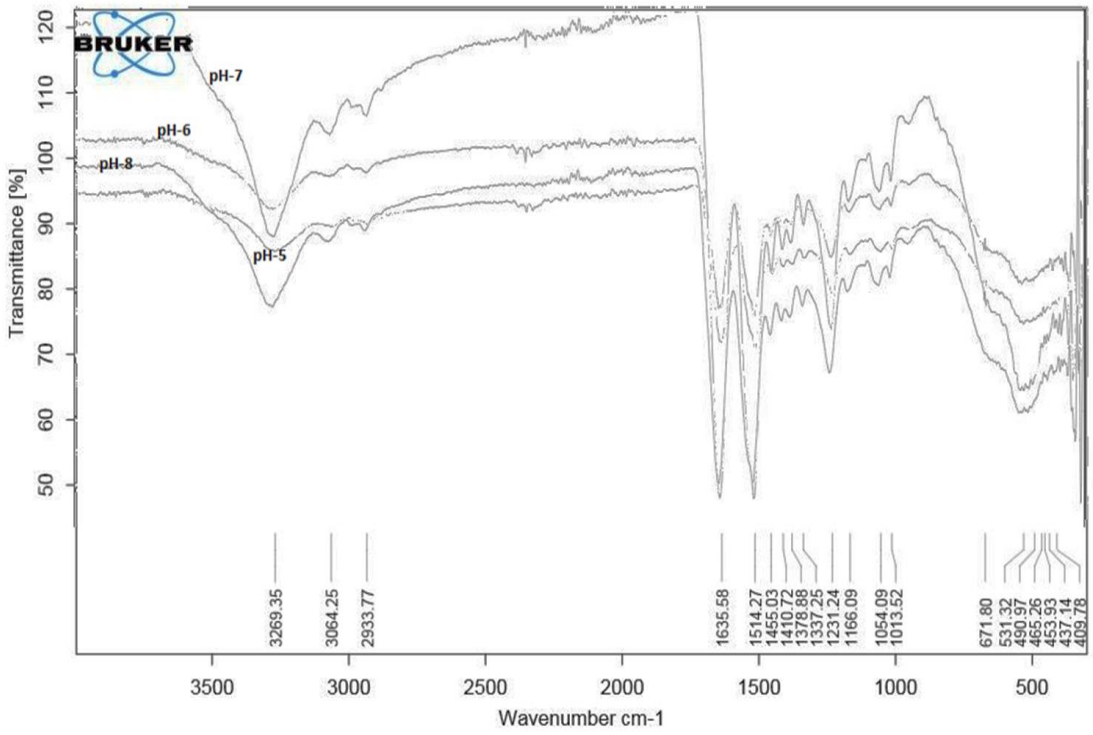
FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların bulunduğu alanlar sayısal olarak belirlenmiştir. F grubu pH 8 fibroin iskelede –OH- ve –C-H- grupları arasında ve 3269,73 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 7.236'dir. Amid I ve Amid II arasında ve 1633,00 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 8.774'dir. Amid II ve Amid III arasında ve 1512,63 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 8.643'dir. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1229,02 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 3.497'dir.

6.4.5. G Serisi Fibroin İskelelerin FTIR Grafikleri

G grubunda pH'ları 5, 6, 7 ve 8 olan numunelerin spektrumlarında Amid I, II ve III, hidroksil, karboksil ile aromatik ve alifatik fonksiyonel grupları, karbon üçlü bağlar hakkında önemli absorbsiyon pikleri görülmüştür (Şekil 6.19).

G grubuna ait pH 5'de hazırlanan fibroin iskelenin FTIR grafiğinde –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3269,35 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 3064,25 cm^{-1}, 2933,77 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. Karbon üçlü bağların gerilme titreşimleri bulunmamaktadır. 1635,58 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1514,17 cm^{-1}, 1455,03 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1410,72 cm^{-1}, 1378,88 cm^{-1}, 1337,25 cm^{-1} 1231,24 cm^{-1}, 1166,09 ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki parmakizi bölgesinde numune için, 671,80 cm^{-1}, 531,32 cm^{-1}, 490,97 cm^{-1}, 465,26 cm^{-1}, 453,93 cm^{-1}, 437,44 cm^{-1}, 409,78 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür.

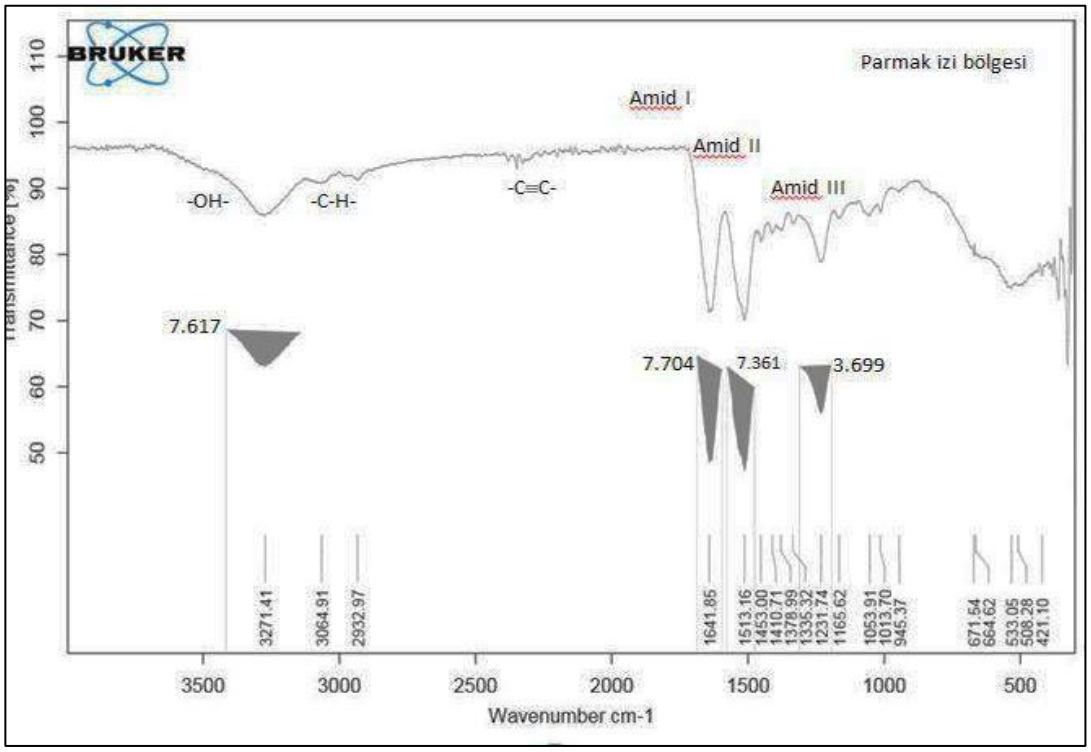
FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların bulunduğu alanlar sayısal olarak belirlenmiştir. G grubu pH 5 fibroin iskelede –OH- ve –C-H- grupları arasında ve 3269,35 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 5.847'dir. Amid I ve Amid II arasında ve 1635,58 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 7.087'dir. Amid II ve Amid III arasında ve 1514,27 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 7.489'dur. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1231,27 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 3.086'dır.



Şekil 6.19. G grubunda tüm pH'lara ait fibroin iskelelerin FTIR spektrumları

G grubuna ait pH 6'da hazırlanan fibroin iskelenin FTIR grafiğinde –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3271,41 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 3064,91 cm^{-1}, 2932,97 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. Karbon üçlü bağların gerilme titreşimleri bulunmamaktadır. 1641,85 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1513,16 cm^{-1}, 1453,00 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1410,71 cm^{-1}, 1378,99 cm^{-1}, 1335,32 cm^{-1} 1231,74 cm^{-1}, 1165,62 ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir.

Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki Parmak izi bölgesinde numune için, 975,37 cm^{-1} 671,54 cm^{-1}, 664,62 cm^{-1}, 533,05 cm^{-1}, 508,28 cm^{-1}, 421,10 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür. FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların bulunduğu alanlar sayısal olarak belirlenmiştir. G grubu pH 6 fibroin iskelede –OH- ve –C-H- grupları arasında ve 3271,41 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 7.617'dir. Amid I ve Amid II arasında ve 1641,85 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 7.704'dir. Amid II ve Amid III arasında ve 1513,16 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 7.361'dur. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1231,74 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 3.699'dır (Şekil 6.20).



Şekil 6.20. G grubuna ait pH 6'da hazırlanan fibroin iskelenin FTIR spektrumları, oluşan spesifik alanlar ve alan ölçüleri.

G grubuna ait pH 7'de hazırlanan fibroin iskelenin FTIR grafiğinde –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3271,53 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 3067,31 cm^{-1}, 2934,50 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir.

Karbon üçlü bağların gerilme titreşimleri bulunmamaktadır. 1638,59 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1513,78 cm^{-1}, 1450,77 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri

arasında Amid II; 1409,74 cm^{-1}, 1379,62 cm^{-1}, 1332,70 cm^{-1} 1232,93 cm^{-1}, 1168,88 ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Ayrıca spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki parmak izi bölgesinde numune için, 945,92 cm^{-1} 671,10 cm^{-1}, 664,62 cm^{-1}, 527,05 cm^{-1}, 445,85 cm^{-1}, 413,29 cm^{-1}, 400,58 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür. FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların bulunduğu alanlar sayısal olarak belirlenmiştir. G grubu pH 7 fibroin iskelede –OH- ve –C-H- grupları arasında ve 3271,53 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 16.460'dır. Amid I ve Amid II arasında ve 1638,59 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 12.546'dır. Amid II ve Amid III arasında ve 1513,78 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 15.451'dir. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1232,93 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 7.349'dur.

G grubuna ait pH 8'de hazırlanan fibroin iskelenin FTIR grafiğinde –OH- bağlarının gerilme titreşimleri 3270,96 cm^{-1} ile 3600-3200 cm^{-1} pikleri arasında görülmüştür. Alifatik C-H'nin gerilme titreşimleri 3066,90 cm^{-1}, 2935,01 cm^{-1} ile 3200-2850 cm^{-1} pikleri arasında izlenmiştir. Karbon üçlü bağların gerilme titreşimleri bulunmamaktadır. 1639,24 cm^{-1} ile 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I; 1513,77 cm^{-1}, 1450,63 cm^{-1} ile 1600-1450 cm^{-1} pikleri arasında Amid II; 1409,72 cm^{-1}, 1378,83 cm^{-1}, 1332,88 cm^{-1} 1233,04 cm^{-1}, 1168,22 ile 1450-1100 cm^{-1} pikleri arasında Amid III bağları gözlemlenmiştir. Ayrıca, spektrum üzerinde 1000-400 cm^{-1} pikleri arasındaki parmakizi bölgesinde numune için, 946,36 cm^{-1}, 539,72 cm^{-1}, 436,53 cm^{-1}, 413,55 cm^{-1} pikleri ölçülmüştür. FTIR ölçümlerinin yanında fonksiyonel grupların bulunduğu alanlar sayısal olarak belirlenmiştir. G grubu pH 8 fibroin iskelede –OH- ve –C-H- grupları arasında ve 3270,96 cm^{-1} pikinin üzerinde ölçülen alan değeri 17.185'dir. Amid I ve Amid II arasında ve 1639,24 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan değeri 23.106'dır. Amid II ve Amid III arasında ve 1513,77 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan 15.937'dir. Amid III ve Parmak izi bölgesi arasında 1233,04 cm^{-1} piki üzerinde ölçülen alan ise 7.168'dir. Fibroin iskelerin hazırlanma prosedürlerinin birbirleri ile karşılaştırması yapılmış olup, karşılaştırma sonuçları Tablo 6.2'de verilmiştir. Tablodan da görüleceği üzere farklı fiziksel şartlar altında gerçekleştirilen iskele hazırlama teknikleri fibroin iskelelerin yapısı üzerinde değişiklikler oluşmasına neden olmuştur.

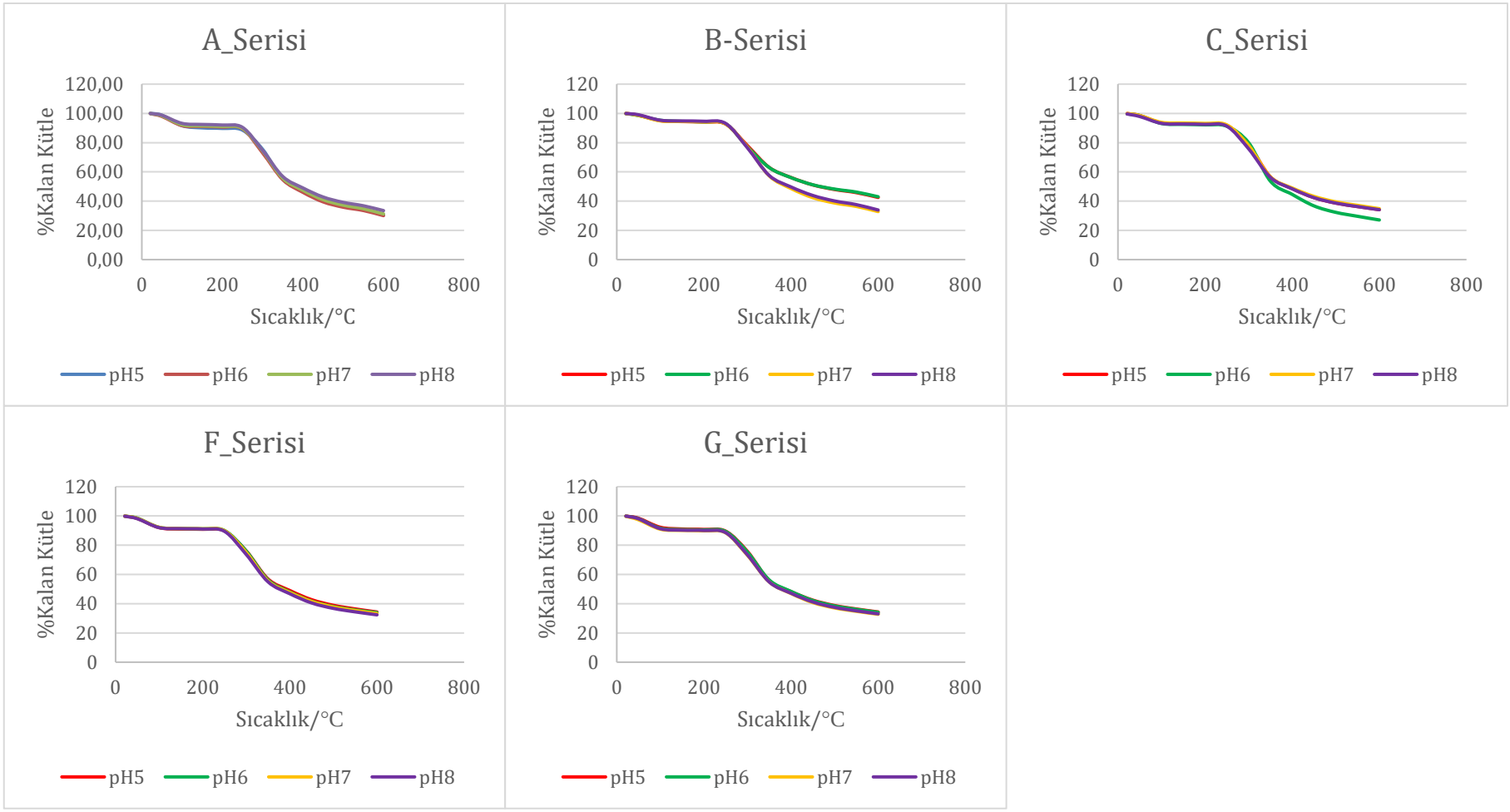
Tablo 6.2. *İzlenen deney prosedürlerine göre FTIR spektrumlarının karşılaştırılması*

Spektrum Bölgeleri	A GRUBU	B GRUBU	C GRUBU	F GRUBU	G GRUBU
-OH- bölgesi	Tüm grup ve pH'larda yaklaşık aynı şiddette pik oluştu. Ancak pH'lar değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pikşiddeti de değişmiştir.	Tüm grup ve pH'larda yaklaşık aynı şiddette pik oluştu. Ancak pH'lar değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pikşiddeti de değişmiştir.	Tüm grup ve pH'larda yaklaşık aynı şiddette pik oluştu. Ancak pH'lar değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pikşiddeti de değişmiştir.	Tüm grup ve pH'larda yaklaşık aynı şiddette pik oluştu. Ancak pH'lar değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pikşiddeti de değişmiştir.	Tüm grup ve pH'larda yaklaşık aynı şiddette pik oluştu. Ancak pH'lar değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pikşiddeti de değişmiştir.
-C-H- bölgesi	Tüm pH değerlerine ait numuneler, yaklaşık aynı şiddette pik gösterdi.	pH-5 ve 6 da pik gözlenmemiştir. pH-7 ve 8'de ise pik gözlenmiştir.	pH 5, 6 ve 8'e ait numunelerde pik değerleri yaklaşık aynıdır ancak pH 7'de pik farklılık göstermiştir.	Tüm pH değerlerine ait numuneler, yaklaşık aynı şiddette pik gösterdi.	Tüm pH değerlerine ait numuneler, yaklaşık aynı şiddette pik gösterdi.
-C≡N-bölgesi	Bu bölgede pik izlenmemiştir.	Bu bölgede pik izlenmemiştir.	pH 5, 6, 7 de yaklaşık aynı değerde pikler izlenmiştir. pH 8'de ise pik izlenmemiştir.	pH 5, 6 yaklaşık aynı değerde pikler izlenmiştir. pH 7 ve 8'de ise pik izlenmemiştir.	Bu bölgede pik izlenmemiştir.
Amid I	Tüm pH değerlerine ait numuneler, yaklaşık aynı şiddette pik gösterdi. F ve G gruplarıyla benzer şiddettelerdir.	Tüm pH değerlerine ait numuneler, yaklaşık aynı şiddette pik gösterdi. C grubuyla benzer şiddettelerdir.	Tüm pH değerlerine ait numuneler, yaklaşık aynı şiddette pik gösterdi. B grubuyla benzer şiddettelerdir.	Tüm pH değerlerine ait numuneler, yaklaşık aynı şiddette pik gösterdi. A ve G gruplarıyla benzer şiddettelerdir.	Tüm pH değerlerine ait numuneler, yaklaşık aynı şiddette pik gösterdi. A ve F gruplarıyla benzer şiddettelerdir.
Amid II	Tüm grup ve pH'larda yaklaşık aynı şiddette pik oluştu. Ancak pH'lar değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pikşiddeti de değişmiştir.	Tüm grup ve pH'larda yaklaşık aynı şiddette pik oluştu. Ancak pH'lar değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pikşiddeti de değişmiştir.	Tüm grup ve pH'larda yaklaşık aynı şiddette pik oluştu. Ancak pH'lar değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pikşiddeti de değişmiştir.	Tüm grup ve pH'larda yaklaşık aynı şiddette pik oluştu. Ancak pH'lar değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pikşiddeti de değişmiştir.	Tüm grup ve pH'larda yaklaşık aynı şiddette pik oluştu. Ancak pH'lar değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pikşiddeti de değişmiştir.
Amid III	Tüm pH değerlerine ait numuneler, yaklaşık aynı şiddette pik gösterdi. F-pH-5, 8 ve G gruplarıyla benzer şiddettedir. Ancak pH'lar değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pik şiddetleri değişmiştir.	Tüm pH değerlerine ait numuneler, yaklaşık aynı şiddette pik gösterdi. F-pH-6, 7 ve C gruplarıyla benzer şiddettedir. Ancak pH'lar değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pik şiddetleri değişmiştir.	Tüm pH değerlerine ait numuneler, yaklaşık aynı şiddette pik gösterdi. F-pH-6, 7 ve B gruplarıyla benzer şiddettelerdir. Ancak pH'lar değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pik şiddetleri değişmiştir.	F-pH 5 ve 8, A ve G gruplarıyla, F-pH 6 ve 7 ise B ve C gruplarıyla benzer şiddettedir. Ancak pH'lar değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pik şiddetleri değişmiştir.	Tüm pH değerlerine ait numuneler, yaklaşık aynı şiddette pik gösterdi. F-pH-5, 8 ve A gruplarıyla benzer şiddettelerdir. Ancak pH'lar değiştikçe piklerin bu bölgede verdiği pik şiddetleri değişmiştir.
Parmak izi bölgesi	Farklı pH'taki numune için kaymalar göstermektedir	Farklı pH'taki numune için kaymalar göstermektedir	Farklı pH'taki numune için kaymalar göstermektedir	Farklı pH'taki numune için kaymalar göstermektedir	Farklı pH'taki numune için kaymalar göstermektedir

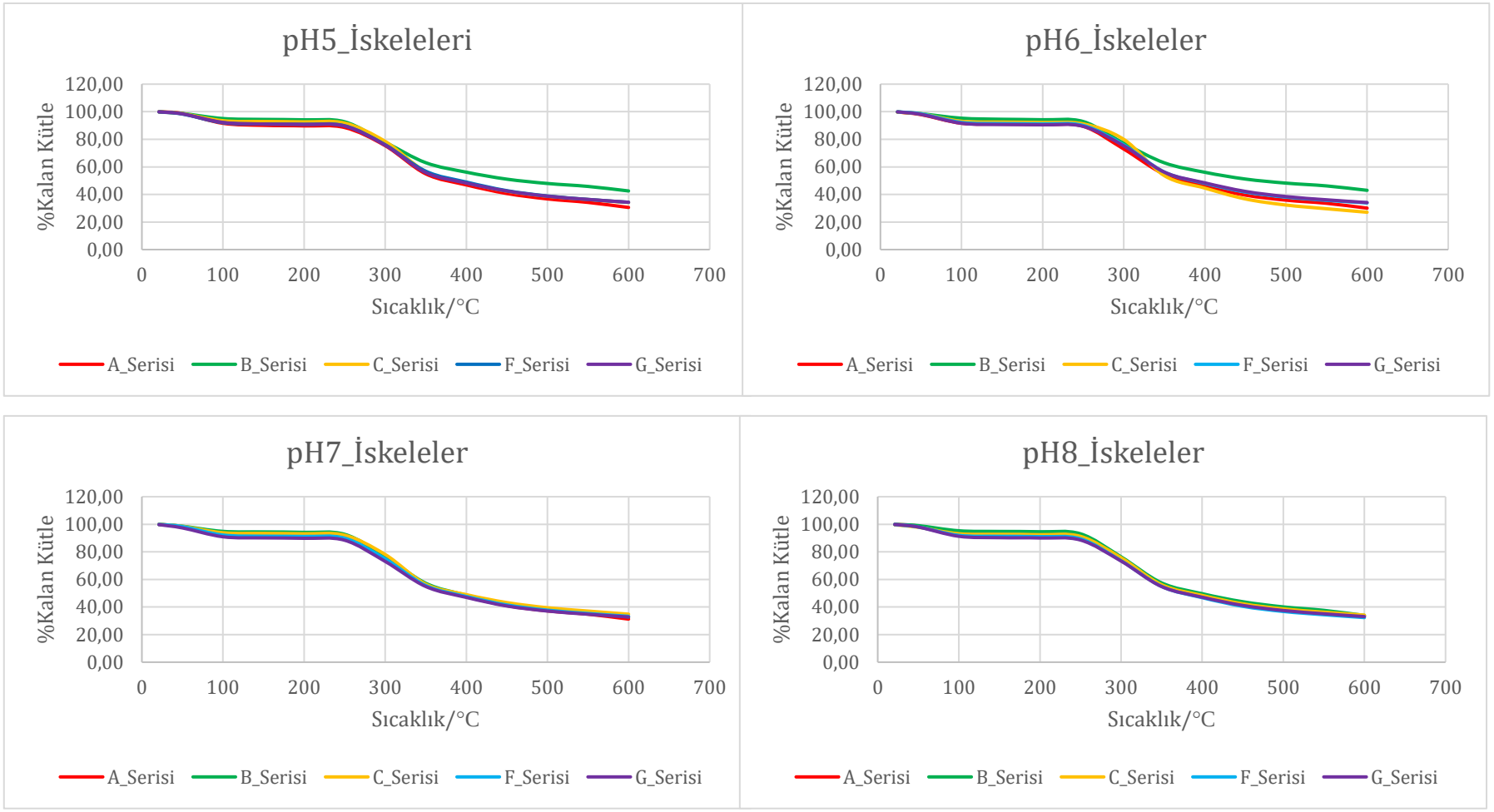
6.5. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Termogravimetrik yöntem, hazıranan fibroin iskeleler üzerinde sıcaklık değişiminin numune kütlesinde değişim oluşturması nedeni ile büyük ölçüde bozunma ve yükseltgenme (oksidasyon) reaksiyonları ile buharlaşma, süblimleşme ve desorpsiyon gibi işlemlerde oluşan etkileri ölçmek amacıyla kullanılmıştır. Polimerik yapılan termal özellikleri ve ısı karşında gösterdikleri davranışları, Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulma ve Araştırma Merkezinde bulunan HITACHI marka STA7300 model termogravimetrik analiz (TGA) sistemi kullanılarak incelendi.

Örneklerden belirli miktarlara tartılarak alüminyum pan içerisine yerleştirilmiştir. Numunler için deney koşulları, oda sıcaklığından (21°C) 600°C'ta kadar 10 °C/dk ısıtma hızı ile azot/kuru hava karışımının kullanılması ile oluşturulmuştur. Sıcaklık artışına karşı kütle değişim verileri istatistiki olarak incelenmiş olup, kütledeki yüzdesel değişim tespit edilerek sıcaklığa karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekül 6.21 ve 6.22). Fibroine ait termogramlarda, ölçüm sıcaklığı aralığında sadece bir kere bozunmanın gerçekleştiği görüldü. Bu durum fibroinin protein yapısında olmasından dolayı sahip olduğu sekonder ve tersiyer yapılarından kaynaklanmaktadır. Molekül primer yapıda lifli yapıdadır ve sekonder yapı olarak genel olarak beta tabakalı yapıya sahip olmakla birlikle daha az oranda alfa heliks yapıda bulunmaktadır. Fibroin zincirlerinde, molekül içi ve moleküller arası çok sayıda hidrojen bağı mevcuttur. Bu nedenle fibroin ısıl bozunmalara, amfortik özelliğinden dolayı da asit ve bazlara karşı dirençlidir. Yapıların termogravimetrik değişimleri incelendiğinde genel olarka birbirine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Üretim yöntemleri karşılatırıldığında en yüksek bozunma oranı C serisinde elde edilmiştir. Aynı üretim yöntemleri içerisindeki pH değişimlerinin termal bozunma hızı üzerine çok etkili olmadığı görülmekle birlikte bu etkinin en belirgin B ve C serisinde ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Şekil 6.21). pH değerlerinin termal bozunma hızı üzerisine etkisini gösteren grafiler şekil 6.22'te verilmiştir. Grafikten de görüldüğü üzere genel olarka üretim yönteminden bağımsız olarak aynı pH değerine sahip numunelerin sıcaklıkla bozunma hızları genel olarak aynıdır. Ancak asidik pH değerlerinde bozunma hızının üretim yöntemlerine bağlı olarak kısmen de olsa farklılık gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 6.21. Deneysel serilerdeki numunelerin artan sıcaklığa bağlı olarak yapısındaki kütle azalmasının istatistiksel olarak pH bazında karşılatırmalı gösterimi.

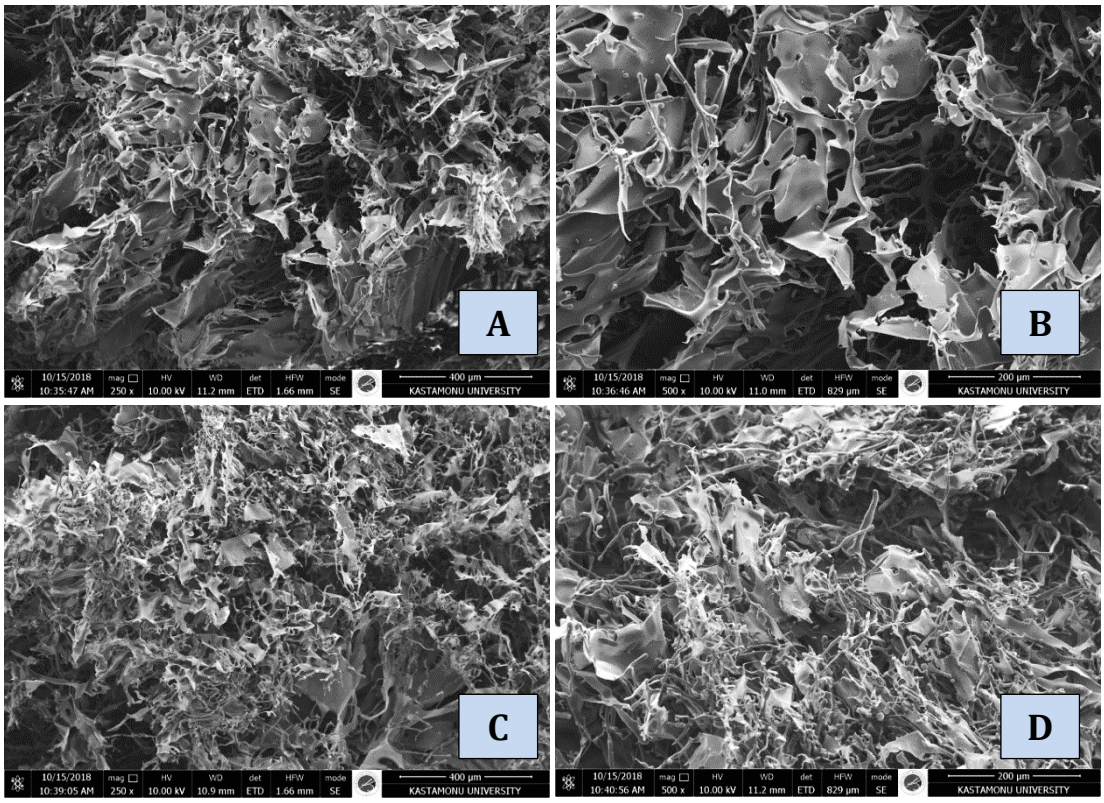


Şekil 6.22. Aynı pH değerine sahip farklı deney serilerindeki numunelerin artan sıcaklığa bağlı olarak yapısındaki kütle azalmasının istatistiksel olarak pH bazında karşılatırmalı gösterimi.

6.6. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

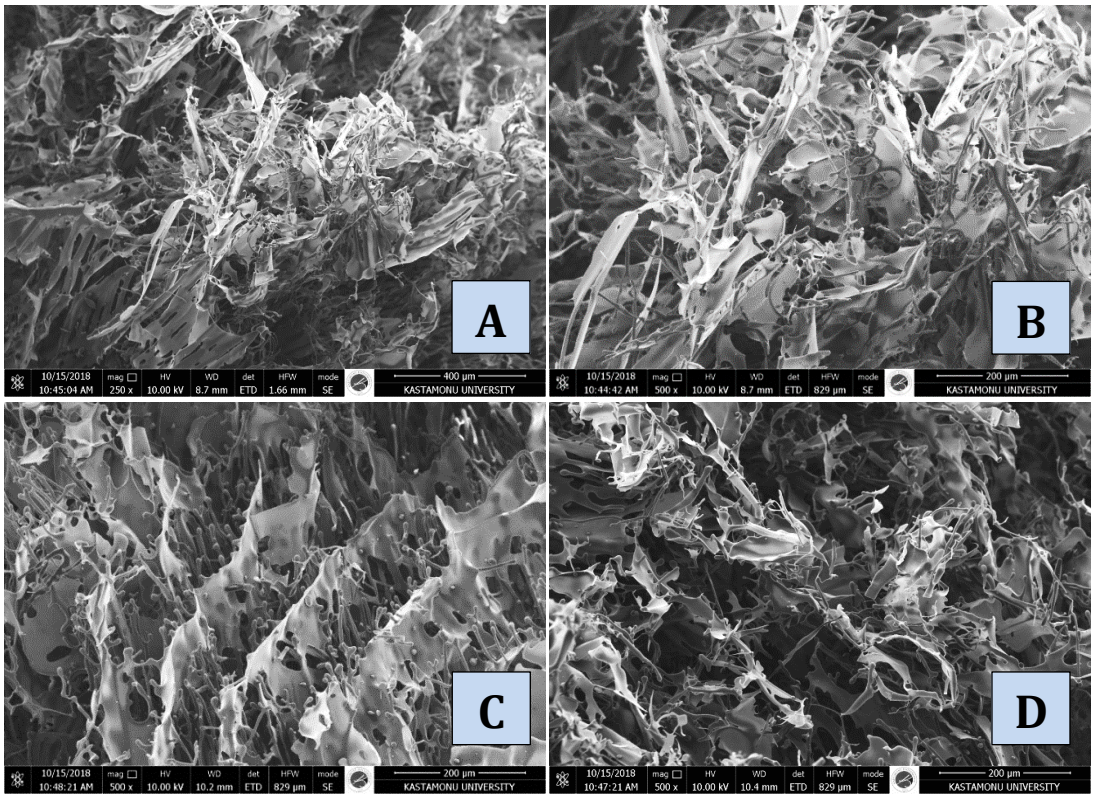
Bombyx Mori ipek böceğinden izole edilerek saflaştırılan fibroinlerin farklı pH değerlerlerinde hazırlan çözeltilleri ile farklı deney prosedürleri kullanılarak elde edilen iskelelerden belirli boyutlarda kesilen numuneler, paladyum ile kaplanarak Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (FEI, Quanta FEG 250) ile görüntülenerek morfolojileri incelenmiştir. SEM görüntüleri Şekil 6.23 - 6.32 aralığında verilmiştir.

A grubu numunelerinin SEM analizinde; pH 5'e sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine bağlı açık gözenekli yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede makro ve mikro porozitenin yanında beta-sheet benzeri tabakalı yapılar da gözlendi. pH 6'ya sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, yarı düzenli yerleşimli, birbirlerine bağlı küçük ve açık gözenekli yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede çoğunlukla mikro porozitenin yanında beta-sheet benzeri tabakalı yapılar da gözlendi.



Şekil 6.23. Standart Liyofilizasyon(A Grubu) prosedürü ile elde edilen ve pH'ları 5 (A,C) ve 6 (B, D) olan numunelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri.

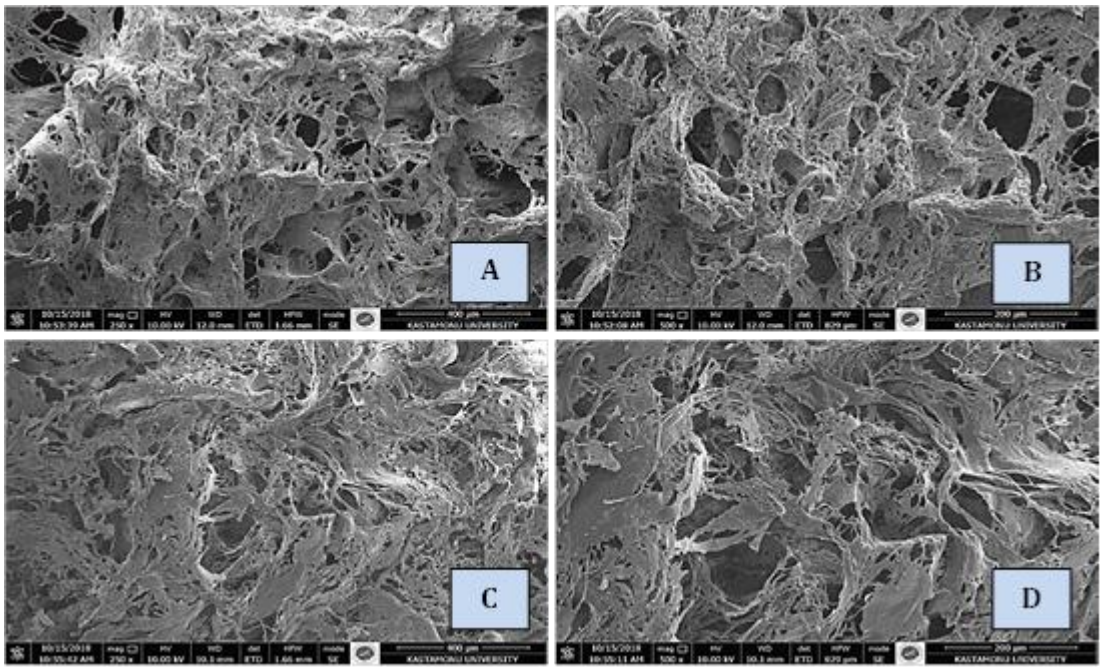
pH 7'ye sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine bağlı düzensiz gözenekli ve lifli yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede çoğunlukla mikro-makro porozitenin yanında fazla oranda beta-sheet benzeri tabakalı yapılar da gözlendi. pH 8'e sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, yarı düzenli yerleşimli, birbirlerine bağlı açık gözenekli ve lifli yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede çoğunlukla mikro-makro porozitenin yanında fazla oranda beta-sheet benzeri tabakalı yapılar da gözlendi.



Şekil 6.24. Standart Liyofilizasyon (A Grubu) prosedürü ile elde edilen ve pH'ları 7 (A, B) ve 8 (C,D) olan numunelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri.

B grubu numunelerin SEM analizinde; pH 5'e sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine bağlı düzensiz büyük gözenekli yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede çoğunlukla mikro-makro porozitenin yanında birbirleriye bağlantılı tabaka(beta-sheet) ve lif benzeri yapılar da gözlendi. Büyük-makro gözenekli yapıların oluşumu deneyde kullanulan porojen parçacıkları (NaCl) ile doğru orantılıdır.

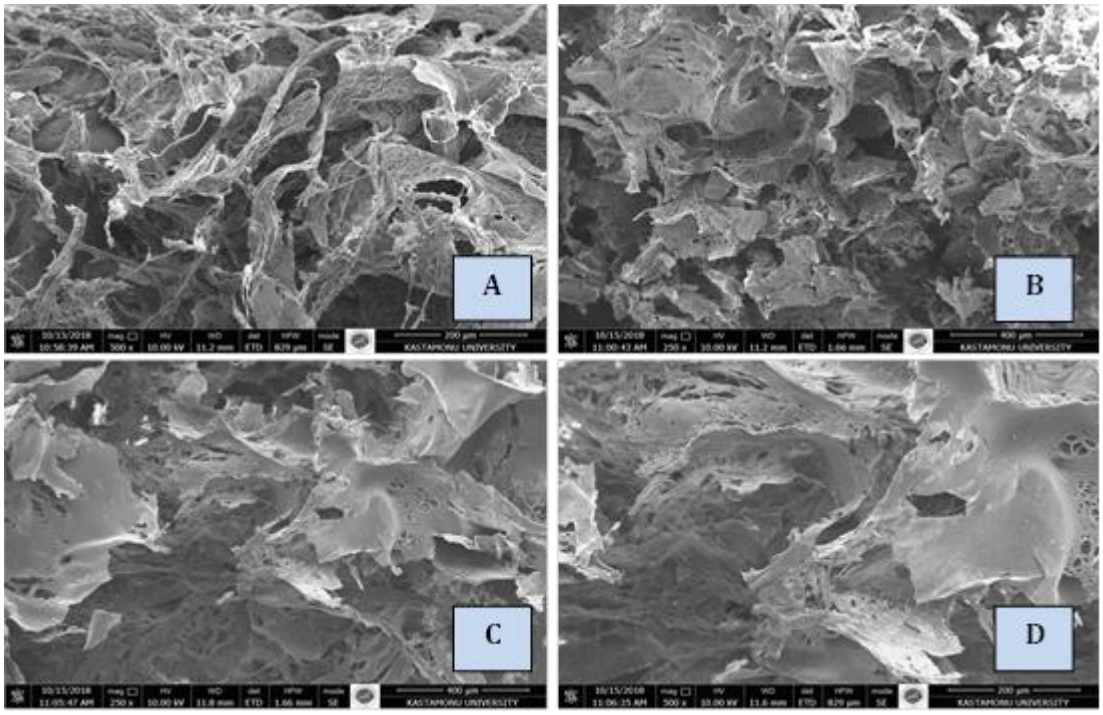
pH 6'ya sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine bağlı düzensiz gözenekli yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede çoğunlukla mikro-makro porozitenin yanında birbirleriye bağlantılı tabaka(beta-sheet) ve lif benzeri yapılar da gözlendi. Büyük-makro gözenekli yapıların oluşumu deneyde kullanulan porojen parçacıkları (NaCl) ile doğru orantılıdır.



Şekil 6.25. Porojen Arındırma Yöntemi ve Vakumlu Etüv İşlemi (B Grubu) ile elde edilen pH'ları 5 (A,C) ve 6 (B,D) olan fibroin iskelelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri.

pH 7'ye sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu ancak gözenekli yapılar ile tabakalı yapıların homojen yayılmada bulunmadığı, düzensiz yerleşimli, birbirlerine bağlı düzensiz açık gözenekli yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede çoğunlukla makro, az oranda mikro porozitenin yanında birbirleriye bağlantılı tabaka(beta-sheet) benzeri yapılar da gözlendi. Tabakalar üzerinde yine küçük gözenekli yapılar izlendi. Büyük-makro gözenekli yapıların oluşumu deneyde kullanılan porojen parçacıkları(NaCl) ile doğru orantılıdır. pH 8'e sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu ancak gözenekli yapılar ile tabakalı yapıların homojen yayılmada bulunmadığı, düzensiz yerleşimli, birbirlerine bağlı düzensiz açık gözenekli yapıların bulunduğu görüldü.

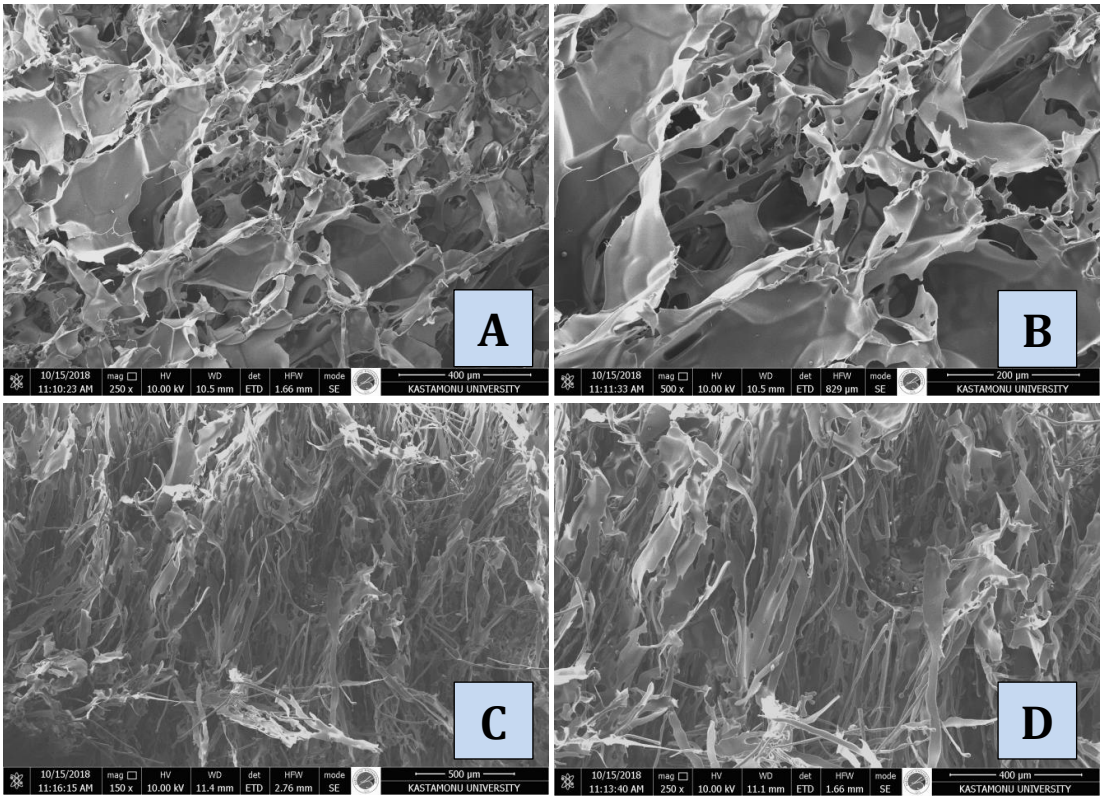
Fibroin iskelede makro ve mikro porozitenin yanında birbirleriye bağlantılı tabaka(beta-sheet) benzeri yapılar da gözlendi. Tabakalar üzerinde yine küçük gözenekli yapılar izlendi. Büyük-makro gözenekli yapıların oluşumu deneyde kullanulan porojen parçacıkları(NaCl) ile doğru orantılıdır.



Şekil 6.26. Porojen Arındırma Yöntemi ve Vakumlu Etüv İşlemi (B Grubu) ile elde edilen pH'ları 7 (A,C) ve 8 (B,D) olan fibroin iskelelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri.

C grubu numunelerin SEM analizinde; pH 5'e sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine bağlı düzensiz ve açık gözenekli yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede çoğunlukla makro, az oranda mikro porozitenin yanında birbirleriye bağlantılı yoğun tabakalar (beta-sheet) ve lif benzeri yapılar da gözlendi.

pH 6'ya sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine bağlı düzensiz ve açık gözenekli yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede çoğunlukla makro porozitenin yanında birbirleriye bağlantılı yoğun tabakalar (beta-sheet) ve lif benzeri yapılar da gözlendi.

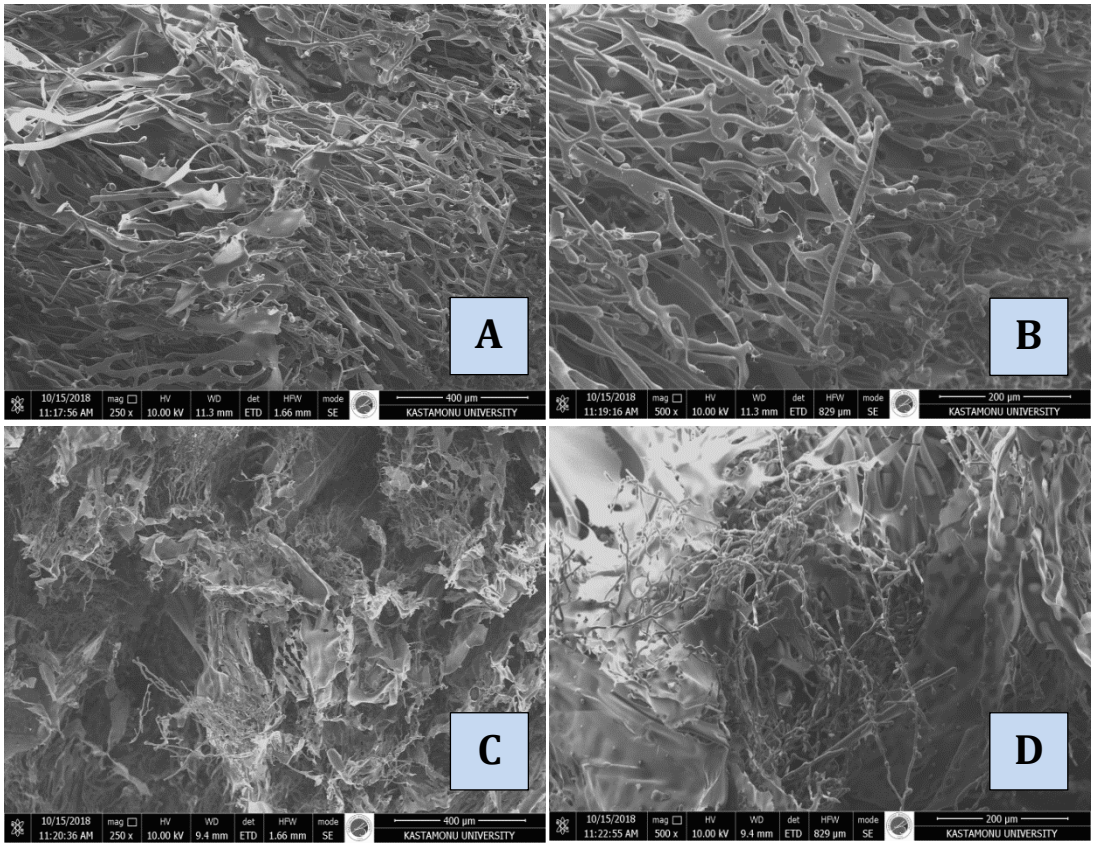


Şekil 6.27. Standart Liyofilizasyondan Sonra Kuru Haldeki İskelelerin Otoklavlanması (C Grubu) ile elde edilen pH'ları 5 (A, C) ve 6 (B, D) olan fibroin iskelelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri.

pH 7'ye sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine bağlı yarı açık gözenekli yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede çoğunlukla makro porozitenin yanında birbirleriye bağlantılı ince ve yer yer kalınlaşan yoğun tabakalar(beta-sheet) ve inceli kalınlı lif benzeri yapılar da gözlendi. Lif ve levha benzeri yapıların uç kısımlarında da ufak boyutlarda yine farklı uzantılar ve yapılanmalar dikkati çekti. Ayrıca bu örneğin SEM görüntüsü diğer grup numunelerinden ve C-pH-5 ile C-pH-6'ya göre oldukça farklıdır.

pH 8'e sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine bağlı yarı açık gözenekli yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede çoğunlukla makro porozitenin yanında birbirleriye bağlantılı orta kalınlıkta ve yer yer daha da kalınlaşan yoğun tabakalar(beta-sheet) ve inceli kalınlı lif benzeri yapılar da gözlendi. Lif ve tabaka benzeri yapıların uç kısımlarında da yine farklı uzantılar ve yapılanmalar dikkati çekti.

Ayrıca bu örneğin SEM görüntüsü C-pH-7 ile oldukça benzer olup, diğer grup numunelerinden ve C-pH-5 ile C-pH-6'ya göre oldukça farklıdır.

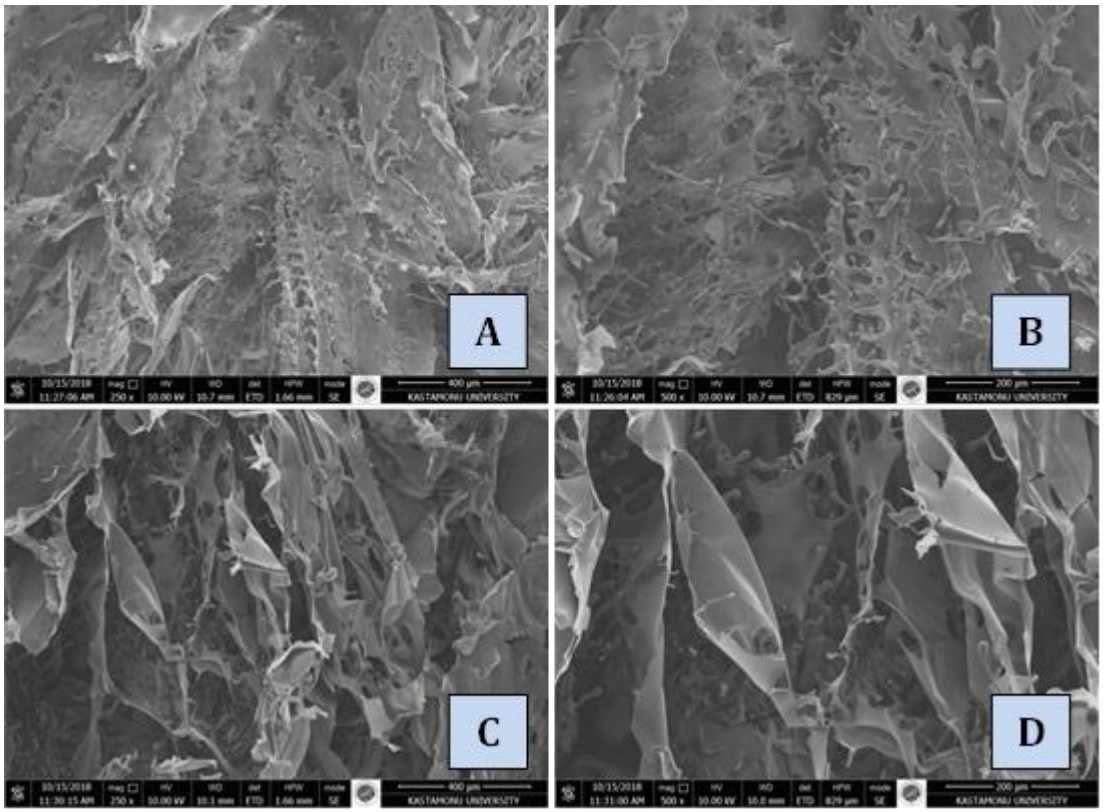


Şekil 6.28. Standart Liyofilizasyondan Sonra Kuru Haldeki İskelelerin Otoklavlanması İşlemi(C Grubu) ile elde edilen pH'ları 7 (A,C) ve 8 (B,D) olan fibroin iskelelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri.

F grubu numunelerin SEM analizinde; pH 5'e sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine bağlı olmayan, yarı açık ve küçük gözenekli yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede farklı oranda dağınık mikro-makro porozitenin yanında birbirleriye bağlantılı oldukça yoğun ve geniş tabakalar(beta-sheet) bulundu, bazı levhaların üzerlerinde ise yine mikro gözenekler izlendi. Geniş levhaların bağlanma bölgelerinde yine gözenekli yapılar görüldü.

pH 6'ya sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine bağlı olmayan, yarı açık ve küçük gözenekli yapıların bulunduğu görüldü.

Fibroin iskelede farklı oranlarda dağınık mikro-makro porozitenin yanında birbirleriye bağlantılı oldukça yoğun ve geniş tabakalar (beta-sheet) bulundu, bazı tabakaların üzerlerinde ise yine mikro gözenekler izlendi. Geniş levhaların bağlanma bölgelerinde yine gözenekli yapılar görüldü. Bu numunenin SEM görüntüsünde gözlenen tabakaların diğer tüm numunelerden farklı olduğu, pH 5'e göre daha kalın olduğu izlendi.

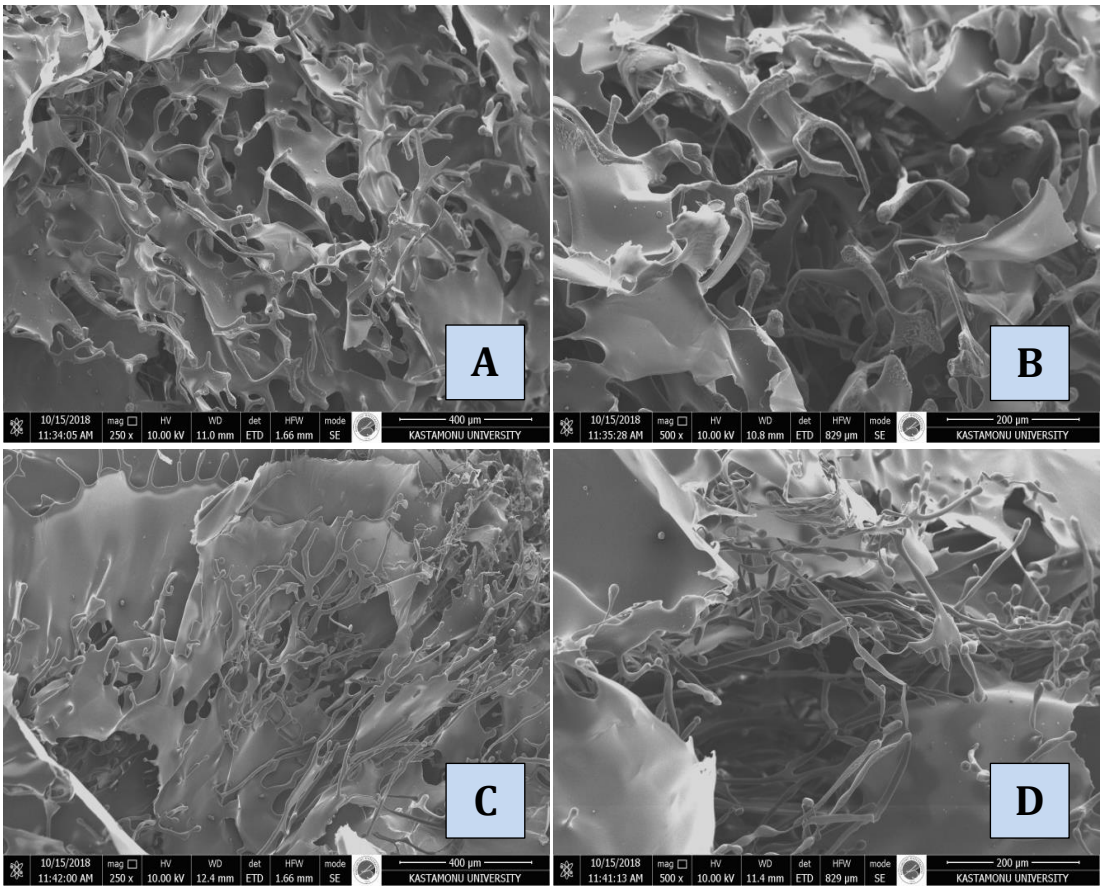


Şekil 6.29. Standart Liyofilizasyondan Sonra Kuru Haldeki İskelelerin Etüvlenmesi (F Grubu) ile elde edilen pH'ları 5 (A,C) ve 6 (B,D) olan fibroin iskelelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri.

pH 7'ye sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine yer yer bağlı, açık ve gözenekli yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede farklı oranlarda dağınık, çoğunlukla makro porozitenin yanında birbirleriyle bağlantılı oldukça yoğun, ince ve geniş tabakalar (beta-sheet) görüldü. Tabakaların bağlanma bölgelerinde yine gözenekli yapılar görüldü. Bu levhaların uç kısımlarında oluşan ince uzantıların yine kendi aralarında temas kurması ile büyük gözenekli yapıların da meydana geldiği görüldü.

Bu numunenin SEM görüntüsünde gözlenen katmanların diğer tüm numunelerden ve pH-5 ve 6'dan farklı olduğu, pH-8'e göre daha ince olduğu izlendi.

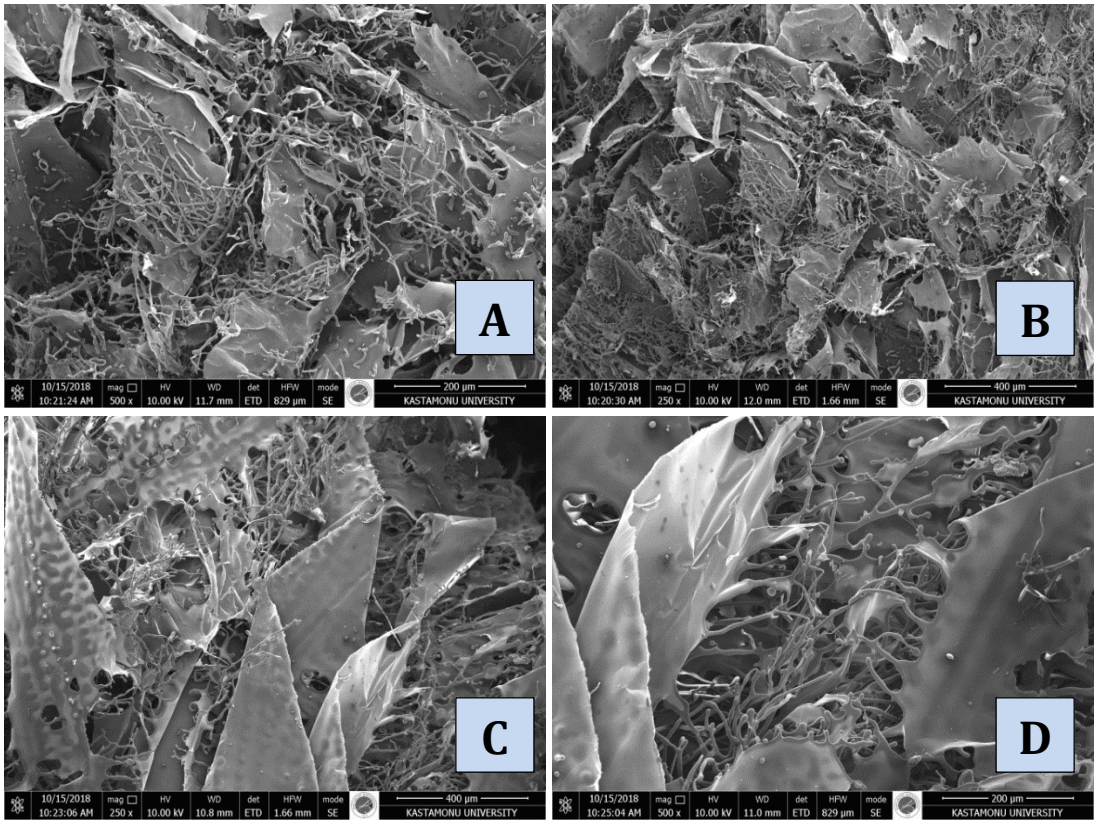
pH 8'e sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine yer yer bağlı, açık ve gözenekli yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede farklı oranlarda dağınık, çoğunlukla makro porozitenin yanında birbirleriyle bağlantılı oldukça yoğun, çoğunluğu geniş tabakalar (beta-sheet) olan, geniş tabakalardan uzayan uzun ince tabakalar bulundu. Bu tabakaların uç kısımlarında oluşan uzantıların yine kendi aralarında temas kurması ile büyük gözenekli yapıların da meydana geldiği görüldü. Bu numunenin SEM görüntüsünde gözlenen tabakaların diğer tüm numunelerden ve pH-5 ve 6'dan farklı olduğu, pH-7'ye göre daha kalın olduğu izlendi.



Şekil 6.30. Standart Liyofilizasyondan Sonra Kuru Haldeki İskelelerin Etüvlenmesi (F Grubu) ile elde edilen pH'ları 7 (A,C) ve 8 (B,D) olan fibroin iskelelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri.

G grubu numunelerin SEM analizinde; pH 5'e sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine yer yer bağlı lifsi yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede farklı oranlarda dağınık, çoğunlukla makro porozitenin yanında birbirleriyle bağlantılı oldukça yoğun, çoğunluğu geniş tabakalar(beta-sheet) olan, geniş tabakalardan uzayan ince kısa tabakalar bulundu. Bu tabakaların uç kısımlarında oluşan uzantıların yine kendi aralarında temas kurması ile küçük gözenekli yapıların da meydana geldiği görüldü. Bu numunenin SEM görüntüsünde gözlenen tabakaların F grubu numuneleri ile benzer olduğu ve pH 7 ve 8'den farklı olduğu, pH 6'ya göre daha ince olduğu izlendi.

pH 6'ya sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine yer yer bağlı lifsi yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede farklı oranlarda dağınık, çoğunlukla mikro porozitenin yanında birbirleriyle bağlantılı oldukça yoğun, çoğunluğu geniş levhalar(beta-sheet) olan, geniş tabakalardan uzayan ince kısa tabakalar bulundu. Bu levhaların uç kısımlarında oluşan uzantıların yine kendi aralarında temas kurması ile küçük-büyük gözenekli yapıların da meydana geldiği görüldü. Bu numunenin SEM görüntüsünde gözlenen tabakaların F grubu numuneleri ile benzer olduğu ve pH-7 ve 8'den farklı olduğu, pH-5'e göre daha kalın olduğu izlendi.



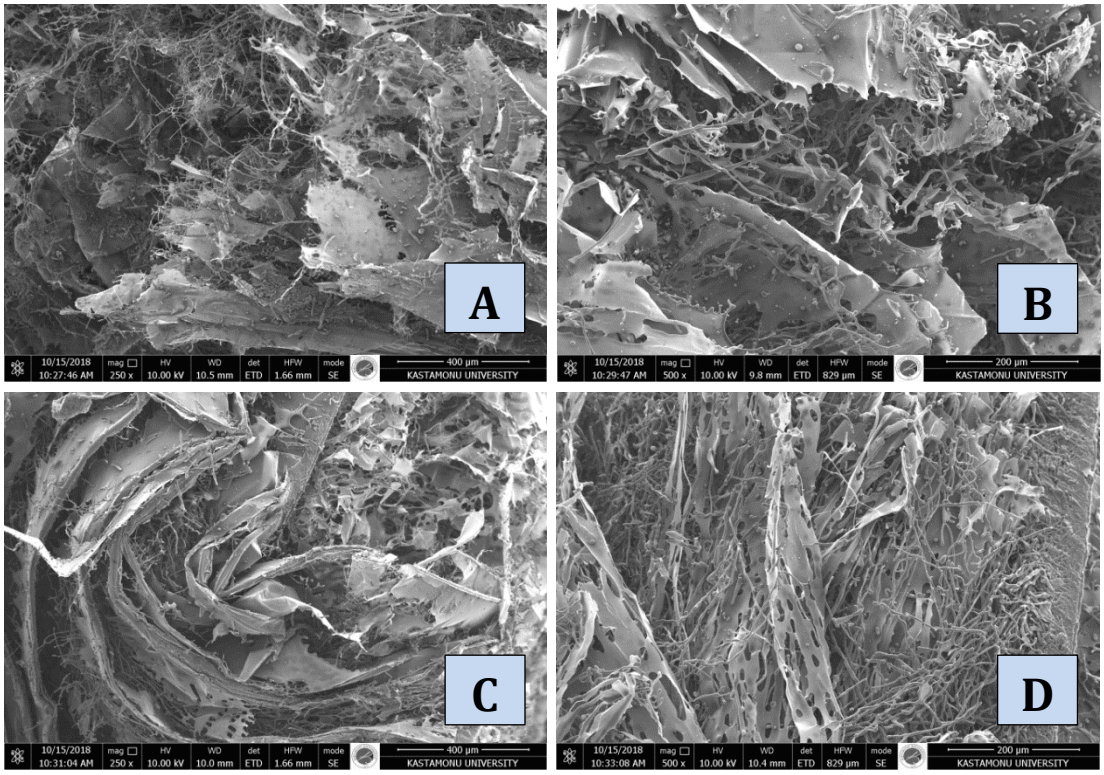
Şekil 6.31. Fibroin çözeltilerinin 121°C'ta otoklavlanmasından sonra standart liyofilizasyon ile üretilen (G Grubu) pH'ı 5 (A,C) ve 6 (B,D) olan fibroin iskelelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri.

pH 7'ye sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine yer yer bağlı lifsi yapıların bulunduğu görüldü. Fibroin iskelede farklı oranlarda dağınık, çoğunlukla mikro porozitenin yanında birbirleriyle bağlantılı oldukça yoğun, çoğunluğu geniş tabakalar(beta-sheet) olan, geniş tabakalardan uzayan ince kısa tabakalar ve lifsi yapılar bulundu. Bu levhaların uç kısımlarında oluşan uzantıların yine kendi aralarında temas kurduğu görüldü. Geniş tabakaların kendi aralarında kurduğu temas bölgelerinde mikro gözeneklerin olduğu, tabakaların birbirlerine yakın konumlandığı tespit edildi. Bu numunenin SEM görüntüsünde gözlenen tabakaların pH-5 ve 6'dan farklı olduğu, pH-8'e göre daha kalın lifsi yapılar ve daha az gözenekli yapı olduğu izlendi.

pH 8'e sahip fibroin iskelenin SEM görüntüsünde yapısal bütünlüğün korunduğu, düzensiz yerleşimli, birbirlerine yer yer bağlı ince lifsi yapıların bulunduğu görüldü. İnce lifsi yapıların birbirlerine bağlandıkları noktalarda mikro gözeneklerin olduğu izlendi.

Fibroin iskelede farklı oranlarda dağınık, çoğunlukla mikro porozitenin yanında birbirleriyle bağlantılı, ince ve geniş tabakalar(beta-sheet) olan, geniş levhalardan uzayan ince kısa tabakalar ve lifsi yapılar bulundu.

Bu levhaların uç kısımlarında oluşan uzantıların yine kendi aralarında temas kurduğu görüldü. Numunede ince tabakaların-lifsi yapıların geniş tabakalardan daha fazla miktarda bulunduğu, geniş tabakaların kendi aralarında kurduğu temas bölgelerinde mikro gözeneklerin olduğu, tabakalar birbirlerine yakın konumlandığı tespit edildi. Bu numunenin SEM görüntüsünde gözlenen tabakaların pH-5 ve 6'dan farklı olduğu, pH-7'ye göre daha ince lifsi yapılar ve daha fazla gözenekli yapı olduğu izlendi.



Şekil 6.32. Fibroin çözeltilerinin 121°C'ta otoklavlanmasından sonra standart liyofilizasyon ile üretilen (G Grubu) pH'ı 7 (A,C) ve 8 (B,D) olan fibroin iskelelerin farklı yakınlaştırmalarda alınan SEM görüntüleri.

6.7. Civalı Porözimetre ile Yüzey Analizi

Civa gibi reaktif ve ıslatıcı olmayan bir sıvının, yeterli basınç uygulanmadığı takdirde ince gözeneklere giremeyeceği ilkesine dayanan civalı porözimetre cihazı (Quantachrome, Poremaster-33) ile farklı yöntemler ile hazırlanmış fibroin iskelelerin gözeneklilik oranı incelendi.

Tablo 6.3. *Deney serilerinndeki iskelelerin toplam yüzey alanı değerleri.*

Yüzey alanı (m^2/g)	pH5	pH6	pH7	pH8
A_Serisi	34,5992	1,6552	0,3697	1,7822
B_Serisi	67,6183	34,8452	0,9748	0,8652
C_Serisi	3.8425	3,0544	0,7954	9,6250
F_Serisi	0,3569	47,865	0,8080	9.0203
G_Serisi	5,0969	0,3066	0,4734	0,2116

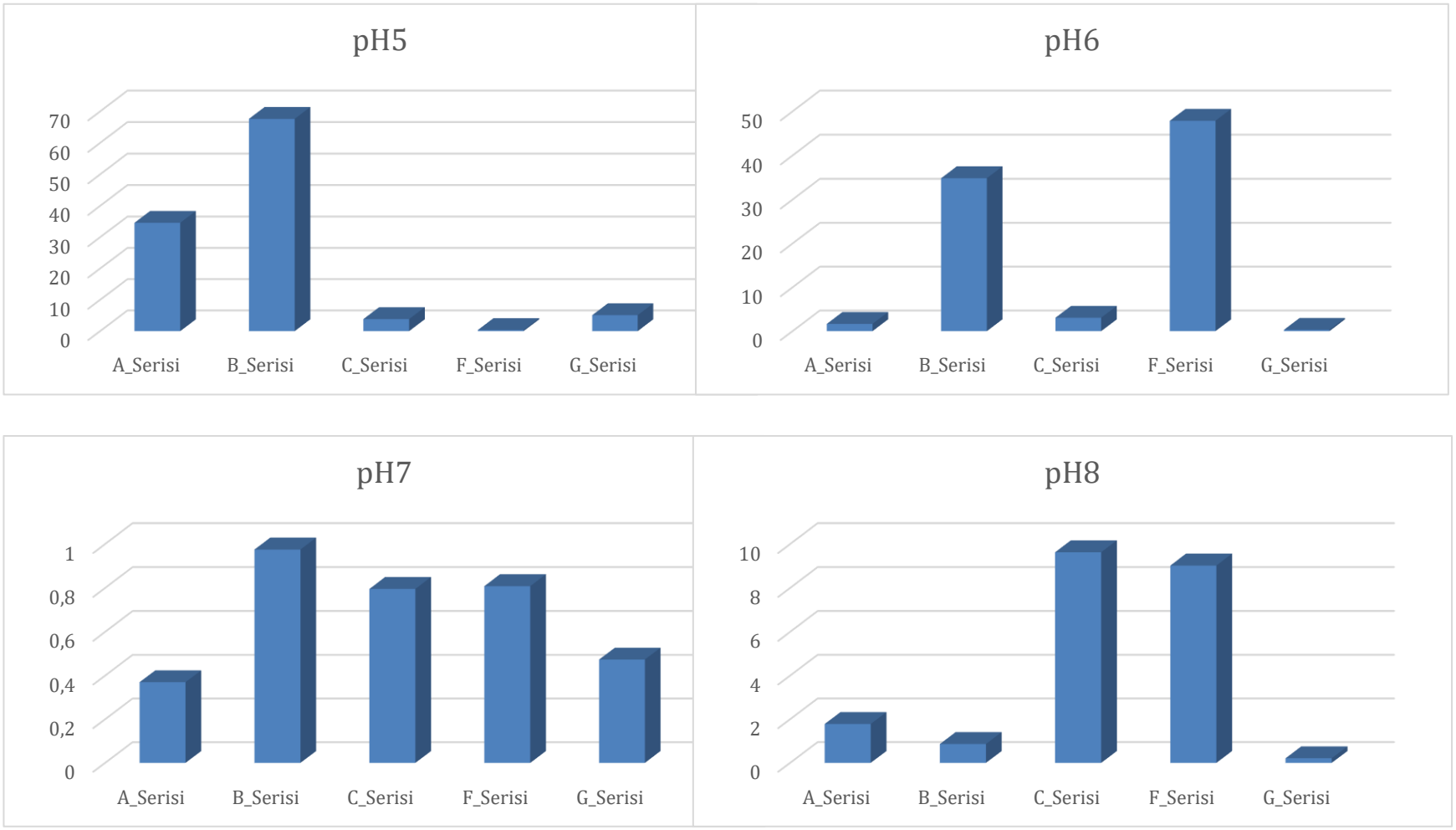
Hazırlanan numunelerin yoğunluk ölçümleri yapıldıktan sonra 480 erg/cm^2 civa yüzey gerilimi, 140° civa temas açısı, 52,195 PSIA'dan 32893,152 PSIA'a kadar basınç aralığında iskelelerin toplam yüzey alanı ölçülmüştür. Ölçüm 4 μm'den 0,006 μm aralığında gözenek yarıçapına sahip gözenekler taranarak gerçekleştirildi.

Fibroin iskelelerin yoğunlukları Quantachrome marka Ltrapyc 1200E model Helium Picnometresi ile ölçüldü. Ölçülen yoğunluk değerlerine karşılık porozimetre sonuçları doğrulanarak toplam yüzey alanı değerleri elde edildi. Analiz sonuçları şekil 6.33 ve 6.34'te verildi. Sonuçlardan kompozit yapılardaki artan fibroin oranının yoğunluğu artırdığı gözlendi.

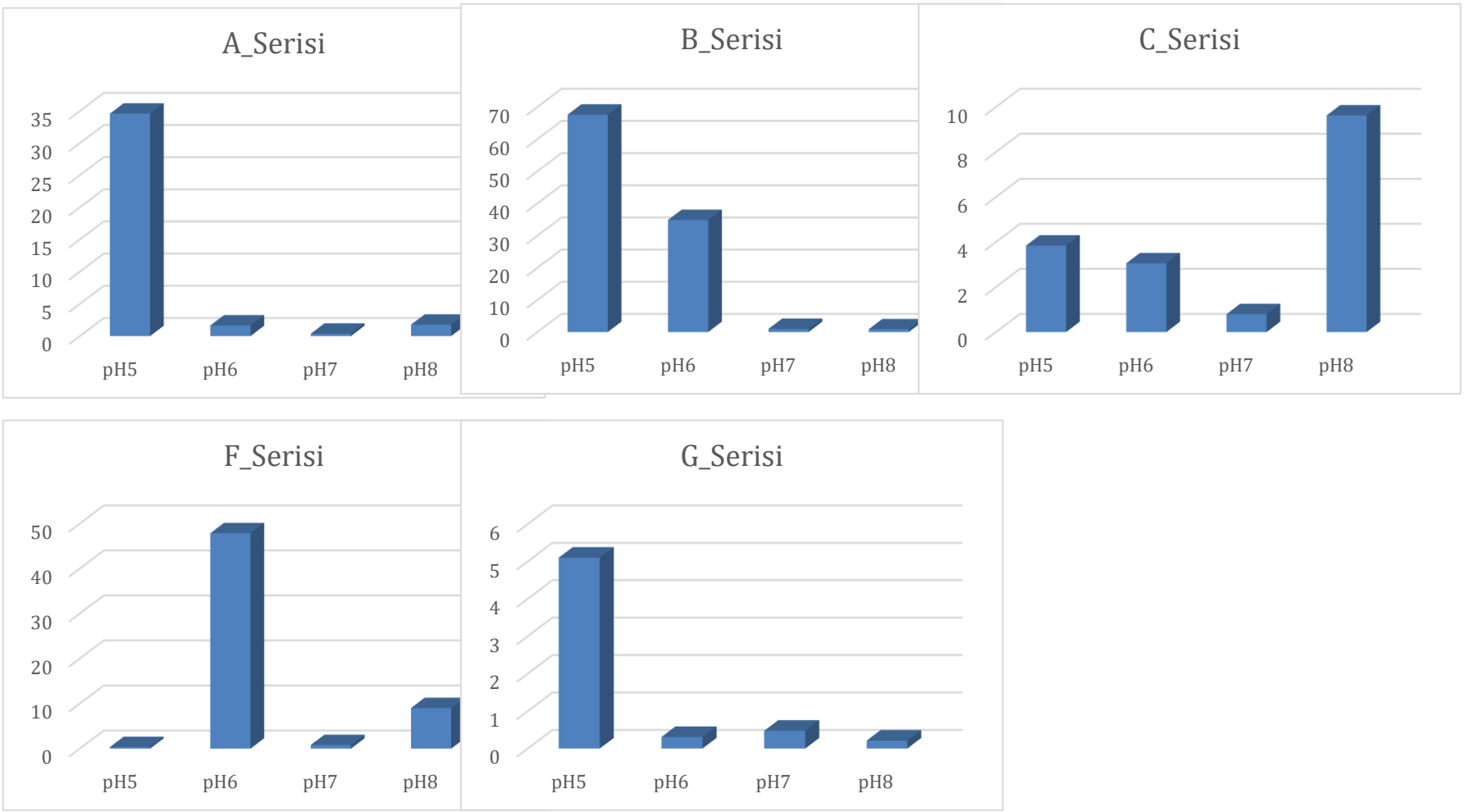
İskelelerin toplam yüzey alanı pH değerleri ile büyük oranda değiştiği gözlenmiştir. Aynı üretim yöntemi ve aynı fizikokimyasal şartlara maruz kalan örneklerde pH değerlerinin toplam yüzey alanında önemli değişikliklere neden olduğu görüldü. En yüksek yüzey alanı B Serisi pH 5 değerinde elde edilirken, en düşük yüzey alanı G serisi pH 8'de elde edilmiştir.

A serisinde pH 5 değerine sahip fibroin serideki diğer yapılara göre yaklaşık 15 kat daha fazla gözenekliliğe sahiptir. B serisinde artan pH ile birlikte yüzey alanının çok yüksek oranda azaldığı tespit edildi. C serisinde, nötr pH'ta en düşük değeri alan toplam yüzey alanının bazik pH'ta (8) en yüksek değerini aldığı görüldü. F serisinde, doğal fibroinin asitlik değeri olan pH6'da en yüksek yüzey alanın oluştuğu belirlendi. G serisinde ise asidik pH'ta (5) toplam yüzey alanının serideki diğer yapılardan yaklaşık 10 kat daha fazla olduğu test edildi.

Aynı pH değerine sahip örneklerin de benzer şekilde üretim şartlarından doğrudan etkilendiği ve toplam yüzey alanında önemli farklılıkların oluştuğu belirlendi. pH5'te vakum ortamında hazırlan iskelelerin (B serisi) en yüksek gözenekliliğe sahipken, doğal fibroinin asitlik değeri olan pH 6'da en yüksek yüzey alanı standart liyofilizasyon sonrası 180°C'ta etüvde bekletilmesi (F serisi) ile hazırlanan yapıda belirlendi. Nötr pH'ta toplam yüzey alanlarının birbirine yakın olduğu görülmekle birlikte en yüksek değer B serisinde elde edildi. Bazik pH 8'de en yüksek gözeneklilik C ve F serisinde tespit edildi. Bu değerlerin diğer üretim yöntemlerine göre yaklaşık 10 kat daha fazla yüzey alanı kazandırdığı belirlendi.



Şekil 6.33. Aynı pH değerine sahip farklı deney serilerindeki iskelelerin toplam yüzey alanı miktarlarının karşılaştırmalı grafikleri.



Şekil 6.34. Farklı deney serilerindeki iskelelerin pH'a bağlı olarak toplam yüzey alanı miktarlarının karşılaştırmalı grafikleri.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

İpek proteini olan fibroin/fibrin böcekler ve örümcekler tarafından üretilmektedir (Lehninger, 1970; edt. Elçin, 2013). Ancak yaygın olarak ipek böceği pupası tarafından üretilen kozadan elde edilmektedir (Pamuk, 2000). İpek kozasından elde edilen ipek iki tip proteinden oluşmaktadır. Bunlardan fibroin lifli yapıda olup ipeğin yapısını oluşturmakta, serisin ise bu yapıyı saran yapışkan özeliğe sahip bir proteindir. Ancak serisin genelde yapıda istenmediği için üretim sırasında yapıdan uzaklaştırılmaktadır (Magoshi, Magoshi, Becker ve Nakamura, 1996; Pamuk, 2000).

Fibroin antiparalel polipeptit zincirlerinden oluşmuş beta tabakalı yapısı glisince zengirdir ve Gly-Ser-Gly-Ala_Gly_Ala dizisinin tekrar ile oluşan zincirleri içermektedir. Zincirler mümkün olan en uzun boylarını aldığından ipek lifleri fazla uzamaz ve yüksek sağlamlığa sahiptir. Ancak, belirtilen amino asitlere ilave olarak yapıda az miktarda Tyr, Val, Arg ve Asp gibi büyük yan zincire sahip amino asitler de bulunmaktadır ve yapının yer yer kristal düzeninden sapmasına, dolayısıyla liflerin bir miktar uzayabilmesine neden olmaktadır. (Pamuk, 2000; Lehninger, 1970; edt. Elçin, 2013).

Fibroinin, çeşitli çapraz bağlayıcıların varlığında yâda ısıl prosesler kullanımıyla fiziksel ve mekaniksel özellikleri değiştirilebilmektedir (Rujiravanit vd., 2003; Mirahmadi vd., 2013; Ghezzi, Marelli, Donelli, Alessandrino, Freddi ve Nazhat, 2014; Yodmuang vd., 2015). Örneğin suda çözünebilirliği, dayanıklılığı ve gözenekli yapı oluşumu ısıl proseslerde değişiklik yapılarak yâda metil alkol, glutaraldehit gibi kimyasal ajanlar kullanılarak değiştirilebilmektedir (Wang, Partlow, Liu, Zheng, Su, Wang ve Kaplan, 2015). Tüm bu olumlu özellikleri ve doğal yapılı bir polimer oluşu ipek fibroinini, doku mühendisliğinde tercih edilebilir hale getirmiş ve gün geçtikçe kullanımı üzerine araştırmalar hız kazanmıştır.

Fibroin yapısında bulunan antiparalel zincirlerden ve peptit zincirindeki amino asit diziliminden dolayı amfoterik özellik göstermektedir. Fibroinin farklı sıcaklık ve basınç seviyelerine farklı sürelerde maruz bırakılması da yapısında bulunan protein komplekslerini farklı şekillerde etkilemektedir. Bu değişimler fibroinle elde edilen

doku iskelelerinin derişimlerini, gözeneklilik yapısını, mekanik mukavemetlerini, fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkilemektedir.

Yürütülen tez çalışmasında ipek fibroinin amfoterik yapısı dikkate alınarak farklı pH değerlerinde hazırlanan akuajenik çözeltileri kullanılarak farklı basınç ve sıcaklık şartlarında doku iskeleleri üretilmiş ve bu şartların elde edilen yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri ile biyouyumluluğuna olan etkileri FTIR, SEM, TGA, Civalı porozimetre ve MTT analizler ile incelenmiştir. Yapının morfolojileri ayrıca ışık mikroskobu ile biyobozunurluk süresi de in vitro koşullarda HANK's dengeli tuz çözeltisi içerisinde analiz edilmiştir.

7.1. Kullanılan Fizkokimyasal Şartların Fibroin İskelelerin Kimyasal Yapısı Üzerine Etkisi

7.1.1. Düşük Basınç ve Düşük Sıcaklık Şartlarının Fibroin İskelenin Yapısına Etkisi

A Grubu numunelerinde –OH- bölgesi, -C-H- bölgesi, Amid I, II, III ve parmak izi bölgelerine ait pikler gözlenmiştir. pH 5, 6, 7 ve 8'e sahip numunelerde ve diğer gruplardaki numunelerin parmak izi bölgeleri hariç diğer bölgeleri benzer pikler göstermiştir. Numune üzerinde yapılan pH denemelerinin her fibroin iskelesine farklı kimlik kazandırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca sahip olunan bölgelere ait piklerde oluşan alanların farklılığı da bu durumu desteklemektedir.

Fibroinin orijinal pH değeri 6'dır. pH 6'ya sahip olan numunelerde bölgelerdeki alan şiddetleri –OH- bölgesi: 15.746, -C-H- bölgesi: 13.768, Amid I bölgesi: 14.500, Amid II bölgesi: 6.755'tir. %37'lik HCl ile pH 6'dan 5'e düşürüldüğünde bu bölgelerdeki alan şiddetleri *azalarak* şu değerleri almıştır: –O-H- bölgesi: 9.643, Amid I bölgesi: 8.772, Amid II bölgesi: 9.740, Amid III bölgesi: 4.937.

1 N NaOH ile pH 6'dan pH7'ye yükseltildiğinde bu bölgelerdeki alan şiddetleri *artarak* şu değerleri almıştır: –OH- bölgesi: 18.700, Amid I bölgesi: 13.979, Amid II bölgesi: 16.221, Amid III bölgesi: 7.846.

1 N NaOH ile pH 6'dan pH 8'e yükseltildiğinde bu bölgelerdeki alan şiddetleri şu değerleri almıştır: –OH- bölgesi *azalarak:* 12.297, Amid I bölgesi *artarak:* 14.768, Amid II bölgesi *azalarak:* 13.506, Amid III bölgesi *azalarak:* 6.020. Fibroin çözeltisinde asidite arttırıldığında fibroin iskelenin FTIR grafiğinde izlenen alanların azaldığı, nötr değerdeyken arttığı, bazik derecesi arttırıldığında ise genel olarak azaldığı tespit edilmiştir.

7.1.2. Fizyolojik Sıcaklık ve Vakum Şartlarının Fibroin İskelenin Yapısına Etkisi

B Grubu numunelerinde –OH- bölgesi, Amid I, II, III ve parmak izi bölgelerine ait pikler gözlenmiştir. -C-H- bölgesinde pH-5 ve 6'da pik gözlenmemiş, pH-7 ve 8'de ise pik gözlenmiştir.

pH-5 ve 6 'ya sahip numunelerde ve diğer gruplardaki numunelerin parmak izi bölgeleri hariç diğer bölgeleri benzer pikler göstermiştir. Numune üzerinde yapılan pH denemelerinin her fibroin iskelesine farklı kimlik kazandırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca sahip olunan bölgelere ait piklerde oluşan alanların farklılığı da bu duruma destektir.

Fibroinin orijinal pH değeri 6'dır. pH 6'ya sahip olan numunelerde bölgelerdeki alan şiddetleri –OH- bölgesi: 6.060, Amid I bölgesi: 8.023, Amid II bölgesi: 6.523, Amid III bölgesi: 2.836'dır. 1N HCl ile pH 6'dan 5'e düşürüldüğünde bu bölgelerdeki alan şiddetleri *azalarak* –OH- bölgesi: 4.332, Amid I bölgesi: 5.384, Amid II bölgesi: 4.952, Amid III bölgesi: 2.170 değerleri aldığı belirlenmiştir. Bu durum pH değerinin azalması ile izoelektronik bölgeden asidik bölgeye sapma olması ve amin gruları üzerinde (+) yüklü polaritenin artması ile açıklanabilmektedir.

1 N NaOH ile pH 6'dan pH 7'ye yükseltildiğinde bu bölgelerdeki alan şiddetleri *artarak,* –OH- bölgesi: 8.261, Amid I bölgesi 8.212, Amid II bölgesi:9.480, Amid III bölgesi: 3.740 değerleri aldığı belirlenmiştir. İzoelektronik bölgeden bazik bölgeye geçişte karboksil grupları üzerinde (-) polaritenin artması sonucu bazik karakterle birlikte amid bağlarının güçlenmesini sağladığı ve zincirler arası yeni amid bağ oluşumlarına neden olduğu düşünülmektedir.

1 N NaOH ile pH 6'dan pH 8'e yükseltildiğinde bu bölgelerdeki alan şiddetleri şu değerleri almıştır: –OH- bölgesi *artarak*: 6.366, Amid I bölgesi *azalarak*: 6.835, Amid II bölgesi *azalarak*: 6.445, Amid III bölgesi *artarak*: 3.179. Fibroin çözeltisinde asidite arttırıldığında fibroin iskelenin FTIR grafiğinde izlenen alanların azaldığı, nötr değerdeyken arttığı, bazik derecesi arttırıldığında ise genel olarak azaldığı tespit edilmiştir.

İzoelektrik nokta dışındaki pH bölgelerinde peptit yapıları amfoter özellikte olup, tamponlama yeteneğine sahiptir. Bu nedenle izoelektrik nokta olan pH 6 dışındaki asidik ve bazik bölgelerde net bir polaritenin varlığı zincirler arası elektrastatik etkileşimi artırmakta ve vakum etkisiyle de zincirlerin birbirine daha fazla yaklaşması sağlanmıştır. Bu şartlar altında zincirler arası çapraz bağlanmalar desteklenmekte olup, FTIR sonuçları da bunu doğrulamaktadır. Bu nedenle, herhangi bir kimyasal çapraz bağlayıcı kullanılmadığı halde, sıcaklık, pH, vakum uygulanan fizikokimyasal şartlar altında oluşan moleküller arası çapraz bağlanmalar iskele yapıların stabilitesini artmış ve biyoboznurluk hızları azalmıştır.

pH'ın izoelektrik noktadan sapması iç tuz yapısını bozarak peptit zincirlerinde polaritenin artması sağmıştır. Vakum etkisi ise ortamdaki havayı boşaltarak olası reaksiyonu bozucu maddeleri (nem, O_2, vb.) ortamdan uzaklaştırdığı gibi zincirlerin birbirine yaklaşmasını teşvik etmiştir. Sıcaklığın artması ise zincirler arası çapraz bağlanmalar için gerekli olan aktivasyon enerjisinin aşılmasını sağlamıştır. Bu şartlar altında zincirler üzerindeki fonksiyonel gruplar (-OH, NH3, COO, SH) birbirleri ile etkileşime girerek moleküller arası kuvvetli bağlanmalar gerçeleşmiştir.

7.1.3. Düşük Basınç ve Sıcaklıkta Hazırlanan Fibroin İskelenin Kuru Halde Otoklav (121°C-Yüksek Buhar Basıncı) Muamelesinin Yapı Üzerine Etkisi

C Grubu numunelerinde –OH- bölgesi, -C-H- bölgesi, -C≡N- bölgesi, Amid I, II, III ve parmak izi bölgelerine ait pikler gözlenmiştir. pH 5, 6, 7 ve 8'e sahip numunelerde ve diğer gruplardaki numunelerin parmak izi bölgeleri hariç diğer bölgeleri benzer pikler göstermiştir. Numune üzerinde yapılan pH denemelerinin her fibroin

iskelesine farklı kimlik kazandırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca sahip olunan bölgelere ait piklerde oluşan alanların farklılığı da bu duruma destektir.

pH 6'ya sahip olan numunelerde bölgelerdeki alan şiddetleri –OH- bölgesi: 12.158, Amid I bölgesi: 10.611, Amid II bölgesi: 10.966, Amid III bölgesi: 5.128'dır. %37'lik HCl ile pH 6'dan 5'e düşürüldüğünde bu bölgelerdeki alan şiddetleri şu değerleri almıştır: –OH- bölgesi: 12.557, Amid I bölgesi: 9.686, Amid II bölgesi: 10.034, Amid III bölgesi: 5.286. bu geçişte –OH- , Amid III bölgesi alan değerleri artmış, Amid I ve Amid II bölgesi alan değerleri azalmıştır.

1 N NaOH ile pH 6'dan pH 7'ye yükseltildiğinde bu bölgelerdeki alan şiddetleri şu değerleri almıştır: –OH- bölgesi: 10.199, Amid I bölgesi 12.623, Amid II bölgesi: 10.815, Amid III bölgesi: 4.765. Amid I bölgesi alan değeri *artmış*, diğer bölgelerdeki alan değerleri ise *azalmıştır*.

1 N NaOH ile pH 6'dan pH 8'e yükseltildiğinde bu bölgelerdeki alan şiddetleri *artarak* şu değerleri almıştır: –OH- bölgesi 17.723, Amid I bölgesi: 13.739, Amid II bölgesi: 13.833, Amid III bölgesi: 6.948. Fibroin çözeltisinde asidite arttırıldığında fibroin iskelenin FTIR grafiğinde izlenen alanların genel olarak azaldığı, nötr değerdeyken azaldığı, bazik derecesi arttırıldığında ise arttığı tespit edilmiştir.

7.1.4. Düşük Basınç ve Sıcaklıkta Hazırlanan Fibroin İskelenin Kuru Halde Etüv Sterilizatör (180°C) Muamelesinin Yapı Üzerine Etkisi

F Grubu numunelerinde –OH- bölgesi, -C-H- bölgesi, Amid I, II, III ve parmak izi bölgelerine ait pikler gözlenmiştir. -C≡N- bölgesinde ise pH 5 ve 6'da pikler izlenmiş, pH 6 ve 7'de ise izlenmemiştir. Ancak genel olarak pH 5, 6, 7 ve 8'e sahip numunelerde ve diğer gruplardaki numunelerin parmak izi bölgeleri hariç diğer bölgeleri benzer pikler göstermiştir. Numune üzerinde yapılan pH denemelerinin her fibroin iskelesine farklı kimlik kazandırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca sahip olunan bölgelere ait piklerde oluşan alanların farklılığı da bu duruma destektir.

pH 6'ya sahip olan numunelerde bölgelerdeki alan şiddetleri –OH- bölgesi: 8.067, Amid I bölgesi: 14.578, Amid II bölgesi: 10.783, Amid III bölgesi: 4.363'dür.

%37'lik HCl ile pH 6'dan 5'e düşürüldüğünde bu bölgelerdeki alan şiddetleri *artarak* şu değerleri almıştır: –OH- bölgesi: 16.215, Amid I bölgesi: 14.752, Amid II bölgesi: 13.692, Amid III bölgesi: 6.588.

1 N NaOH ile pH 6'dan pH 7'ye yükseltildiğinde bu bölgelerdeki alan şiddetleri *azalarak* şu değerleri almıştır: –OH- bölgesi: 7.126, Amid I bölgesi 7.515, Amid II bölgesi: 7.104, Amid III bölgesi: 3.993.

1 N NaOH ile pH 6'dan pH 8'e yükseltildiğinde bu bölgelerdeki alan şiddetleri *azalarak* şu değerleri almıştır: –OH- bölgesi 7.236, Amid I bölgesi: 8.774, Amid II bölgesi: 8.643, Amid III bölgesi: 3.497.

Fibroin çözeltisinde asidite arttırıldığında fibroin iskelenin FTIR grafiğinde izlenen alan değerlerinin arttığı, nötr değerdeyken ve bazik derecesi arttırıldığında ise azaldığı tespit edilmiştir.

7.1.5. Fibroin Çözeltisinin Otoklav (121°C-Yüksek Buhar Basıncı) Muamelesi Sonrası Standart Liyoflizasyon (-55°C-Vakum) ile Hazırlanan Fibroin İskelelerin Yapısal Özellikleri

G Grubu numunelerinde –OH- bölgesi, -C-H- bölgesi, Amid I, II, III ve parmak izi bölgelerine ait pikler gözlenmiştir. Ancak genel olarak pH 5, 6, 7 ve 8'e sahip numunelerde ve diğer gruplardaki numunelerin parmak izi bölgeleri hariç diğer bölgeleri benzer pikler göstermiştir. Numune üzerinde yapılan pH denemelerinin her fibroin iskelesine farklı kimlik kazandırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca sahip olunan bölgelere ait piklerde oluşan alanların farklılığı da bu duruma destektir.

pH 6'ya sahip olan numunelerde bölgelerdeki alan şiddetleri –OH- bölgesi: 7.617, Amid I bölgesi: 7.704, Amid II bölgesi: 7.361, Amid III bölgesi: 3.699'dur. %37'lik HCl ile pH 6'dan 5'e düşürüldüğünde bu bölgelerdeki alan şiddetleri *azalarak* şu değerleri almıştır: –OH- bölgesi: 5.847, Amid I bölgesi: 7.087, Amid II bölgesi: 7.489, Amid III bölgesi: 3.086.

1 N NaOH ile pH 6'dan pH 7'ye yükseltildiğinde bu bölgelerdeki alan şiddetleri *artarak* şu değerleri almıştır: –OH- bölgesi: 16.460, Amid I bölgesi 12.546, Amid II bölgesi: 15.451, Amid III bölgesi: 7.349.

1 N NaOH ile pH 6'dan pH 8'e yükseltildiğinde bu bölgelerdeki alan şiddetleri *artarak* şu değerleri almıştır: –OH- bölgesi 17.185, Amid I bölgesi: 23.106, Amid II bölgesi: 15.937, Amid III bölgesi: 7.168.

Fibroin çözeltisinde asidite arttırıldığında fibroin iskelenin FTIR grafiğinde izlenen alan değerlerinin azaldığı, nötr değerdeyken ve bazik derecesi arttırıldığında ise arttığı tespit edilmiştir.

7.2. pH Değişimlerinin Fibroin İskelelerin Kimyasal Yapısı Üzerine Etkisi

7.2.1. pH 5 Değerine Sahip İskelelerin Fonksiyonel Analizleri

Fibroin iskeleler incelendiğinde –OH- bölgesinde görülen piklerin oldukça benzer seviyelerde olduğu ve alan değerlerinin her grupta farklı, F grubunda en yüksek, B grubunda en düşük olduğu görüldü. A grubundaki numunenin –C-H- bölgesinde tek pik verdiği, B grubundaki numunenin pik vermediği, C grubundaki numunenin A, F ve G grubundaki numuneye göre daha şiddetli pik verdiği, F ve G grubu numunelerinin benzer şiddetlerde çift pik verdiği gözlenmiştir. -C≡N- bölgesinde A, B ve G grubu pH 5 numunelerinin pik vermediği, C ve F grubu numunelerinin pik verdiği ve F grubundaki numunenin C'ye göre daha yüksek şiddette olduğu görülmüştür.

Amid I bölgesinde A,F ve G grupları ile B ve C gruplarındaki numunelerin benzer şiddette pikler verdiği, alan değerlerinin yine farklı ve en yüksek değerin F grubunda, en düşük değerin B grubunda olduğu tespit edildi. Amid II bölgesinde A ve G ile B, C ve F gruplarının benzer şiddetlerde pikler verdiği, en yüksek alan değerinin F grubunda, en düşük alan değerinin ise B grubunda bulunduğu gözlemlenmiştir. Amid III bölgesinde B ve C ile A, F ve G gruplarının benzer pikler gösterdiği, en yüksek alan değerinin F grubunda, en düşük alan değerinin B grubunda olduğu görülmüştür. Parmak izi bölgeleri ise her grup üzerinde farklı pikler vermiştir.

7.2.2. pH 6 Değerine Sahip İskelelerin Fonksiyonel Analizleri

Fibroin iskeleler incelendiğinde –OH- bölgesinde görülen piklerin oldukça benzer seviyelerde olduğu ve alan değerlerinin her grupta farklı, A grubunda en yüksek, B grubunda en düşük olduğu görüldü. –C-H- bölgesinde B grubundaki numunenin pik vermediği, A, C, F ve G grubundaki numunelerin çift pik verdiği izlendi.

-C≡N- bölgesinde A, B ve G grubu pH 6 numunelerinin pik vermediği, C ve F grubu numunelerinin pik verdiği ve F grubundaki numunenin C'ye göre daha yüksek şiddette olduğu görülmüştür.

Amid I bölgesinde A, F ve G gruplarındaki numunelerin benzer şiddete pikler verdiği diğer gruplara göre daha yüksek derecede olduğu, B ve C grubundaki numunelerin de benzer şiddette olduğu, alan değerlerinin F grubunda en yüksek, G grubunda ise en düşük olduğu gözlemlenmiştir. Amid II bölgesinde A, B, F ve G grubundaki numunelerin benzer şiddette pikler verdiği, C grubundaki numunenin ise diğerlerinden daha düşük şiddette pik verdiği, bu bölgedeki alan değerlerinin ise A grubunda en yüksek, B grubunda en düşük olduğu gözlemlenmiştir. Amid III bölgesinde A ve G grupları ile B ve C gruplarının benzer şiddetlerde, F grubundaki numunenin ise farklı ve en yüksek şiddette pik verdiği, bu bölgedeki alan değerlerinde ise en yüksek değerin A grubunda, en düşük değerin B grubunda olduğu görüldü. Parmak izi bölgeleri ise her grup üzerinde farklı pikler vermiştir.

7.2.3. pH 7 Değerine Sahip İskelelerin Fonksiyonel Analizleri

Fibroin iskeleler incelendiğinde –OH- bölgesinde görülen piklerin oldukça benzer seviyelerde olduğu ve alan değerlerinin her grupta farklı, A grubunda en yüksek, F grubunda en düşük olduğu görüldü. –C-H- bölgesinde A ve B gruplarının benzer ve çift pik, diğer grupların farklı ve yine çift pik verdiği ve en düşük pikin C grubunda olduğu, -C≡N- bölgesinde ise sadece C grubundaki numunenin pik verdiği görüldü.

Amid I bölgesinde her grupda farklı piklerin olduğu, en yüksek pik şiddetinin A grubunda, en düşük pik şiddetinin ise C grubunda olduğu, bu bölgedeki alan değerlerinin en yüksek değerinin yine A grubunda, en düşük değerin ise F grubunda

olduğu gözlemlendi. Amid II bölgesinde tüm gruplardaki numuneler benzer şiddette pikler vermişlerdir. Bu bölgedeki alan değerleri ise en yüksek A grubunda, en düşük F grubundadır. Amid III bölgesinde A ve G grubu ile B ve C grubunun benzer pikler, F grubunun ise en yüksek ve farklı pik verdiği görüldü. Bu bölgedeki en yüksek alan değeri A grubuna, en düşük alan değeri de F grubuna aittir. Parmak izi bölgeleri ise her grup üzerinde farklı pikler vermiştir.

7.2.4. pH 8 Değerine Sahip İskelelerin Fonksiyonel Analizleri

Fibroin iskeleler incelendiğinde –OH- bölgesinde görülen piklerin oldukça benzer seviyelerde olduğu ve alan değerlerinin her grupta farklı, C grubunda en yüksek, B grubunda en düşük olduğu görüldü. –C-H- bölgesinde A ve B gruplarında benzer şiddette, diğer gruplarda farklı ve C grubunda en yüksek, F grubunda en düşük pikleri vermiştir. -C≡N- bölgesinde bu pH'da hiçbir grupta pik görülmemiştir.

Amid I bölgesinde A ve G ile B ve C grubunda benzer şiddette pikler görüldü. Bu bölgede oluşan alanlarda en yüksek değeri G grubu, en düşük değeri ise B grubu vermiştir. Amid II bölgesinde tüm gruplar benzer şiddette piklere sahiptir. Bu bölgede en yüksek alan değerini G grubu numunesi, en düşük değeri ise yine B grubu göstermiştir. Amid III bölgesinde B ve C grubunun benzer ve diğer gruplara göre daha yüksek şiddetli piklere sahip olduğu, A, F ve G gruplarındaki numuneler de benzer pikler verdiği görülmüştür. Bu bölgede G grubu en yüksek, B grubu en düşük alan değerine sahiptir. Parmak izi bölgeleri ise her grup üzerinde farklı pikler vermiştir.

7.3. Üretim Yöntemlerinin Fibroin İskelelerin Morfolojik Yapısı Üzerine Etkisi

Üretim yöntemlerinin fibroinin primer yapısını değiştirmediği termogravimetrik analiz ve bozunurluk süresi tayini ile anlaşılmakatadır. Çalışma şartlarının yapıların morfolojilerini önemli ölçüde etkilediği SEM görüntülemesi ile anlaşılmıştır. Yapı morfolojilerinin hem pH hem de çalışma şartlarından etkilenerek tabakalı, mikro-mezo poröz ve lifli yapılar içerecek şekilde değişim gösterdiği anlaşılmıştır. Bu değişimler içerisinde molekül içi çapraz balanmaları da içermektektedir ve iskelelerin bozunurluk özelliğini doğrudan etkilediği tespit edilmiştir.

Şöyleki B serisi asidik pH değerinde C serisi ise nötral ve bazik pH değerlerinde gruplar içerisinde en yüksek yüzey alanına ulaşmıştır. Yüzey alanının yüksek olması sulu ortam ile temas yüzeyini artırmaktadır. Ancak buna karşın bozunma beklenenin aksine daha yavaş gerçekleşmiştir. Bu durum molekül içi çapraz bağlanmalar ile açıklanabilmektedir.

Bozunma sürelerinin pH değerlerinden genelde bağımsız olarak çalışma şartları ile değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Böylece doku iskeleleri hazırlanırken çözelti pH'ına bağlı olmaksızın basınç, sıcaklık gibi değişkenlerin molekül içi bağlanmaları doğrudan etkilediği ancak yüzey alanındaki değişimin hem pH hem de çalışma koşullarından doğrudan etkilendiği söylenebilmektedir.

7.4. pH Değişimlerinin Fibroin İskelelerin Morfolojik Yapısı Üzerine Etkisi

7.4.1. pH 5 Değerine Sahip İskelelerin Morfolojik Analizleri

Yapısal bütünlük ve düzensiz yerleşim genel olarak tüm gruplardaki pH 5 numuneleri için aynıdır. Her numune grubunda yine beta sheet yapıları yani levhalı yapılar mevcuttur ancak boyutları ve bulunma oranları farklıdır. pH 5 numunelerinde en çok beta katmanları C, F ve G gruplarında görüldü. A ve B gruplarında daha az ve düzlemsel katmanlar bulundu. Açık gözeneklilik yapıları ise A ve B grubu numunelerinde daha fazla; C, F ve G gruplarında onlara göre daha az miktarlarda olduğu gözlendi. Mikro ve makro porozite kıyaslamasında ise; birbirlerine bağlı makro gözeneklilik B grubunda, liflerin bağlanma noktalarıyla kendi kendine oluşan büyük gözeneklilik ise en çok F ve G gruplarında izlendi. Birbirleriyle eş değerde gözeneklere sahip numuneler en çok A grubunda, ardından B grubundadır. Yapıda gözlenen beta tabakalarda oluşan kısa ve ince uzantılar ise A ve B gruplarında bulunmayıp, C, F ve G'de bulunmaktadır. En yaygın şekilde C ve F'dedir.

Genel olarak bu pH'a sahip numunelerde diğer pH'lara sahip numunelere göre gözenekli yapı kısmen daha fazla, beta tabakalar daha az miktarlarda ve boyutları daha küçüktür.

7.4.2. pH 6 Değerine Sahip İskelelerin Morfolojik Analizleri

Yapısal bütünlük ve düzensiz yerleşim genel olarak tüm gruplardaki pH 6 numuneleri için aynıdır ve genel hatlarıyla bu numunelerin özellikleri beta katman oranlarını daha fazla olması dışında pH 5'e benzerdir. Her numune grubunda yine beta sheet yapıları yani levhalı yapılar mevcuttur ancak boyutları ve bulunma oranları farklıdır.

pH 6 numunelerinde en çok beta katmanları C, F ve G gruplarında görüldü. A ve B gruplarında daha az ve düzlemsel katmanlar bulundu. Açık gözeneklilik yapıları ise A ve B grubu numunelerinde daha fazla; C, F ve G gruplarında onlara göre daha az miktarlarda olduğu gözlendi. Mikro ve makro porozite kıyaslamasında ise; birbirlerine bağlı makro gözeneklilik B grubunda, liflerin bağlanma noktalarıyla kendi kendine oluşan büyük gözeneklilik ise en çok F ve G gruplarında izlendi. Birbirleriyle eş değerde gözeneklere sahip numuneler en çok A grubunda, ardından B grubundadır. Yapıda gözlenen beta tabakalarda oluşan kısa ve ince uzantılar ise A ve B gruplarında bulunmayıp, C, F ve G'de bulunmaktadır.

Genel olarak bu pH'a sahip numunelerde pH 5'e göre daha fazla ve daha büyük beta tabakalar mevcuttur. pH 7 ve 8'den ise daha az ve küçüktür. Açık gözeneklilik oranı ise yine pH 5'e göre yakın seviyede, 7 ve 8'den de daha fazladır.

7.4.3. pH 7 Değerine Sahip İskelelerin Morfolojik Analizleri

Yapısal bütünlük ve düzensiz yerleşim genel olarak tüm gruplardaki pH 7 numuneleri için aynıdır ve genel hatlarıyla bu numunelerin özellikleri beta katman oranlarını daha az olması dışında pH 8'e benzerdir. Her numune grubunda yine beta sheet yapıları yani levhalı yapılar mevcuttur ancak boyutları ve bulunma oranları farklıdır. pH 7 numunelerinde en çok beta katmanları sırasıyla G, F ve C gruplarında görüldü. A ve B gruplarında daha az ve düzlemsel katmanlar bulundu. Düzlem üzerinde açık gözeneklilik yapıları ise A ve B grubu numunelerinde daha fazla; C, F ve G gruplarında onlara göre daha az miktarlarda olduğu gözlendi. C, F ve G numunelerinde oluşan beta katmanlar üzerinde düzensiz ve mikro gözeneklerin meydana geldiği görüldü. Bu gözenekler pH 5 ve 6'da çok azdır.

Mikro ve makro porozite kıyaslamasında ise; birbirlerine bağlı makro gözeneklilik B grubunda, liflerin bağlanma noktalarıyla kendi kendine oluşan büyük gözeneklilik ise en çok F ve G gruplarında izlendi. Birbirleriyle eş değerde gözeneklere sahip numuneler en çok A grubunda, ardından B grubundadır. Yapıda gözlenen beta tabakalarda oluşan kısa ve ince uzantılar ise B gruplarında çok az oranda, A grubunda B'den daha fazla olmakla birlikte C, F ve G'de A ve B'den daha fazla bulunmaktadır. Bu uzantılar en çok C ve F grubundadır.

Genel olarak bu pH 7'ye sahip numunelerde pH 6'ya göre daha fazla ve daha büyük beta tabakalar mevcuttur. pH 8'den ise daha az ve küçüktür. Açık gözeneklilik oranı ise yine pH 8'e göre yakın seviyede, pH 5 ve 6'dan daha azdır.

7.4.4. pH 8 Değerine Sahip İskelelerin Morfolojik Analizleri

Yapısal bütünlük ve düzensiz yerleşim genel olarak tüm gruplardaki pH 8 numuneleri için aynıdır ve genel hatlarıyla bu numunelerin özellikleri beta katman oranlarını daha fazla olması dışında pH 7'ye benzerdir. Her numune grubunda yine beta sheet yapıları yani levhalı yapılar mevcuttur ancak boyutları ve bulunma oranları farklıdır. pH 8 numunelerinde en çok beta katmanları sırasıyla G, F ve C gruplarında görüldü. A ve B gruplarında daha az ve düzlemsel katmanlar bulundu. Düzlem üzerinde açık gözeneklilik yapıları ise A ve B grubu numunelerinde daha fazla; C, F ve G gruplarında onlara göre daha az miktarlarda olduğu gözlendi.

C, F ve G numunelerinde oluşan beta katmanlar üzerinde düzensiz ve mikro gözeneklerin meydana geldiği görüldü. Bu gözenekler pH 5 ve 6'da çok azdır. Mikro ve makro porozite kıyaslamasında ise; birbirlerine bağlı makro gözeneklilik B grubunda, liflerin bağlanma noktalarıyla kendi kendine oluşan büyük gözeneklilik ise en çok F ve G gruplarında izlendi. Birbirleriyle eş değerde gözeneklere sahip numuneler en çok A grubunda, ardından B grubundadır. Yapıda gözlenen beta tabakalarda oluşan kısa ve ince uzantılar ise B gruplarında çok az oranda, A grubunda B'den daha fazla olmakla birlikte C, F ve G'de A ve B'den daha fazla bulunmaktadır. Bu uzantılar en çok C ve F grubundadır.

Genel olarak bu pH 8'e sahip numunelerde pH 5, 6 ve 7'ye göre daha fazla ve daha büyük beta tabakalar mevcuttur. Açık gözeneklilik oranı ise yine pH 7'ye göre yakın seviyede, pH 5 ve 6'dan daha azdır.

7.5. Genel Değerlendirme

Standart pH seviyesi 6 olarak ölçülen fibroinin pH değeri düşürüldüğünde (asiditenin arttırılması) veya yükseltildiğinde (asiditenin azaltılması) yapısında bulunan Amid gruplarında, parmak izi bölgelerinde tüm gruplar için gerilme şiddetlerinde değişimlere sebep olduğu görüldü. Özellikle pH 5, 6 ve 7'de C ve F grupları için diğer gruplardan farklı olarak -C≡C- bölgesinde gerilmeler meydana gelmiştir.

Ayrıca yapılan A, B, C, D ve F grupları arasında yapılan karşılaştırmalar ile fibroin iskelelerin maruz kaldıkları işlem farklılıklarının da bu gerilme şiddeti değişimlerine etkisi olduğu tespit edildi.

pH değişimlerinin ve fibroin iskelelerin maruz kaldıkları işlem farklılıklarının özellikle parmak izi bölgelerinde farklı şiddetlerde verdiği pikler, her numunenin farklı karakterlere sahip olduklarını gösterdi. pH değişimleri ve işlem farklılıklarının FTIR grafiklerinde incelenen beta-tabakalı yapıların bulunduğu yerleri ve pik şiddetlerini de etkilediği görüldü. Bu durum tabakalı yapılarda bozulmalar olduğunu göstermektedir. Fibroinin standart pH değeri olan 6'ya göre pH 5, 7 ve 8 pH'a sahip numunelerin alan değerleri karşılaştırıldığında bu bozulmaların oranları belirlendi. Beta-tabakalı yapılarda pH değişimi ve deney şartlarına göre meydana gelen bozulmaların oranları Tablo 7.1'de verilmiştir.

Tablo 7.1. *Beta-tabakalı yapılarda pH değişimi ve deney şartlarına göre meydana gelen bozulmaların oranları*

pH Değişimi/Deney Grubu	**pH 5**	**pH 7**	**pH 8**
A Grubu	-OH- bölgesi: %38,75 azalma -Amid I: %36,28 azalma -Amid II: %32,82 azalma -Amid III: %26,9 azalma	-OH- bölgesi: %18,76 artma -Amid I: % 1,53 artma -Amid II: %11,86 artma -Amid III: %16,15 artma	-OH- bölgesi: %21,90 azalma -Amid I: %7,26 artma -Amid II: %6,85 azalma -Amid III: %10,88 azalma
B Grubu	-OH- bölgesi: %28,51 azalma -Amid I: %32,89 azalma -Amid II: %24,08 azalma -Amid III: %23,48 azalma	- OH- bölgesi: %36,32 artma -Amid I: % 2,35 artma -Amid II: %45,33 artma -Amid III: %31, 87 artma	-OH- bölgesi: %5,04 artma -Amid I: %14,80 azalma -Amid II: %1,19 azalma -Amid III: %12,09 artma
C Grubu	-OH- bölgesi: %3,28 artma -Amid I: %8,71 azalma -Amid II: %8,49 artma -Amid III: %3,08 artma	-OH- bölgesi: %16,11 azalma -Amid I: %18,96 artma -Amid II: %1,37 azalma -Amid III: %7,07 azalma	-OH- bölgesi: %45,77 artma -Amid I: %29,47 artma -Amid II: %26,14 artma -Amid III: %35,49 artma
F Grubu	-OH- bölgesi: %101,00 artma -Amid I: %1,19 artma -Amid II: %26,97 artma -Amid III: %50,99 artma	-OH- bölgesi: %11,66 azalma -Amid I: %66,77 azalma -Amid II: %34, 11azalma -Amid III: %8,48 azalma	-OH- bölgesi: %10,30 azalma -Amid I: %39,81 azalma -Amid II: %19,84 azalma -Amid III: %19,84 azalma
G Grubu	-OH- bölgesi: %23,23 azalma -Amid I: %8,00 azalma -Amid II: %1,738 artma -Amid III: %16,57 azalma	-OH- bölgesi: %116,09 artma -Amid I: %62,85 artma -Amid II: %109,90 artma -Amid III: %98,67 artma	-OH- bölgesi: %125,61 artma -Amid I: %199,92 artma -Amid II: %116,50 artma -Amid III: %93,78 artma

Tablo 7.1'de görüldüğü üzere A, B ve G grupları pH 5'te yani asidite arttırıldığında fonksiyonel grup değerlerinde özellikle beta tabakaların bulunduğu Amid bölgelerinde azalma, C ve F gruplarında ise artma olduğu yüzdelik hesaplamalar ile belirlendi. pH 7'de(nötr) A, B ve G gruplarında asidite düşürüldüğünde fonksiyonel grup bölge değerlerinde beta tabakaların bulunduğu bölgelerde özellikle G grubunda büyük oranlarda artış, C ve F gruplarında ise azalma olduğu görüldü. pH 8'de yani

asidite daha fazla düşürüldüğünde A, B ve F gruplarında özellikle beta tabakalı yapıların bulunduğu bölgelerde azalma, C ve G gruplarında ise artma tespit edildi.

Vakum altında ve porojen arındırma yöntemi ile üretilen B grubu iskelelerinin diğer gruplara göre fonksiyonel gruplarda oluşan pik şiddetlerinde genel olarak en düşük değerlere sahip olduğu; tam vakum (%100)'un ve fizyolojik sıcaklık değeri olan 37°C çalışma sıcaklığının bu duruma sebep olabileceği düşünüldü. Vakum ortamında spesifik çapraz bağlanmaların olduğu FTIR grafiklerinde tesbit edildi. Pikler genel olarak parmak izi bölgesinde meydana gelmiştir. Bu pik değerleri 975,98 cm^{-1}, 801,20 cm^{-1}, 800,68 cm^{-1}, 672,21 cm^{-1}, 601,95 cm^{-1}, 532,15 cm^{-1}, 475,80 cm^{-1}, 454,82 cm^{-1}, 436,61 cm^{-1}, 426,17 cm^{-1}'dir. B grubunda ayrıca Amid I bölgesinde 1620 cm^{-1} civarında pik şiddeti görülmesi diğer gruplara göre beta tabakalarında büyük oranda değişim meydana geldiğini göstermektedir.

Standart liyofilizasyon işlemi ile elde edilen A grubu numunelerinin diğer gruplara göre fonksiyonel gruplarda oluşan pik şiddetlerinde genel olarak en yüksek değerlere sahip olduğu; -20°C, -80°C ve -55 °C'deki çalışma sıcaklıklarının ve basıncın bu duruma neden olabileceği düşünüldüğü gibi yapıda çapraz bağlanmaların gerçekleşmemiş olmasının da bu sonucu etilediği söylenebilir. Aynı pH'lara sahip numunelerde C ve F grupları dışında genel olarak parmak izi bölgeleri, amid grupları hariç diğer bölgeler de benzer gerilme şiddetleri gösterdi.

A, B, C, F ve G grupları içinde sadece C ve F gruplarının sahip olduğu bir gerilme şiddeti izlendi. Bu gerilme şiddeti -C≡N- bölgesinde pH 5, 6 ve 7'de görüldü. C grubu (Standart Liyofilizasyondan Sonra Kuru Haldeki İskelelerin Otoklavlanması) ve F grubu (Standart Liyofilizasyondan Sonra Kuru Haldeki İskelelerin Etüvlenmesi) numunelerinin ortak noktaları diğer gruplardaki işlemlerin sahip olduğu sıcaklıklardan oldukça yüksek olmasıdır. C grubu 121 °C'de, F grubu ise 180°C'de işlem görmüştür. Bu sıcaklığın bu gruplardaki numunelerin kimysal dönüşüme uğrayarak FTIR grafiklerinde -C≡N- gerilme şiddetleri görülmesine sebep olmuştur.

B ve C gruplarındaki Amid I bölgelerindeki gerilme şiddetlerinin diğer gruplardan düşük; Amid III bölgelerindeki gerilme şiddetlerinin ise diğer gruplardan yüksek

piklerde ve farklı değerde olduğu izlendi. Bu durumun sebebinin gruplarda yapılan yüksek basınçlı muameleden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Literatürde yapılan taramalar sonucunda bu çalışmadaki fizikokimyasal şartların uygulamadaki eşleşmelerinin oluşan yapı üzerine etkisini açıklayan benzer şekilde yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Ancak sterilizasyon işlemlerinin fibroin iskeleler üzerine etkilerini araştıran makalelerde sıcaklıkla muamele edilen numuneler ile farklı makalelerde farklı şekillerde elde edilen fibroin iskelelerin FTIR sonuçları incelenerek karşılaştırmaları yapılabilmiştir.

Yaowalak Srisuwan ve ark. (2009), fibroin çözeltisinden buharlaştırma yöntemiyle elde ettikleri mikrokürelerin FTIR analizinde Amid I'de 1654 cm^{-1} ve Amid II'de 1560 cm^{-1} gerilme şiddetleri görülmüştür. Burada görülen gerilme şiddetleri yürütülen tez çalışmasında görülen Amid I ve II değerlerinden daha yüksek frekansta elde edilmiştir.

Sourabh Ghosh ve ark. (2013), işlenmemiş ipek fibroin numunesi için, sırasıyla Amid I, II ve III için 1660, 1540 ve 1240 cm^{-1} deki gerilme bantları izlemiştir. İşlem gören numunelerde bu bantların kayması beklenmektedir. Şöyleki tez çalışması kapsamında ölçülen değerler 1638, 1513 ve 1230 cm^{-1} da elde edilmiştir. Üstelik bu değerlerin uygulanan yöntemlere göre de kayma gösterdiği belirlendi..

Araştırmada tüm numuneler için genel olarak Amid I, II ve III için gerilme şiddetleri benzerdir. 1700-1600 cm^{-1} arasında Amid I, 1600-1500 cm^{-1} arasında Amid II, 1300-1100 cm^{-1} arasında Amid III piklerinin olduğunu belirtmişlerdir. Tez çalışmasında elde edilen Amid gruplarına ait gerilme şiddetleri de benzer olarak bu aralıklarda bulunmaktadır.

Natalia Jaramillo-Quiceno ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada 22 °C'de 22 saat boyunca çevre çemberinde buharlaştırma işlemi yapılarak elde edilen ipek fibroin iskele ile elde ettikleri iskelenin FTIR grafiğinde Amid I, II ve III ile ilgili benzer gerilme şiddetleri elde ettikleri görüldü.

Rina Nazarov ve ark. (2004), *Porous 3-D Scaffolds from Regenerated Silk Fibroin* adlı çalışmalarında porojen arındırma yöntemi ile hazırladıkları fibroin iskelenin SEM görüntüleri incelendiğinde, B grubundaki pH 5 ve 6'daki fibroin iskelelerin gözenek yapılarına benzer şekilde olduğu görüldü. Muadil çalışmada pH değişimi bulunmamaktadır.

Sandra Hofmann ve ark. (2014), *Effect Of Sterilization On Structural And Material Properties Of 3D Silk Fibroin Scaffolds* adlı çalışmalarında liyofilizasyon, otoklav ve etüvleme işlemlerini içeren fibroin iskele hazırlama prosedürleri bulunmaktadır. Burada hazırlanan liyofilizasyon işlemi A grubuna, otoklavlama işlemi C grubuna, Etüvleme işlemi ise F grubuna yapılan işlemlere benzemektedir. Ancak pH değişimi bulunmamaktadır. Bu çalışmada elde edilen fibroin iskelelerin SEM görüntüleri yine tez çalışmasında bu gruplarda elde edilen SEM görüntülerine gözeneklilik açısından az oranda benzemektedir.

Jelena Rnjak-Kovacina ve ark. (2015), *The Effect of Sterilization on Silk Fibroin Biomaterial Properties* adlı çalışmalarında sıvı fibroinin otoklavlanması, ve otoklavlama işlemi yapılmıştır ancak pH değişimi olmamıştır. Sıvı fibroinin otoklavlanması G grubuna, otoklavlama işlemi ise C grubuna tekabül etmektedir. Çalışmada elde edilen SEM görüntüleri, kısmi benzerlik göstermektedir.

Ph değişimi ve deney şartlarının iskelelerin bütünlüğünü bozmadığı ancak yapıda düzensizlik meydana getirdiği izlendi. Fibroinin standart pH seviyesi 6'dır ve 1N HCl çözeltisi ile fibroinin pH'ı 5'e düşürüldüğünde yani asidite arttırıldığında fibroin iskelede açık mikro ve mezo oranının gözeneklilik arttığı, 1N NaOH çözeltisi ile asidite düşürüldüğünde ise bu oranının genel olarak azaldığı görüldü. Yani pH değişimleri *deney şartlarına bağlı olmadan* iskele üzerinde gözeneklilik yapısını etkilediği tespit edildi.

pH değişimi yapıldığında numuneye uygulanan deney şartları da dâhil edildiğinde en mezo gözenekli yapının A grubunda olduğu görüldü. pH 6'dan 7 ve 8'e yükseltildiğinde yani asidite azaltıldığında beta tabakalarının oldukça arttığı, yapıların yoğun olduğu hatta beta tabakalardan kısa ve ince boyutlarda lifsi yapılar

çıktığı tespit edildi. Ayrıca lifsi uzantılar kendi aralarında temas kurarak mezo gözenekler meydana getirdiği görüldü.

Lifsi yapıda uzantıların meydana gelmesine pH değerinin yükseltilmesinin yanında yüksek sıcaklıkla muamelenin de etkili olduğu görüldü. Yani C, F ve G gruplarında lifli yapılar oldukça yoğun şekilde gözlemlendi. Buna karşın A grubunda bu yapılara benzer uzantıların oluşmaması, uygulanan deney şartlarındaki sıcalıkların sırasıyla -20°C, -86°C ve -55°C olmasına, B grubunda da bu yapılara benzer uzantıların oluşmaması, yine deney şartlarında uygulanan sıcaklığa (37°C) bağlı olacağını işaret etmektedir.

C, F ve G gruplarının deney şartlarına bakıldığında 121°C ve 180°C gibi oldukça yüksek sıcaklıklar ile C ve G gruplarında otoklav, F grubunda etüv kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca C ve G'de yüksek buhar basıncı uygulanmıştır. Buhar basıncının numuneye katı halde uygulandığı durumda beta tabakaları yıktığı ve fibroin çözeltisine de etki ederek yapının etkilendiği ve tabakalrın bozulmasından kaynaklı lifsi yapıların oluşarak gözenek boyutunu değiştirdiği tespit edilememek ile birlikte, yüksek sıcaklığın fibroinin doğal yapısında bulunan beta-tabakalı yapılarını bozup tekrar düzenlediği ve daha da yoğunlaştırdığı tespit edilmiştir.

B grubunda diğer gruplara göre daha küçük gözeneklilik ve düzlemsel yapıların daha fazla olması tamamen uygulanan deney prosedüründeki deney şartlarına bağlıdır. Gözeneklilik yapısını destekleyen materyal, boyutuna göre ayrılarak kullanılan NaCl partiküllerinden kaynaklanmaktadır. Düzlemsel yapıların ise vakumlu ortam ve distile su ile yapılan arındırma işlemi sırasında gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir.

G grubunda genel olarak literatürde pek yaygın olmayan bir yöntem izlenmiş olup, sıvı fibroin çözeltisinin otoklavlanması, fibroinin yapısında bulunan protein zincirlerinin bozunarak sekonder ve tersiyer yapılarının yeniden düzenlendiği tahmin edilmektedir. Çünkü bu gruba ait tüm numunelerde diğer grup numunelerine benzer olmayan morfolojide gözenekli yapılar, katlanmalar ve uzantılar gözlenmiştir. C ve F gruplarında yüksek sıcaklık ve pH yükseltilmesinin gözenek boyutu ve miktarında azalma meydana getirdiği, tabakaların ve uzantıların arttığı tespit edildi.

A, B, C, F ve G gruplarına ait numuneler için genel olarak bakıldığında doku mühendisliği çalışmalarıda hücre proliferasyonu ile dokulaşma sürecine uygun morfoloji ve yüzey alanına sahip olduğu söylenebilmektedir.

Özellikle C ve F serisine ait numunelerde molekül içi çapraz bağlanmaların kendiliğinden gerçekleştiği ve buna bağlı olarak bozunma süresinin kültür şartlarına daha uygun olduğu görülmektedir. Oluşan lifsi yapıların kendi aralarında kesişip bağlanarak farklı boyutlarda gözenekli yapılar meydana getirmesi de molekül içi bağlanmaları desteklemektedir. Ayrıca bu durum malzemenin mekanik dayanımının da arttığını işaret etmektedir. Bu nedenle özellikle yüksek gerinime maruz kalan dokuların doku mühendisliği yaklaşımı ile *in vitro* rejenerasyonunda kullanılabileceği düşünülmektedir. MTT sonuçları da malzemelerin ve parçalanma ürünlerinin biyouyumlulu olduğunu göstermekte ve bu durumu doğrulamaktadır.

7.6. Sonuç

Elde edilen yapıların biyouyumluluğunu artırmak için kimyasal çapraz bağlayıcıların gerekliliği laboratuvarımızda gerçekleştirilen diğer çalışmalarımızda ayrıca araştırılmıştır. Bununla birlikte fizikokimyasal şartların etkisinin daha net olarak anlaşılabilmesi için ortama stabiletiyi artırıcı yâ da bozucu, kimyasal çapraz bağlacılar da dâhil herhangi bir madde ilavesi yapılmamıştır. Sonuçta elde edilen yapıların kimyasal ve fiziksel özellikleri doğrudan üretim şartlarına bağlanarak karşılaştırılabilmiştir.

Elde edilen bulgularda genel olarak, tüm polimerik iskelelerin özelliklerinin kompozit yapılarda korunduğu ve kompozit yapıların biyobozunurluk, ıslanabilirlik gibi fiziksel özelliklerinin doku mühendisliğinde kullanılabilecek standartlara uygun olarak ayarlanabileceği gösterilmiştir.

Tasarım olarak söz konusu yapılar, hücre yerleşmesine ve interaksiyonuna izin verecek açık gözenekliliğe sahip olarak başarılı şekilde üretilmiştir. Fibroinin sulu ortamda çözeltilerinin hazırlanarak iskele yapıların oluşturulması sırasında serbest halde bulunan zincirlerin mekanik stres şartları altında birbirleri ile daha kolay etkileşime girdiği ve zincirler arası hidrojen bağlarının yanısıra FTIR sonuçlarına

göre ester ve amid bağlarının oluştuğu belirlenmiştir. Bu nedenle polipeptit yapısındaki fibroin zincirlerinin tersiyer ve sekonder yapılarının bozulduğu SEM görüntüleri ile de doğrulanmaktadır. Sonuçta da mikro ve mezo gözenekli iskele yapılar elde edilmiştir.

Sonuç olarak, yapılan analizler amfoterik özellik gösteren fibroinin yapısındaki anyonik ve katyonik gruplar üzerinden ortam koşullarına göre farklı tepkiler oluşturduğunu açıkça göstermiştir. Bu durum hazırlanan fibroin iskelelerin morfolojik özelliklerini ile biyobozunurluklarını doğrudan değiştirmiştir. Biyouyumluluğu artırmak adına çapraz bağlayıcı kullanmak yerine mekanik stres altında çapraz bağlanmaların gerçekleşerek yapının stabilitesinin artırılabileceği tespit edilmiştir. Ancak molekül içi oluşan çapraz bağlanmaların termal bozunma hızları üzerine kısmen etkidiği görülmüş olup, çapraz bağlanmaların daha yoğun görüldüğü C serisinde termal bozunmanın pH değerlerine göre farklılık gösterdiği anlaşılmıştır. Termal analiz sonuçları ile bozunurluk sürelerinin birlikte değerlendirilmesi ayrıca homofibroin yapısındaki numunelerin bozunma hızlarının yapının sekonder ve tersiyer yapılarından ziyade primer yapılara ve molekül içi çapraz bağlanmalara göre değiştiğini göstermiştir.

Yürütülen bu tez kapsamında biyouyumluluğu artırılan ve doku mühendisliği için önemli bir parametre olan biyobozunurluluğu ayarlanabilen fibroin iskeleler elde edilmiştir. Bu yapılar, fiziksel özellikleri açısından incelendiğinde özellikle bağ dokusu ve eksternal doku rejenerasyonuna yönelik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Agrawal, C. M., Ray, R. B. J. (2001), Biomedical Materials Res., 55, 141- 150.

Ak, F., Oztoprak, Z., Karakutuk, I., Okay, O., (2013), Macroporous Silk Fibroin Cryogels, *Biomacromolecules*, *American Chemical Society,* 1-9

Akıyoshı, A., (1998), Dissolution of silk fibroin with calciumchloride/ethanol aqueous solution, *Journal Seric.Sci.Jpn.*日 蚕 雑 67(2),91-94.

Altman G.H., Diaz F., Jakuba C., Calabro T., Horan R.L., Chen J., (2003), Silk-based biomaterials, *Biomaterials*; cilt 24, sayı 3, s: 401–16.

Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., et al., (2003), *Biomaterials*, vol. 24, no. 3, pp. 401-416.

Bhardwaj N, Kundu SC., (2011), Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for cartilage tissue repair, *Carbohydrate Polymers*, 85, 325-333,.

Bhardwaj, N., & Kundu, S.C., (2011), Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications, *Carbohydrate Polymers*, vol 85, 325–333

Bini, E., Knight, D.P., Kaplan, D.L., (2004), Mapping domain structures in silks from insects and spiders related to protein assembly. *Journal Molecular Biology;* 335(1):27–40.

Biyokimya, (2000), Prof. Dr. Fahrünnisa Pamuk, syf.46-47,.

Chen X, Li WJ, Yu TY. (1997), Conformation transition of silk fibroin induced by blending chitosan. *J Polym Sci Part B—Polym Phy* ; 35(14):2293–6.

Chen, J., Minoura, N., Tanioka, A., (1994), Transport of pharmaceuticals through silk fibroin membrane, *POLYMER* V: 35, sayı 13

Cooper, G.M., (2000), The Cell - The Molecular Approach. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc..

Cunniff, P. M., Fossey S. A.; Auerbach, M. A., Song, J. W., (1993), Mechanical Properties of Major Ampulate Gland Silk Fibers Extracted from Nephilar clavipes Spiders. *In Silk Polymers; Material Science and Biotechnology*; Kaplan, D. L., Adams, W. W., Farmer, B., Viney, C., Eds.; *ACS Symposium Series 544: Oxford University Press: Charlottesville,* 234-251.

Dawsey, T.R. & McCormick, C.L., (1990), Macromolecules Chemical. Phys., vol. 30, no. 3, pp. 405-440.

Dill, K.A., (1990), *Biochemistry*, , vol. 29, no. 31, 7133-7156

Dwyer, D.S., (1999), *Biopolymers*, vol. 49, no. 7, 635-645

Foo, C., Kaplan D.L., (2002), Genetic engineering of fibrous proteins: spider dragline silk and collagen. *Adv Drug Deliv Rev;* 54(8):1131–43.

Freddi, G., Pessina, G., and Tsukada, M., (1999), International Journal Biology, *Macromolecules.*, vol. 24, no. 3,. 251263.

Ghezzi C.E., Marelli B., Donelli I., Alessandrino A., Freddi G., Nazhat S.N., (2014), The role of physiological mechanical cues on mesenchymal stem cell differentiation in an airway tract-like dense collagenesilk fibroin construct, *Biomaterials,* 35, 6236-6247, 2014.

Gobin, A.S., Froude, V.E., Mathur, A.B., (2005), Structural and mechanical characteristics of silk fibroin and chitosan blend scaffolds for tissue regeneration, *Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res* 74A: 465– 473.

Gotoh, Y., Niimi, S., Hayakawa, T., and Miyashita, T., (2004), *Biomaterials*, , vol. 25, no. 5,. 1131-1140

Haider, M., Megeed, Z., Ghandehari, H., (2004), Genetically engineered polymers: status and prospects for controlled release. *Journal Control Release;* 95(1):1–26.

Hashimoto, Y., Taniguchi, T., Kameda, Y., Tamada, H., (2015), Changes in the properties and protein structure of silk fibroin molecules in autoclaved fabrics, *Polymer Degradation Stab*. 112 20–26.

Hino, T., Tanimoto, M. and Shimabayashi, S. (2003), *J. Colloid. Interf. Science*., 266, 68–73.

Hofmann, S., S. Stok, K.S., Kohler, T., Meinel, A.J., Müller, R., (2014), Effect of sterilization on structural and material properties of 3-D silk fibroin scaffolds, *Acta Biomaterialia* , 10, 308

Hu, X., Kaplan, D., Cebe, P., (2007), Effect of water on the thermal properties of silk fibroin, *Thermochimica Acta* vol 461, 137–144.

Hu, X., Shmelev, K., Sun, L., Gil, E., Park, S., Cebe, P., Kaplan, D.L., (2011), Regulation of Silk Material Structure by Temperature-Controlled Water Vapor Annealing, *Biomacromolecules, American Chemical Society, Biomacromolecules,* 12, 1686–1696

Hubbell, J.A., (2003), Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Curr Opin Biotechnology*;14: 551–558.

Hutmacher, D. W., (2000), *Biomaterials*, 21, 2529-2543

Iizuka, E., (1966), *Biorheology*, , vol. 3, no. 1, 1411- 22.

Ishaug, S.L., Crane, G.M., Miller, M. J., Yasko, A.W., Yaszemski, M. (1997), *Journal Biomedical Materials Res*., 36, 17-28.

Ishaug-Riley, S., Crane-Kruger, G.M., Yazemski, M. J., Mikos, A.G., (1998), *Biomaterials*, 19, 1405-1412

Jaramillo-Quicenoa, N., Álvarez-López, C., Restrepo-Osorio, A., (2017), Structural and thermal properties of silk fibroin films obtained from cocoon and waste silk fibers as raw materials, *3rd International Conference on Natural Fibers: Advanced Materials for a Greener World*, ICNF 2017, 21-23 June 2017, Braga, Portugal, *Procedia Engineering* 200 ,384–388

Kaplan D., Adams W.W., Farmer B, Viney C., (1994), Silk: biology, structure, properties and genetics, *American Chemical Society Symposium Series*, sayı 544, s: 2–16.

Kaplan D.L., Fibrous proteins- silk as a model system: Polymer Degradation and Stability, (1998); *International Journal of Materials & Product Technology*, sayı 59, 1–3: s: 25–32.

Kaplan D.L., Fossey S., Mello C.M., Arcidiacono S., Senecal K., Muller W., (1992), Biosynthesis and processing of silk proteins. *MRS Bulletin*; cilt 17, sayı 10, s:7-41.

Kaplan D.L., Mello C.M., Arcidiacono S., Fossey S., Senecal K., Muller W., (1998), In: McGrath K., Kaplan D.L., *Silk: Protein based materials*. Boston: Birkhauser; s: 103–31.

Kleinman, H.K,, Philp, D., Hoffman, M.P.,(2003) Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnology*;14: 526 – 532.

Kundu B., Rajkhowa R., Kundu SC., Wang X., (2013), Silk Fibroin Biomaterials for Tissue Regenerations.

Langer R & Vacanti JP. (1993), Tissue engineering. *Science*; 260(5110): 920–6.

Lazo, N.D. & Downing, D.T., (1999), Macromolecules, vol. 32, no. 24, 4700- 4705.

Lehninger, A., (1970); edt. Elçin, M (2013), Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Beşinci Baskıdan çeviri, syf. 128.

Lotz, B., & Cesari, F.C., (1979), The chemical structure and the crystalline structures of Bombyx mori silk fibroin, *BIOCHIMIE*, 61, 205-214.

Lucas F, Shaw JBT, (1958), Smith SG. The silk fibroins. *Adv Protein Chem*; 13:108–244.

Magoshi J., Magoshi Y., Becker M.A., Kato M., Han Z., Tanaka T., Inoue S., Nakamura S., (2000) Crystallization of Silk Fibroin from Solution, *Thermochimica Acta*, 352-353, 165-169,.

Magoshi J., Magoshi Y., Becker M.A., Nakamura S. (1996),Polymeric Materials Encyclopedia, edited by JC Salamone, CRC Press, NewYork,

Matsumoto, K. & Uejima, H., J. (1949), Polymer Science-Polymer Chemical. vol. 35, no. 10, 1949-1954.

Megeed Z., Cappello J, Ghandehari H. Genetically, (2002) Engineered silk elastin like protein polymers for controlled drug delivery, *Adv Drug Deliv Rev*; 54(8):1075–91.

Meinel L., Hofmann S., Karageorgiou V., Kirker-Head C., McCool J., Gronowicz G., Zichner L., Langer R., Vunjak-Novakovic G., Kaplan DL. (2005), The Inflammatory Responses to Silk Films in vitro and in vivo, *Biomaterials*, 26, 147-155.

Minoura N, Tsukada M, Nagura M., (1990), Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial, *Biomaterials*; 11(6): 430–4

Minoura, N., Tsukada, M., (1990), Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial. *Biomaterials*;11: 430 – 434.

Mirahmadi F., Tafazzoli-Shadpour M., Shokrgozar MA., Bonakdar S., (2013), Enhanced mechanical properties of thermosensitive chitosan hydrogel by silk fibers for cartilage tissue engineering, *Materials Science and engineering* C, 33, 4786-4794,

Moraes, M., Weska, R.F., Beppu, M.M., (2013), *Journal Biomedical. Materials. Res. B. Appl. Biomaterials*., 102, 869.

Nazarov, R., Jin, H.J., and Kaplan, D.L., (2004), Porous 3-D Scaffolds from Regenerated Silk Fibroin, *Biomacromolecules*, 5, 718-726

Ohgo, K., Zhao, C., Kobayashi, M., and Asakura, T., (2003), *Polymer*, vol. 44, no. 5, 841-846.

Parker, A.J., (1969), *Chemical Review*, vol. 69, no. 1, 132.

Paulsson, M., (1992), Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27:93–127.

Putthanarat, S., Stribeck, N., Fossey, S.A., et al., (2000), *Polymer*, vol. 41, no. 38, 7735-7747.

Rıchard, E., Marsh, R., (1955), An Investıgatıon Of The Structure Of Sılk Fıbroın, *Bıochımıca Et Bıophysıca Acta*, Vol. 16

Rising, A., Nimmervoll, H., (2005), Grip S, Fernandez-Arias A, Storckenfeldt E, Knight DP, et al. Spider silk proteins—mechanical property and gene sequence. *Zoology Science*; 22(3):273–81.

Rnjak-Kovacina, J., DesRochers, T.M., Burke, K.A., Kaplan, D.L., (2015), The Effect of Sterilization on Silk Fibroin Biomaterial Properties, *Macromolecules Bioscience*, 15, 861–874

Rogers, W., (2012), Sterilisation Techniques for Polymers in Sterilisation of *Biomaterials and Medical Devices*, S. Lerouge, A. Simmons, Eds., Woodhead Publishing, Sawston, Cambridge, UK 2012, Ch. 2

Rosso, F., Giordano, A., Barbarisi, M., Barbarisi, A., (2004), From cell-ECM interactions to tissue engineering. *Journal Cell Physiol* ; 199:174 –180.

Rujiravanit R., Kruaykitanon S., Jamieson AM., Tokura S., (2003), Preparation of Crosslinked Chitosan/Silk Fibroin Blend Films for Drug Delivery System, *Macromolecular Bioscience*, 3, 604-611,.

Sashina, E.S., Bochek, A.M., Novoselov, N.E. and Kirichenko, D.A., (2006), Structure and Solubility of Natural Silk Fibroin, *Russian Journal of Applied Chemistry*, Vol. 79, No. 6,. 869- 876.

Simmons, A.H., Michal, C.A., (1996), Jelinski LW. Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk. *Science;* 271(5245):84–7.

Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G, Kaplan DL. (2001), Functionalized silk-based biomaterials for bone formation, *J Biomed Mater Res*;54(1):139–48.

Srısuwan, Y., Srıhanam, P., and Baımark, Y., (2009), Preparation of Silk Fibroin Microspheres and Its Application to Protein Adsorption, *Journal of Macromolecular Science R , Part A: Pure and Applied Chemistry*, 46, 521–525

Terry, A.E., Knight, D.P., Porter, D. and Vollrath, F., (2004), pH Induced Changes in the Rheology of Silk Fibroin Solution from the Middle Division of Bombyx mori Silkworm, *Biomacromolecules*, 5, 768-772

Tsukada, M., Freddi, G., Minoura, N., Allara. G., (1994), Preparation and Application of Porous Silk Fibroin Materials. *Journal Application Polymer Science*; 54:507–514.

Tsukada, M., Gotoh, Y., and Minoura, N., J. (1990), *Seric. Science. Japan.*, vol. 59, no. 2,. 325330.

Vollrath, F., (1999), Biology of spider silk. *Int Journal Biology Macromolecules*; 24(2–3):81–8.

Vollrath, F., (2000), Strength and structure of spiders' silks. *Journal Biotechnology*; 74(2):67–83.

Vollrath, F., (2005), Spiders' webs. *Curr Biology*; 15(10): R364–5.

Vollrath, F., Knight, D. P. (2001), *Nature* , 410, 541-548

Wang X., Partlow B., Liu J., Zheng Z., Su B., Wang Y., Kaplan DL., (2015), Injectable Silk-Polyethylen Glycol Hydrogels, *Acta Biomaterialia*, 12, 51-61,.

Wang, Y., Rudym, D. D., Walsh, A., Abrahamsen, L., Kim, H. J., Kim, H. S., ... & Kaplan, D. L. (2008)., In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials*, 29(24-25), 3415-3428.

Wanga Y., Kima H., Vunjak-Novakovic G., Kaplan D.L., (2006), Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials, *Biomaterials*, Sayı 27, S: 6064–6082

Winkler, S., Kaplan, D.L., (1990), Molecular biology of spider silk. *Journal Biotechnology* ;74(2):85–93.

Yeo, J.H., Lee, K.G., Lee, Y.W. and Kim, S.Y. (2003) *Eur. Polymer. Journal*., 39, 1195–1199.

Yodmuang S., McNamara S.L., Nover A.B., Mandal B.B., Agarwa M., Kelly T.N., Chao PG., Hung C., Kaplan D.L., Vunjak-Novakovic G., (2015), Silk microfiber-reinforced silk hydrogel composites for functional cartilage tissue repair, *Acta Biomaterialia*, 11, 27-36,.

You R., Xu Y., Liu G., Liu Y., Li X., Li M. (2014), Regulating the degradation rate of silk fibroin films through changing the genipin crosslinking degree, *Polymer Degradation and Stability*, 109, 226-232,.

Zhao, X., Yan, F., Ding, Y., Yang, X., Gu, J., (2011), *Biomedical. Science. Eng*., 4, 397

Zhou CZ, Confalonieri F, Medina N, Zivanovic Y, Esnault C, Yang T, Jacquet M, Janin J, Perasso R, Li ZG., (2000), Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain. *Nucleic Acids Res*; 28:2413– 2419.

Zhou,C., Confalonieri, F., Jacquet, M., Perasso, R., Li, Z. and Janin, J., (2001), *PROTEINS*: Structure, Function, and Genetics 44:119–122

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gülbahar KIDIMAN

Doğum Yeri ve Yılı : Ankara - 13/04/1994

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : bahar.kdmn@gmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Rauf Denktaş Anadolu Lisesi, Ankara

Lisans : Kastamonu Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Kastamonu (2013-2017)

Yüksek Lisans : Kastamonu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü, Kastamonu (2017- 2019)

Mesleki Deneyim

İş Yeri : Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi, 2017-2018

İş Yeri : GATA Medikal Tasarım ve Üretim Merkezi, Ankara, 2016

İş Yeri : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı, Adli Genetik Araştırma Laboratuvarı, Ankara, 2015

İş Yeri : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Laboratuvarı, Ankara, 2015

İş Yeri : BMT Calsis Sağlık Teknolojileri Şirketi, Hacettepe Üniversitesi Teknokent, Ankara, 2014

Yayınlar

Emin N., Mutlu E., Kıdıman G., Hararoğlu N. (2018) Determination of Water Quality Parameters and Cytotoxicity in Incesu Pond (Kastamonu/Turkey). II. International Eurasian Agriculture and Natural Sciences Congress, Bakü, Azerbaycan. (Sözlü Bildiri)

Kıdıman G. and Emin N. (2017) Production And Characterization Of Tunica Intena And Tunica Media Layers From Poly(E-Caprolactone) And Collagen Polymers By Biomimetic Approach. The International Joint Science Congress of Materials and Polymers, Ohrid, Makedonya. (Sözlü bildiri)

Kıdıman G. (2017) Biyobozunur Polimerik Kompozitlerin Kullanımı ile Kişiye Özel Vasküler İmplantların Tasarımı ve Geliştirilmesi, Kastamonu Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Lisans Bitirme Tezleri Semineri, Kastamonu, Türkiye. (Sözlü Bildiri)

Kıdıman G. (2015) Antik DNA ve Mumya Otopsisi", Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Dâhili Tıp Bilimleri Bölüm Başkanlığı, Ankara, Türkiye (Sözlü Bildiri)