



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN  
ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**LL-37 ANTİMİKROBİYAL PEPTİT İLE  
İŞLEVSELLEŞTİRİLMİŞ PHB/KOLAJEN  
ELEKTROEĞRİLMİŞ YARA ÖRTÜSÜNÜN  
GELİŞTİRİLMESİ**

**Beyza Nur SAYANER TAŞÇI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Mayıs-2025  
KONYA  
Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Beyza Nur SAYANER TAŞÇI tarafından hazırlanan “LL-37 Antimikrobiyal Peptit ile İşlevselleştirilmiş PHB/Kolajen Elektroeğrilmiş Yara Örtüsünün Geliştirilmesi” adlı tez çalışması 27/05/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

#### Başkan

Doç. Dr. Fatma BAYRAM

#### Danışman

Prof. Dr. Gökhan KARS

#### Üye

Doç. Dr. Tuğba Nur ASLAN

### İmza

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun ....../.../20.. gün ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY  
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje no: 24YL15002) ve Avrupa Birliği Ufuk Avrupa REGENEU projesi (Proje no:101079123) tarafından desteklenmiştir.

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## **DECLARATION PAGE**

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Beyza Nur SAYANER TAŞÇI

Tarih: 27.05.2025

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

# LL-37 ANTİMİKROBİYAL PEPTİT İLE İŞLEVSELLEŞTİRİLMİŞ PHB/KOLAJEN ELEKTROEĞRİLMİŞ YARA ÖRTÜSÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

**Beyza Nur SAYANER TAŞÇI**

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Gökhan KARS**

**2025, 104 Sayfa**

**Jüri**

**Prof. Dr. Gökhan KARS**

**Doç. Dr. Fatma BAYRAM**

**Doç. Dr. Tuğba Nur ASLAN**

Yanık ve yaraların tedavisinde cilt onarımı önemlidir. Yaralanma sonrasında cilt fonksiyonunu yeniden sağlamak ve yara iyileşmesini kolaylaştırmak için doku mühendisliği kavramı ortaya çıkmaktadır. Bu, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyouyumlu malzemelerin sıklıkla doku yenilenmesi için ana iskeleyi oluşturmak üzere kullanıldığı bir alandır. Biyopolimerler, biyoaktivite, tekrar üretilebilirlik, biyoemilebilirlik, biyouyumluluk, biyobozunurluk ve hidrofilitiklik gibi mükemmel benzersiz özelliklerinden dolayı biyomalzemelerin üretimi için uygundur. Bu tezde, elektroegirme yöntemiyle LL-37 antimikrobiyal peptitle işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen yara örtüsü prototipi geliştirildi. PHB/Kolajen yara örtüsü prototipi için *Cereibacter sphaeroides*'ten ekstrakte edilen polihidroksibütirat (PHB) biyopolimeri, ticari PHB biyopolimeri ve bir diğer doğal biyopolimer olan marin kolajen hekzafloroizopropanol (HFIP) ile çözündürülerek polimer çözeltileri elde edildi. Hazırlanan polimer çözeltileri bakteriyel PHB oranları %0 bakteriyel PHB, %25 bakteriyel PHB ve %50 bakteriyel PHB olacak şekilde farklı oranlarda hazırlandı. Bu polimer çözeltileri, 1.8 mL/saat akış hızı, 18 cm çalışma mesafesi ve 27 kV uygulanan voltaj gibi optimize edilmiş elektroegirme parametreleri kullanılarak nanofiber formunda elektroegirildi. Elde edilen nanofiberler Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskopu (FESEM), Termogravimetrik Analiz Cihazı (TGA), X-Işını Difraktometresi (XRD) ve Optik Tensiyometre kullanılarak karakterize edildi. *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922) üzerinde antibakteriyel aktivite değerlendirmesi, DMEM besiyerinde biyobozunurluk çalışması, L929 fibroblast hücre hattı üzerinde sitotoksikite testleri ve HS2 keratinosit hücre hattı üzerinde yara iyileştirici etkisi araştırıldı. Tasarlanan malzeme özelliklerini in vitro koşullarda değerlendirmek için nanofiber üzerindeki hücrelerin morfolojisi ters ışık mikroskopu ile incelendi. Çalışman sonucunda nanofiberlerin in vitro olarak biyouyumlu olduğu ve toksik bir etkisinin olmadığı gözlemlendi. Geliştirilen nanofiberin test edilen bakterilere karşı antibakteriyel etkinliğinin olduğu ve LL-37 ile işlevselleştirildiğinde yara iyileştirici etkisinin daha fazla olduğu tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Antimikrobiyal Peptit, Elektroegirme, Kolajen, LL-37, Polihidroksibütirat

## ABSTRACT

### MS THESIS

# DEVELOPMENT OF PHB/COLLAGEN ELECTROSPUN WOUND DRESSING FUNCTIONALIZED WITH LL-37 ANTIMICROBIAL PEPTIDE

**Beyza Nur SAYANER TAŞCI**

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF  
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY  
THE DEGREE OF MASTER OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC**

**Advisor: Prof. Dr. Gökhan KARS**

**2025, 104 Pages**

**Jury**

**Advisor Prof. Dr. Gökhan KARS  
Assoc. Prof. Dr. Fatma BAYRAM  
Assoc. Prof. Dr. Tuğba Nur ASLAN**

Skin repair is essential in the treatment of burns and wounds. After an injury, the concept of tissue engineering emerges to restore skin function and facilitate wound healing. This field often involves the use of biodegradable and biocompatible materials as a primary scaffold for tissue regeneration. Biopolymers are suitable for the production of biomaterials due to their excellent and unique properties such as bioactivity, reproducibility, bioresorbability, biocompatibility, biodegradability, and hydrophilicity. In this thesis, a PHB/Collagen wound dressing prototype functionalized with the antimicrobial peptide LL-37 was developed using the electrospinning method. For the PHB/Collagen wound dressing prototype, polymer solutions were prepared by dissolving polyhydroxybutyrate (PHB) biopolymer extracted from *Cereibacter sphaeroides*, commercial PHB biopolymer, and another natural biopolymer, marine collagen, in hexafluoroisopropanol (HFIP). The prepared polymer solutions were formulated with varying bacterial PHB ratios: 0% bacterial PHB, 25% bacterial PHB, and 50% bacterial PHB. These polymer solutions were electrospun into nanofiber form using optimized electrospinning parameters, including a flow rate of 1.8 mL/h, a working distance of 18 cm, and an applied voltage of 27 kV. The resulting nanofibers were characterized using Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM), Thermogravimetric Analysis (TGA), X-Ray Diffractometry (XRD), and an Optical Tensiometer. Antibacterial activity assessments were conducted against *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) and *Escherichia coli* (ATCC 25922). Biodegradability studies were carried out in DMEM medium, cytotoxicity tests were performed on the L929 fibroblast cell line, and the wound healing effect was investigated on the HS2 keratinocyte cell line. To evaluate the properties of the designed material under in vitro conditions, the morphology of cells on the nanofiber was examined using an inverted light microscope. As a result of the study, it was observed that the nanofibers were biocompatible in vitro and had no toxic effects. The developed nanofiber showed antibacterial activity against the tested bacteria, and when functionalized with LL-37, it exhibited enhanced wound healing effects.

**Keywords:** Antimicrobial Peptide, Collagen, Electrospinning, LL-37, Polyhydroxybutyrate

## ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans sürecinde bilgi ve düşünceleriyle beni aydınlatan, araştırma esnasında yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Gökhan KARS'a, deney sürecinde destek olan Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS'a, Doç. Dr. Sema KARSLIOĞLU'na, Doç. Dr. Kemal ÇETİN'e ve jüri üyeleri Doç. Dr. Fatma BAYRAM, Dr. Öğretim Üyesi Tuğba Nur ASLAN'a değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim. Laboratuvar arkadaşlarım Ayşenur ALTINKAYA, Sümeyye KOZAN, Tuğba BAŞ, Merve BAŞTUTAN, Besna DALMIŞ, Sıdika ŞENSÖZLÜLER ve Ayşe Nur SERİN'e teşekkür ederim. Destekleri için Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (Proje no: 24YL15002), Avrupa Birliği Ufuk Avrupa REGENEU projesine (Proje no:101079123) teşekkür ederim. Her kararında beni destekleyen ve yanımda olan annem Ayşe SAYANER, babam İsmail SAYANER, ablalarım Sultan, Fatma, Selma'ya ve eşim Abdullah TAŞÇI'ya teşekkür ederim.

Beyza Nur SAYANER TAŞÇI  
KONYA-2025

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>2</b>
2.1. Polimerler.....	2
2.2. Biyopolimerler .....	4
2.2.1. Polihidroksialkanoatlar (PHA) .....	9
2.2.1.1. Polihidroksibütirat (PHB) .....	11
2.2.1.2. Polihidroksibütirat (PHB)'ın Mikroorganizmalar Tarafından Üretimi .	13
2.2.1.3. PHB'nin Biyoyumluluğu ve Biyolojik Parçalanabilirliği.....	15
2.2.1.4. Polihidroksibütirat (PHB)'ın Biyomedikal Uygulamaları.....	16
2.3. Yara ve Yara İyileşmesi.....	17
2.3.1. Hemostaz Aşaması.....	18
2.3.2. İnflamasyon Aşaması.....	19
2.3.3. Proliferasyon .....	20
2.3.4. Yeniden modelleme .....	21
2.4. Yara Örtüsü.....	21
2.4.1. Geleneksel Yara Örtüleri .....	23
2.4.2. Modern Yara Örtüleri .....	23
2.4.2.1. Hidrokolloid Yara Örtüleri .....	24
2.4.2.2. Hidrojel Yara Örtüleri.....	24
2.4.2.3. Yarı Geçirgen Sünger Yara Örtüleri .....	25
2.4.2.4. Biyoaktif Yara Örtüleri .....	25
2.5. İskele Üretimi İçin Üretim Teknolojileri .....	27
2.5.1. Solvent dökümü ve partikül süzme tekniği.....	27
2.5.2. Termal olarak indüklenen faz ayrımı tekniği.....	28
2.5.3. Emülsiyon dondurarak kurutma tekniği .....	29
2.5.4. Elektroeğirme tekniği .....	30
2.5.5. 3D Biyobaskı .....	35
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>37</b>
3.1. Elektroeğirme ile PHB/Kolajen Yara Örtüsü Prototipinin Geliştirilmesi .....	37
3.2. LL-37 Antimikrobiyal Peptit ile PHB/Kolajen Yara Örtüsü Prototipinin İşlevselleştirilmesi .....	40

3.3. Geliştirilen Yara Örtüsü Prototipinin Karakterizasyonu .....	40
3.3.1. FT-IR Kullanılarak Fizikokimyasal Analiz .....	40
3.3.2. XRD Analizi .....	40
3.3.3. Termal Özellikler .....	41
3.3.4. Hidrofilik Profili Değerlendirmesi.....	41
3.4. Hücre Kültürü Testleri .....	41
3.4.1. Sitotoksosite Analizi .....	42
3.4.2. Çizik Testi.....	43
3.4.3. In Vitro Biyobozunurluk Testi.....	44
3.5. Geliştirilen Nanofiberlerin Morfolojik Analizleri .....	45
3.6. Nanofiber Yüzeyine Hücre Adezyonunun Konfokal Mikroskopunda Değerlendirilmesi.....	45
3.7. Nanofiber Yüzeyine Hücre Adezyonunun FESEM’de Değerlendirilmesi.....	46
3.8. In Vitro Antibakteriyel Aktivite Değerlendirmesi.....	46
3.9. Mikro BCA Salım Testi .....	47
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>49</b>
4.1. PHB/Kolajen Nanofiber Üretimi .....	49
4.2. Karakterizasyon Analizi .....	51
4.2.1. FT-IR Analizi.....	51
4.2.2. XRD Analizi .....	53
4.2.3. TGA ve DSC Analizleri.....	57
4.2.4. Hidrofilik Profili Değerlendirmesi.....	61
4.3. Hücre Kültürü Testleri .....	64
4.3.1. Sitotoksosite Analizi .....	64
4.3.2. Çizik Testi.....	67
4.3.3. In Vitro Biyobozunurluk Testi.....	69
4.4. Geliştirilen Nanofiberlerin Morfolojik Analizleri .....	71
4.5. Nanofiber Yüzeyine Hücre Adezyonunun Değerlendirilmesi.....	74
4.6. In Vitro Antibakteriyel Aktivite Değerlendirmesi.....	75
4.7. Mikro BCA Salım Testi .....	77
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>80</b>
5.1. Sonuçlar .....	80
5.2. Öneriler .....	82
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>83</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Polimerlerin genel sınıflandırması (Mukherjee vd., 2023) .....	2
Şekil 2.2. Polimerlerin biyolojik parçalanmasında genel mekanizma (Yeo vd., 2018) ...	3
Şekil 2.3. Biyobozunur polimerlerin sınıflandırılması (Yeo vd., 2018).....	3
Şekil 2.4. Biyopolimerlerin sınıflandırılması (Sharma vd., 2018) .....	4
Şekil 2.5. Sentez kaynağı bakımından en yaygın olan biyopolimerlerin sınıflandırılması (Zarrintaj vd., 2023).....	5
Şekil 2.6. Doku mühendisliği (Sundar vd., 2021) .....	6
Şekil 2.7. Polihidroksialkanoat (PHA) kimyasal yapısı (Tan vd., 2014) .....	9
Şekil 2.8. PHB'nin genel formülü (Dut, t.y.) .....	12
Şekil 2.9. <i>Priestia sp.</i> YH4'ün 30 °C'de MB ortamında 96 saatlik ekimden sonra optimize edilmiş koşullarda TEM görüntüsü ve PHB üretimi (Jung vd., 2023) .....	12
Şekil 2.10. Genel PHB biyosentez yolu (Martínez vd., 2023) .....	14
Şekil 2.11. Yara iyileşme aşamaları a) Hemostaz b) İnflamasyon c) Proliferasyon d) İyileşme (R. Wang vd., 2025).....	18
Şekil 2.12. Yara iyileşmesi .....	23
Şekil 2.13. Modern Yara Örtüsü Çeşitleri (Mukai, 2024) .....	24
Şekil 2.14. Hidrojel Yara Örtüsü (Sun vd., 2025) .....	25
Şekil 2.15. Yara örtüsü çeşitleri (Ambekar, 2019).....	26
Şekil 2.16. Solvent dökümü ve partikül süzme tekniği (Sola vd., 2019) .....	28
Şekil 2.17. Termal olarak indüklenen faz ayrımı tekniği (Conoscenti vd., 2017).....	29
Şekil 2.18. Emülsiyon dondurarak kurutma tekniği (Morais vd., 2016) .....	30
Şekil 2.19. Elektroğirme tekniği .....	31
Şekil 2.20. Antimikrobiyal peptitlerin bakteri dış ve sitoplazma membranından geçişi (Merve Ataman, 2016).....	34
Şekil 2.21. 3D Biyoyazıcı.....	36
Şekil 3.1. Polimer çözeltisi hazırlama ve elektroğirme aşaması.....	38
Şekil 3.2. Elektroğirme cihazı.....	39
Şekil 3.3. Sitotoksosite analizi aşamaları .....	43
Şekil 3.4. Çizik testi.....	44
Şekil 4.1. Polimer çözeltileri ve nanofiberler a) %0 bakteriyel PHB/Kolajen çözeltisi b) %25 bakteriyel PHB/Kolajen çözeltisi c) %50 bakteriyel PHB/Kolajen çözeltisi d) %100 bakteriyel PHB/Kolajen çözeltisi e) %0 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiber f) %25	

bakteriyel PHB/Kolajen nanofiber g) %50 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiber h) 0.6 cm çapında nanofiber diski .....	50
<b>Şekil 4.2.</b> %0, %25 ve %50 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberlerinin FTIR dalga sayısı ( $\text{cm}^{-1}$ ) karşılaştırması .....	52
<b>Şekil 4.3.</b> Ticari PHB, ekstrakte edilmiş PHB ve kolajenin FTIR dalga sayısı ( $\text{cm}^{-1}$ ) karşılaştırması .....	53
<b>Şekil 4.4.</b> PHB-t, PHB-b ve kolajene ait XRD Spektrumları .....	55
<b>Şekil 4.5.</b> a) %50 Kolajen ve %50 PHB(PHB-t + PHB-b) b) %50 Kolajen, %50 PHB(PHB-t + PHB-b) ve LL37 içeren numunelere ait XRD Spektrumları.....	56
<b>Şekil 4.6.</b> Ticari PHB (PHB-t), bakteriyel PHB (PHB-b) ve kolajenin (Kol) (a) termogravimetrik analiz (TGA) ve (b) diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) eğrileri	58
<b>Şekil 4.7.</b> %0, %25 ve %50 oranlarında bakteriyel PHB (PHB-b) içeren PHB/Kolajen kompozitlerinin termal özellikleri: (a) Termogravimetrik analiz (TGA) eğrileri, (b) Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) eğrileri.....	59
<b>Şekil 4.8.</b> LL-37 içeren ve farklı oranlarda bakteriyel PHB (PHB-b) içeren PHB/Kolajen kompozitlerinin termal özellikleri: (a) Termogravimetrik analiz (TGA) eğrileri, (b) Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) eğrileri.....	61
<b>Şekil 4.9.</b> a) %0 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37, b) %25 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37, c) %50 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiber matların ortalama su temas açıları Created in <a href="https://BioRender.com">https://BioRender.com</a> .....	63
<b>Şekil 4.10.</b> %0, %25 ve %50 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberleri ile muamele edilmiş L929 hücre hattının XTT yöntemi kullanılarak elde edilen hücre canlılığı analiz sonuçları .....	65
<b>Şekil 4.11.</b> a) 24 saat PHB/Kolajen nanofiberiyle muamele edilmiş L929 hücresi mikroskop görüntüleri b) 48 saat PHB/Kolajen nanofiberiyle muamele edilmiş L929 hücresi mikroskop görüntüleri .....	66
<b>Şekil 4.12.</b> a) 24 saat boyunca LL-37 antimikrobiyal peptitle işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen nanofiberiyle muamele edilen L929 hücresi mikroskop görüntüleri b) 48 saat boyunca LL37 antimikrobiyal peptitle işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen nanofiberiyle muamele edilen L929 hücresi mikroskop görüntüleri .....	67
<b>Şekil 4.13.</b> Çizik Testi a) %0 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinin HS2 hücresine muamelesi sonucu sırasıyla ilk gün, 1, 3 ve 7.günlerde çizik kapanma mikroskop görüntüleri b) %25 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinin HS2 hücresine muamelesi sonucu sırasıyla ilk gün, 1., 3. ve 7.günlerde çizik kapanma mikroskop görüntüleri c) %50	

bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinin HS2 hücrelerine muamelesi sonucu sırasıyla ilk gün, 1., 3. ve 7.günlerde çizik kapanma mikroskop görüntüleri.....	68
<b>Şekil 4.14.</b> Çizik Testi. a) LL-37 ile işlevselleştirilmiş %0 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinin HS2 hücre hattına muamelesi sonucu sırasıyla ilk gün, 1., 3. ve 7.günlerde çizik kapanma mikroskop görüntüsü. b) LL-37 ile işlevselleştirilmiş %25 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinin HS2 hücre hattına muamelesi sonucu sırasıyla ilk gün, 1, 3 ve 7.günlerde çizik kapanma mikroskop görüntüleri. c) LL-37 ile işlevselleştirilmiş %50 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinin HS2 hücre hattına muamelesi sonucu sırasıyla ilk gün, 1., 3. ve 7.günlerde çizik kapanma mikroskop görüntüleri.....	68
<b>Şekil 4.15.</b> HS2 hücre hattına çizilen çiziklerin kapanma yüzdeleri grafiği .....	69
<b>Şekil 4.16.</b> PHB/Kolajen nanofiber matların on dört günlük in vitro biyobozunurluk eğrileri.....	70
<b>Şekil 4.17.</b> a,b) %0 bakteriyel PHB/Kolajen, PHB/Kolajen/LL-37 d,e) %25 bakteriyel PHB/Kolajen, PHB/Kolajen/LL-37 g,h) %50 bakteriyel PHB/Kolajen, PHB/Kolajen/LL-37 nanofiber matlarının FESEM görüntüleri ve c) %0 bakteriyel PHB/Kolajen f) %25 bakteriyel PHB/Kolajen ı) %50 bakteriyel PHB/Kolajen çap dağılımı histogramları ...	73
<b>Şekil 4.18.</b> L929 hücre hattının a) %0 bakteriyel PHB/Kolajen b) %25 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberlerine tutunmasının FESEM görüntüsü.....	74
<b>Şekil 4.19.</b> Çeşitli PHB/Kolajen iskelelerine bağlı HS2 keratinosit hücrelerinin F-aktin boyaması. Çekirdek DAPI (mavi) ve F-aktin FITC-faloidin kullanılarak boyanmıştır. Tüm görüntüler için ölçek çubuğu 20 µm'dir. ....	75
<b>Şekil 4.20.</b> PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberlerinin antibakteriyel aktivite grafiği.....	77
<b>Şekil 4.21.</b> Albumin standardına göre absorbans-konsantrasyon eğrisi.....	78
<b>Şekil 4.22.</b> a) %0 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 b) %25 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 c) %50 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberlerinin % kümülatif salım grafikleri .	79

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1.</b> Sentetik-doğal polimerlerin avantaj ve dezavantajları (Sundar vd., 2021).....	7
<b>Tablo 2.2.</b> Doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan başlıca biyopolimerlerin özellikleri ile birlikte sınıflandırma (Zarrintaj vd., 2023).....	8
<b>Tablo 2.3.</b> PHA üreticileri ve gerekli olan karbon kaynakları (W. Zhou vd., 2023) .....	11
<b>Tablo 2.4.</b> Diğer biyobozunur biyopolimerlerle PHB'nin fiziksel özelliklerinin karşılaştırılması (Roohi vd., 2018). .....	13
<b>Tablo 2.5.</b> PHB üreten mikroorganizmalar ve kaynakları (Dut, t.y.).....	15
<b>Tablo 2.6.</b> Polimer çeşitleri ve çözücöleri.....	32



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
μ	Mikro
g/mol	Gram/mol
kDA	Kilodalton
mL/dk	Mililitre/dakika
MW	Moleküler ağırlığı
nm	Nanometre
rpm	Dakika başına rotasyon
Tg	Camsı geçiş sıcaklığı
Tm	Erime sıcaklığı
α	Alfa
β	Beta

### Kısaltmalar

AMP	Antimikrobiyal Peptit
BCA	Bikinkoninik asit
DCM	Diklorometan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimetilformamid
ECM	Hücre dışı matriks
FESEM	Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskopu
HA	Hyaluronik asit
HFIP	Heksafloroizopropanol
Mg	Magnezyum
N	Azot
OD	Optik Yoğunluk
P	Fosfat
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCL	Poli kaprolakton
PDLA	Poli D-laktik asit
PEG	Polietilen glikol
PEO	Polietilen oksit
PHA	Polihidroksialkanoat
PHB	Polihidroksibütirat
PHBV	Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)
PHHX	Polihidroksiheksanoik
PLA	Poli laktik asit
PLGA	Poli Laktik-ko-Glikolik Asit
PLLA	Poli L-laktik asit
PU	Poli üretan
PVA	Polivinil alkol
PVP	Polivinil pirolidon
TFE	Tetrafloroetilen

ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
TGA	Termogravimetrik Analiz
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
XRD	X-Işınları Difraksiyonu



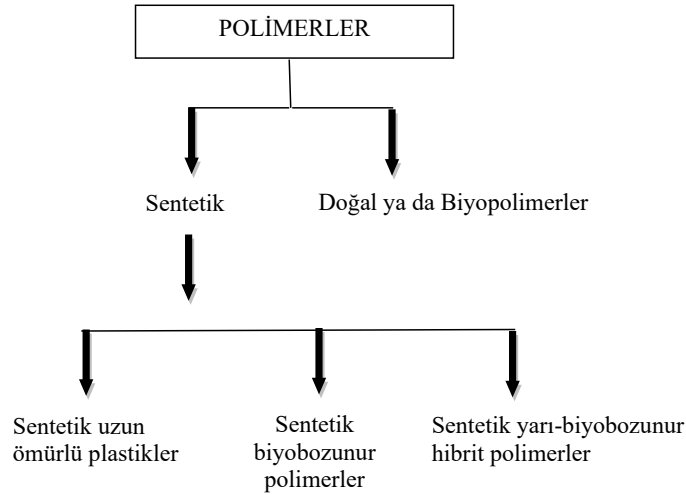
## 1. GİRİŞ

Bu çalışmada, çok sık olarak yaşadığımız kesikler, diyabet hastalarının uzun süreli geçmeyen yaraları ve yaralanmaların nihai sonucu mikrobiyal kolonizasyona dayalı yara enfeksiyonu gibi durumlara etkili olabilecek biyopolimer tabanlı antimikrobiyal peptitle işlevselleştirilmiş yara örtüsü prototipi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Yara enfeksiyonu iyileşmeyi etkileyecek en önemli faktörlerden biridir. Kontrolsüz enfeksiyonlar anatomik ve fizyolojik bütünlüğün korunmasını engeller. Çeşitli antibiyotikler patojenleri yok edebildikleri ve çoğalmalarını önleyebildikleri için şu anda dünya çapında ciddi yara enfeksiyonlarının gelişimini önlemek için kullanılmaktadır. Fakat aşırı antibiyotik kullanımı çoklu direnç gösteren mikropların çoğalmasına yol açmaktadır. Bu nedenle antibiyotik tedavisi bazı durumlarda kronik iyileşmeyen enfeksiyonları yok etmede etkisiz kalmaktadır. Bu tez çalışmasının hipotezi; “PHB/Kolajen tabanlı geliştirilen LL-37 yüklenmiş nanofiber matın in vitro yara iyileşmesini destekleyecektir” şeklinde oluşturulmuştur. Bu çalışma ile antibiyotik yerine antimikrobiyal peptidin kullanılması ile çoklu antibiyotik dirençliliğinin önüne geçilmesine de katkı sağlanacaktır. Aşağıda tez çalışması ile ilgili kavramlar ve kaynak araştırması sunulmuştur.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Polimerler

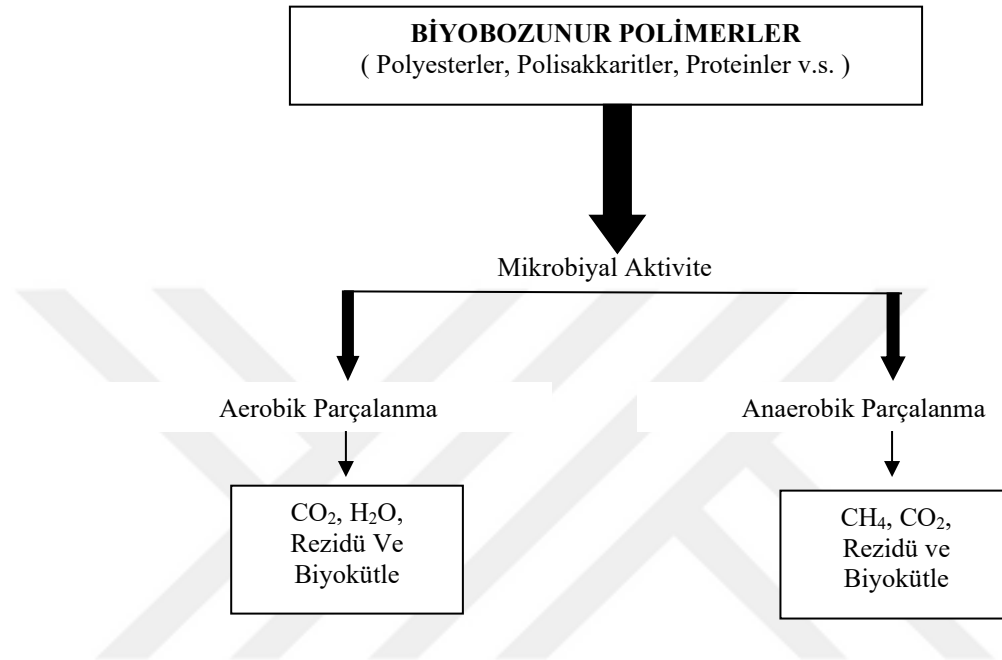
Küresel plastik üretimindeki hızlı artış, gelişmiş fonksiyonellik sunan dayanıklı ve ucuz materyallere talebi arttırmıştır. Hafif, ayarlanabilir, sağlamlık ve elastikiyet, kolay şekillendirme ve renklendirme, ayarlanabilir şeffaflık, ısı/elektrik yalıtımı gibi özelliklerinden dolayı polimerler veya plastik nesnelere günümüz toplumunun bir parçası haline gelmiştir. Bu özellikler çeşitli uygulamalar için kullanılmıştır. Paketleme için esnek filmler, sert levhalar, dokuma ve halatlar için lifler ile yüzey kaplamaları gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır. Bu çeşitli uygulamalar, farklı özelliklerin kombinasyonlarını gerektirir. Özellikle zorlu uygulamalara, karbon veya cam fiberleri gibi güçlü malzemelerle polimerleri takviye ederek daha kolay ulaşılmaktadır. Polimerler genel olarak doğal (polisakkaritler ve proteinler), sentetik (esterler, amidler, eterler, üreanlar) biyolojik olarak parçalanabilen polimerler ve sentetik biyopolimerler (veya hibrit sistemler) olarak sınıflandırılabilir (Mukherjee vd., 2023) (Şekil 2.1.). Doğal olarak mevcut biyobozunur polimerler, polisakkaritler, lignin, kitosan, nişasta, selüloz, kolajen v.s. örnekleri verilmektedir. Sentetik biyobozunur polimerlere ise alifatik polyesterler, polianhidrit v.s. örnekleri verilmektedir.



Şekil 2.1. Polimerlerin genel sınıflandırması (Mukherjee vd., 2023)

Bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalar tarafından organik materyallerin parçalanması biyobozunma olarak bilinir. Biyolojik olarak parçalanabilen materyaller

olsa da cam ve plastik gibi parçalanması binlerce yıl süren materyallerde vardır. Biyobozunma, polimerin fiziksel, kimyasal, mekanik olarak parçalandığı ilk adımdır. İkinci olarak parçalanma süreci, polimerik türlerin monomer ve oligomerlerin arasındaki bağın parçalanmasına dayalı süreç olarak devam eder (Şekil 2.2.) (Yeo vd., 2018; Mukherjee et al., 2023).



Şekil 2.2. Polimerlerin biyolojik parçalanmasında genel mekanizma (Yeo vd., 2018)

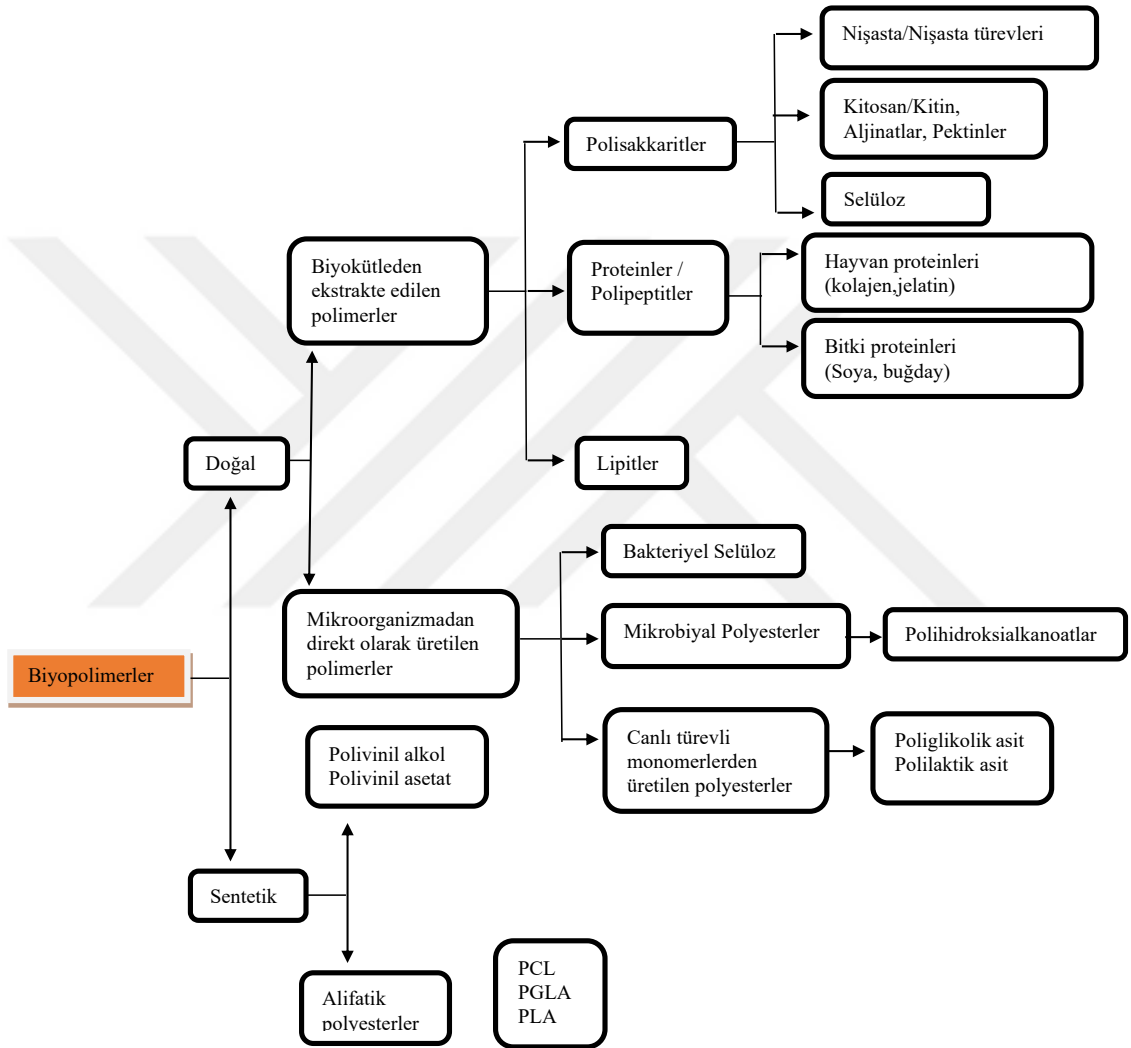
Doğal olarak mevcut biyobozunur polimerler, polisakkaritler, lignin, kitosan, nişasta, selüloz, kolajen v.s. örnekleri verilmektedir. Sentetik biyobozunur polimerlere ise alifatik polyesterler, polianhidrit v.s. örnekleri verilmektedir. (Şekil 2.3.) (Yeo vd., 2018).

<b>Biyobozunur polimerler</b>	
<b>Doğal olarak biyobozunur</b>	<b>Sentetik biyobozunur</b>
Polisakkaritler	Alifatik poli (ester)
Lignin	Poli (anhidrit)
Kitosan	Poli (fosfazan)
Nişasta	Poli (aminoasitler)
Kolajen	

Şekil 2.3. Biyobozunur polimerlerin sınıflandırılması (Yeo vd., 2018)

## 2.2. Biyopolimerler

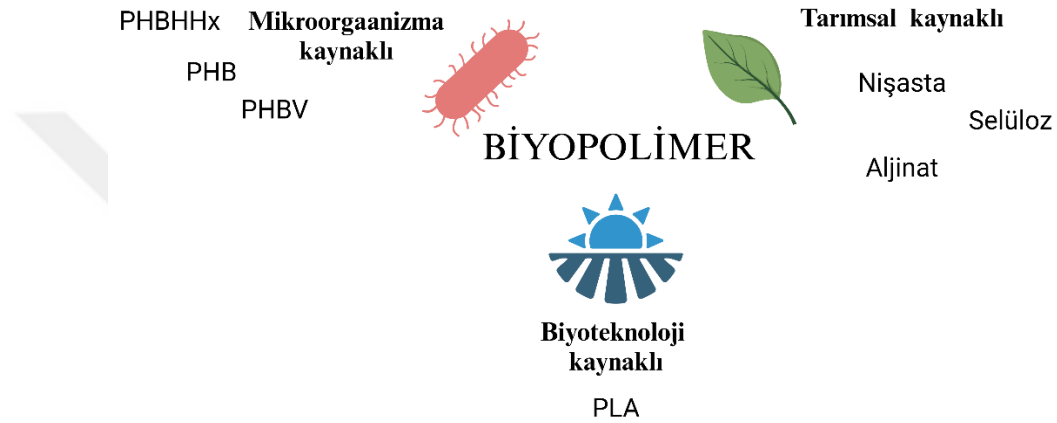
Doğal polimerler olarak da bilinen biyopolimerler, canlı organizmalardan üretilen organik bileşiklerdir. Bu polimerler polyester, peptit ve polisakkarit oluşturmak için kovalent bağları birlikte tutan monosakkarit, ester ya da aminoasitlerin tekrarlayan birimlerini içerir (Şekil 2.4.) (Gobi vd., 2021; Sharma vd., 2018).



Şekil 2.4. Biyopolimerlerin sınıflandırılması (Sharma vd., 2018)

Biyopolimerler başlıca 3 ana grupta karakterize edilir; 1) Nişasta gibi tarımsal kaynaklardan elde edilen biyopolimerler 2) PHA gibi mikrobiyal aktivitelerden elde edilen biyopolimerler 3) PLA gibi biyoteknoloji aracılığıyla elde edilen biyopolimerler, tarım bazlı biyopolimerler, polisakkaritler ve proteinler olarak kategorize edilebilir (Şekil

2.5.) (Zarrintaj vd., 2023). En iyi bilinen polisakaritler kitosan, aljinat, pektin, nişasta ve agarozdur (Zarrintaj vd., 2023). PHA'lar, mikrobiyolojik süreçlerle sentezlenen bir madde grubudur. Bakteriler, bol miktarda karbon ve azot kaynağı bulunan koşullarda, bu sitotoksik olmayan polyesterleri enerji depolama malzemesi olarak üretirler. Çoğu PHA, hidrofobiklik, optik izomerizm, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve biyoyumluluk gibi olumlu özellikler kazandıran özgün yapılara sahiptir. Bu doğal lineer polyesterler, özellikle ilaç taşıma uygulamaları açısından tıp alanında giderek artan bir ilgiyle karşılaşmaktadır (S.-Q. Zhang vd., 2025).



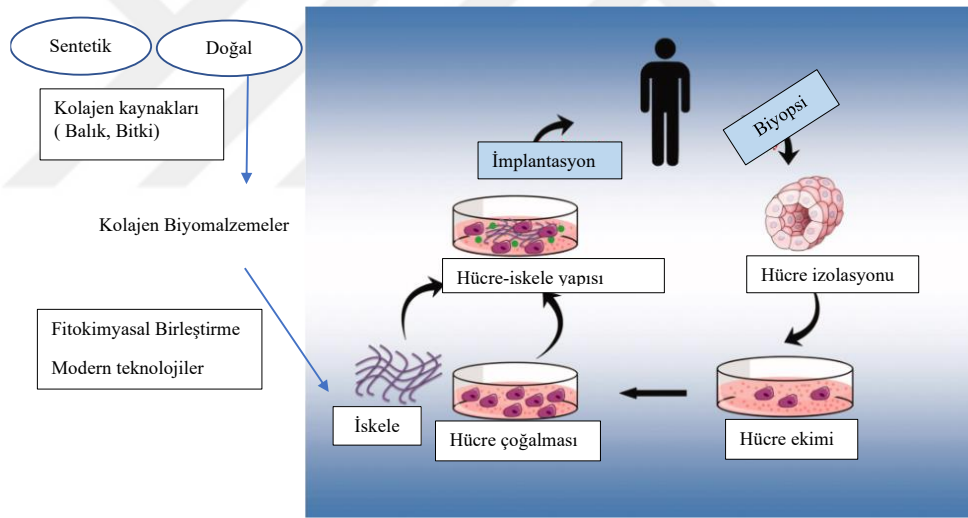
Şekil 2.5. Sentez kaynağı bakımından en yaygın olan biyopolimerlerin sınıflandırılması (Zarrintaj vd., 2023)

Biyopolimerlerin kaynağı hayvanlar, bitkiler, mikroorganizmalar ve bakterilerdir. Polivinilalkol (PVA) ve polietilen glikol (PEG) gibi sentetik polimerler, yeni polimerik malzemeler geliştirmek için doğal polimerler ile karıştırılabilmektedir. Bu şekilde polimerik materyaller gelişmiş biyolojik özellikler göstermektedir. Sentetik malzemelerle karşılaştırıldığında, bu polimerler biyoyumluluk, biyobozunurluk, geri dönüştürülebilirlik ve daha düşük antijenite gibi avantajlara sahiptir (Gobi vd., 2021). Doku mühendisliğinde genellikle tarım kaynaklı, mikroorganizma kaynaklı ve biyoteknolojiye dayalı biyopolimerler kullanılmaktadır. Bu biyopolimerlerin ortak özelliği biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir özellikte olmasıdır. Tarım kaynaklı biyopolimerlere nişasta, kitin, kitosan jelatin, aljinat, agaroz, selüloz, kolajen gibi biyopolimerler örnek verilebilir. En yaygın doğal polimer kolajendir. Dünyadaki en bol protein olduğundan hayvan veya bitkisel kökenlerden kolayca ekstrakte edilebilir.

Kolajen, hücre dışı matriks içinde en bol bulunan proteindir. Kolajen lifleri, düşük antijenite, iyi biyoyumluluk ve mükemmel biyolojik parçalanabilirlik özellikleri

taşıyan sağlam iskeleler oluşturur. Bu protein, normal yara iyileşme süreçlerinde önemli rol oynamakta olup, fibroblast oluşumunu destekler, endotel hücrelerin göçünü hızlandırır, pıhtılaşmayı tetikler ve nihai yara izinin oluşumuna katkıda bulunur. Ayrıca kolajen, antibiyotik ilaçlarla emprenye edilerek, ilaç taşınımı için etkili bir rezervuar işlevi görebilir (Borda vd., 2016).

Doku mühendisliği, dokular, implantlar ve protezler için biyolojik alternatiflerin oluşturulmasında tıp biliminde büyük önem kazanmaktadır. Biyolojik parçalanabilir ve biyoyumlu malzemeler kullanılarak doku yenilenmesi için birincil destekleyici yapılar oluşturulur. Doğal olarak meydana gelen kolajen, kitosan, laminin, hyaluronik asit vb. gibi iskele malzemeleri dokuların yenilenmesi için yaygın olarak kullanılır (Şekil 2.6.) (Sundar vd., 2021). Doku mühendisliğinde, iskelenin uygunluğu veya tasarımı aşağıdaki temel faktörlere göre belirlenir: Biyoyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, mekanik özellikler, iskele yapısı ve üretim teknolojisi.



Şekil 2.6. Doku mühendisliği (Sundar vd., 2021)

Doğal polimerler, sentetik polimerler gibi potansiyel malzemelerden iskele imal etmek için farklı üretim teknolojileri kullanılmaktadır. Birçok iskele, cilt dokusu mühendisliğinin uygulanması için tasarlanmış ve kendi avantajları ve dezavantajları olan sentetik ve doğal türevli polimerler kullanılarak üretilmiştir. Bu sorunların üstesinden gelmek için hem doğal olarak türetilmiş polimerler hem de biyolojik olarak parçalanabilen sentetik polimerler, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere birleşik iskeleler oluşturmak üzere birleştirilebilir. Bu hibritleştirilmiş ürünün,

kısıtlamalarının üstesinden gelmek için kendi avantajlarına sahip olması beklenir. (Tablo 2.1.)

**Tablo 2.1.** Sentetik-doğal polimerlerin avantaj ve dezavantajları (Sundar vd., 2021)

<b>Kaynaklar</b>	<b>Avantajlar</b>	<b>Dezavantajlar</b>
Sentetik ( PGA, PEG, PCL v.b.)	Yüksek mekanik dayanım	Vücutta doğal olarak oluşmaz.
	Kolayca tasarlanmış şekil ve boyut	Spesifik hücre etkileşimi eksikliği
	Kristallik	
	Kopolimer oranı	
	Üretilebilirlik kolaylığı	
	İşlenebilirlik	
	Biyoyumluluk	
	Sterilize edilebilirlik	
Doğal ( Aljinat, Kolajen, Elastin v.b. )	Spesifik hücre etkileşimi	Düşük mekanik dayanım
	Biyolojik olarak parçalanabilir	Bozunma periyodu değiştirilemez
	Toksik olmayan	
	Canlılardan türevlenmiş	
	Biyomalzeme olarak kullanılır.	

Kolajen iskeleleri, iyi biyolojik bozunabilirliğe, mükemmel biyoyumluluğa, düşük antijeniteye ve ayrıca değiştirilebilir fonksiyonel grupların mevcudiyetine sahiptir. Bu kolajen iskeleler yanıklarda, nöroplastik ve rekonstrüktif, oral, periferik sinir ve tendon ameliyatlarında, yara onarımı ve iyileşmesinde, sinir rejenerasyonunda kullanılır. Kolajen, doğal bir yara örtüsü olarak kullanılır ve eşsiz özelliklere sahiptir. Bakterilere karşı dirençlidir, yara örtüsü olarak kullanım için olumlu bir faktördür. O enfeksiyonla savaşma doğal yeteneği nedeniyle yaranın steril kalmasına yardımcı olur. Kolajenin ana kullanım alanları, ciddi yanık ve yaraları tedavi etmek için kullanılan sentetik deri alternatiflerinin üretilmesidir (Sundar vd., 2021).

Yara iyileşmesinin dört aşaması boyunca kolajen, bazı işlevler görür:

- Kılavuz işlevi: Kolajen lifleri, bir bağ dokusu matrisi boyunca göç ederken fibroblastları yönlendirmeye hizmet eder.
- Kemotaktik özellikler: Mevcut geniş yüzey alanı kolajen lifleri üzerinde fibrojenik hücreleri çekerek iyileşmeyi daha da etkinleştirir.
- Çekirdeklenme: Kolajen, belirli nötr tuz molekülleri varlığında, fibril yapının formuna sebep olan çekirdeklenme ajanı olarak davranır. Kolajen yara örtüsü,

yeni kolajen birikimini ve kılcal büyümeyi yönlendirmek için bir kılavuz görevi görebilir.

- Hemostatik özellikler: Trombositler hemostatik bir tıkaç oluşturmak için kolajen ile etkileşime girer (Sundar vd., 2021).

Mikroorganizma kaynaklı biyopolimerlere ise PHA çeşitleri (PHB ve PHB kopolimerleri) örnek olarak gösterilebilir. Biyoteknoloji aracılığıyla üretilen biyopolimerlere ise polilaktik asit gibi bakteriyel fermentasyon sonucu elde edilen birimleri kullanarak oluşturulan polimerler örnek verilebilir (Tablo 2.2.).

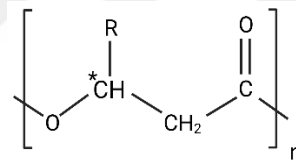
**Tablo 2.2.** Doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan başlıca biyopolimerlerin özellikleri ile birlikte sınıflandırma (Zarrintaj vd., 2023)

<b>Kaynak</b>	<b>Biyopolimer</b>	<b>Özellikler</b>
Tarım kaynaklı	Nişasta	Amiloz, amilopektin ve hidrofilik yapılardan meydana gelir.
	Kitin	Selülozdan sonra ikinci en çok bulunan polisakkarittir.
	Kitosan	Kitinin deasetile formudur. Biyoyumlu, biyobozunur bir polimerdir.
	Jelatin	Kolajen hidroliziyle elde edilir.
	Aljinat	Lineer bir polisakkarittir.
	Agaroz	Kırmızı algden elde edilir. Agarobiyoz tekrar üniteleri içerir.
	Selüloz	Tarım kaynaklı en çok bulunan polimerdir.
	Kolajen	Memelilerde çoğu bağ dokusunun elementidir.
Mikroorganizma kaynaklı	PHA'lar	Bakteriyel fermentasyon aracılığıyla sentezlenen polyester ailesindedir. En basit ve çok bilinen PHA çeşidi PHB'dir.
Biyoteknoloji kaynaklı	Polilaktik asit	Yenilenebilir kaynaklardan üretilen bakteriyel fermentasyonla oluşturulan laktik asit birimlerinden oluşan polyesterdir.

Çeşitli canlı organizmalar, nişasta, selüloz ve pektin gibi doğal polimerler üretir. Doğal polimerler, biyobozunurluk ve biyoyumluluk nedeniyle yanık ve yara örtüsü için rejeneratif terapötik sektörde yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyomedikal uygulamalarda en yaygın kullanılan doğal polimerler, polisakkaritler ve proteinlerdir. Bu polimerler yara örtüsü, yara iyileştirme ilaç taşınımı, organ nakli ve doku mühendisliği gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılır (Gobi vd., 2021).

### 2.2.1. Polihidroksialkanoatlar (PHA)

Yaklaşan fosil yakıt kriziyle birlikte, alternatif kimyasal/materyal kaynaklar insanlığın fosil yakıtlara bağımlılığını azaltmada önemlidir. Son yıllarda en umut verici biyolojik olarak parçalanabilen malzemelerden biri, neredeyse bütün bakterilerce üretilen /korunan polimerlerin polihidroksialkanoat (PHA) ailesi olarak bilinir (Dut, t.y.). PHA, mikroorganizmalar tarafından doğal olarak sentezlenen biyopolyesterlerin bir sınıfıdır. Fosil türevli ürünlere kıyasla maliyet açısından uygundur. PHA, biyoyumluluğu, biyobozunurluğu, kimyasal çeşitliliği ve yenilenebilir karbon kaynaklarından üretilmesinden dolayı araştırma konusu ve ticari anlamda ilgi çekmiştir (Tan vd., 2014). PHA birçok avantajından dolayı önemlidir. Benzersiz biyobozunurluk, biyoyumluluk kombinasyonu, kontrol edilebilir termal ve mekanik özellikler ve PHA moleküler ağırlık aralığı 10.000 Da – 1.000.000 Da olması en önemli avantajları arasındadır (S.-Q. Zhang vd., 2025). PHA'nın kimyasal yapısı, PHA bileşiğinin karbon sayısı ve isimlendirilmesi alkil R grupları tarafından belirlenir (Şekil 2.7.).



R grubu	Karbon numarası	PHA polimeri
metil	C <sub>4</sub>	Poli(3-hidroksibütirat)
etil	C <sub>5</sub>	Poli(3-hidroksivalerat)
propil	C <sub>6</sub>	Poli(3-hidroksiheksanoat)
bütil	C <sub>7</sub>	Poli(3-hidroksiheptanoat)
pentil	C <sub>8</sub>	Poli(3-hidroksioktanoat)
heksil	C <sub>9</sub>	Poli(3-hidroksinonanoat)
heptil	C <sub>10</sub>	Poli(3-hidroksidesanoat)
oktil	C <sub>11</sub>	Poli(3-hidroksiundesanoat)
nonil	C <sub>12</sub>	Poli(3-hidroksidodesanoat)
desil	C <sub>13</sub>	Poli(3-hidroksitridesanoat)
undesil	C <sub>14</sub>	Poli(3-hidroksitetradesanoat)
dodesil	C <sub>15</sub>	Poli(3-hidroksipentadesanoat)
tridesil	C <sub>16</sub>	Poli(3-hidroksiheksadesanoat)

Şekil 2.7. Polihidroksialkanoat (PHA) kimyasal yapısı (Tan vd., 2014)

PHA'ların üretiminde farklı karbon kaynakları kullanarak çalışılmış ve PHA çeşidinin karbon kaynaklarına bağlı olduğu anlaşılmıştır. Yaygın olarak kullanılan

karbon kaynakları 5 kategoriye ayrılır: Gazlar (Karbondioksit, Metan), Alkoller (Metanol, Etanol, Gliserol), Karbonhidratlar (Glukoz, Fruktoz, Sükroz, Maltoz, Laktoz, Nişasta, Selüloz), Alkonoik asitler (Asetik asit, Propiyonik asit, Bütirik asit, Valerik asit), Alkanlar (Heksan, Oktan). Geniş spektrumda karbon kaynakları olduğu için PHA en popüler biyoplastik olmuştur. PHA'lar karbon atom sayılarına dayalı kısa zincir uzunluğu (C3–C5) ve orta zincir uzunluğu (>C5) olmak üzere ikiye ayrılır (W. Zhou vd., 2023).

Alkil grubunun (R) boyutu, PHA'ların malzeme özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Kısa zincirli PHA'lar, metil ve etil grubu gibi küçük yan zincirler içermeleri nedeniyle yüksek kristallilik, yüksek elastikiyet modülü ve düşük kopma uzaması göstererek sert bir malzeme davranışı sergiler (W. Zhou vd., 2023). Orta zincir uzunluğuna sahip, büyük yan zincirli PHA'lar ise genellikle daha düşük kristallik, yüksek kopma uzaması ve düşük erime noktasına sahip elastik malzemelerdir. Birçok mikroorganizmada, zorlu koşullar altında hücre içindeki birikim gerçekleştirilir. Bu depolama çeşitleri arasında PHB, PHV, 3H2MV ve 3H2MB yer alır. Bu polimerler, genel olarak polihidroksialkanoat (PHA) olarak adlandırılmaktadır. (Karaca, 2018). PHB, en yaygın olan ve endüstriyel olarak ilk üretilen homopolimerik PHA'dır. Poli (3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV), poli (3-hidroksibütirat-ko-3hidroksiheksanoat) (PHBHHX) ve poli (-3-hidroksibütirat-ko-4-hidroksibütirat) (P3HB4HB) başlıca üretilen PHA kopolimerleridir (W. Zhou vd., 2023).

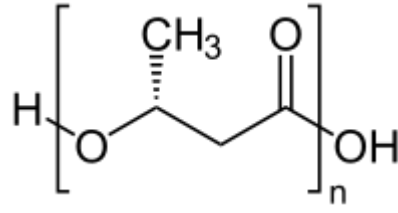
PHA üreten mikroorganizmalar, çeşitli karbon kaynaklarını kullanarak ortalama PHA üretimi gerçekleştirirler. Bu durum mikroorganizmanın türüne göre değişiklik gösterir. PHA biyobirikme özelliği, 70'den fazla bakteri ve arke cinsinde yaygındır. PHA üreten mikroorganizmalar anabolik ve katabolik yollarla sayısız karbonun bağlanmasını sağlar. Çeşitli karbon kaynakları PHA üretiminin çeşitlendirilmesinde önemli bir etmendir (Tablo 2.3.) (Tan vd., 2014).

**Tablo 2.3.** PHA üreticileri ve gerekli olan karbon kaynakları (W. Zhou vd., 2023)

Karbon kaynakları	Mikroorganizmalar	PHA çeşidi	İçerik (%)
Metan	<i>Methylosinus trichosporium</i>	PHB	51
	<i>Methylocystis parvus</i>	PHB	68
Karbondioksit	<i>Cupriavidus necator</i>	PHB	39.5
	<i>Paracoccus denitrificans</i>	PHB	57.3
Metanol	<i>Methylobacterium extorquens</i>	PHB	35
Gliserol	<i>Bacillus sp. ISTVK1</i>	PHBV	85.2
Asetat	<i>Cupriavidus necator H16</i>	PHB	29.2
Propiyonat		PHBV	29.3
Bütirat		PHB	31.9
Laktik asit		PHB	40.7
Valerat	<i>Wautersia eutropha NRRL</i>	PHBV	52.27
Sitrat		PHB	73.62
Süksinat		PHB	69.72
Heksanoat	<i>Rhodococcus sp. NCIMB</i>	PHBVHHX	25
Glikoz	<i>Haloferax mediterranei</i>	PHBHV	48.6
Fruktoz	<i>Schelegelella thermodepolymerans</i>	PHB	29.36
Laktoz		PHB	40.41
Sükroz	<i>Alcaligenes latus</i>	PHB	88
Selüloz	<i>Saccharophagus degradans</i>	PHB	17.42

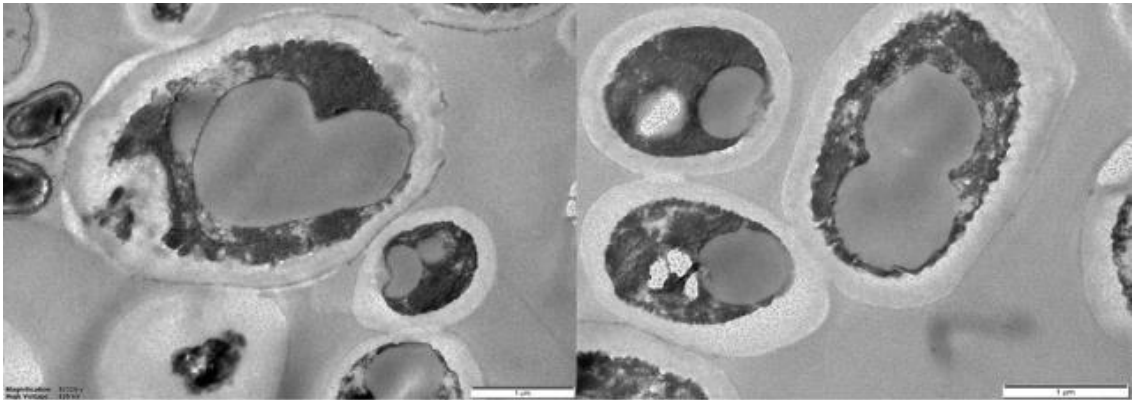
### 2.2.1.1. Polihidroksibütirat (PHB)

Polihidroksialkanoatlar (PHA) ailesi içerisinde, ilk keşfedilen ve literatürde en kapsamlı biçimde incelenen polimer, yüksek kristallik özelliğiyle dikkat çeken polihidroksibütirat (PHB)'tir. PHB, biyoyumluluğu açısından son derece elverişlidir; zira bu polimer ve türevleri, insan kanı ve dokularında doğal olarak bulunabilmektedir. Ayrıca, hücre metabolizmasının doğrudan ürünü olması, biyolojik sistemlerle olan etkileşimini daha da uygun hale getirmektedir (Volova vd., 2003). PHA grubu içerisinde çok sayıda varyasyon bulunmasına rağmen, PHB (poli-β-hidroksibütirat) en yaygın olarak kullanılan, en iyi karakterize edilen ve üzerinde en fazla bilimsel çalışma yürütülen tür konumundadır. Yüksek reaktiviteye sahip hidroksibütirik asit monomerlerinden oluşan PHB'nin polimer zincirinde, metil yan grubu içeren yapısal bir özellik mevcuttur. PHB'nin, Biyopol ismiyle bilinen ticari formunun kimyasal formülü  $(C_4H_6O_2)_n$  dir. Molekül ağırlığı  $6 \times 10^4$  - $200 \times 10^4$  Da aralığında değişmektedir (Dut, t.y.) (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. PHB'nin genel formülü (Dut, t.y.)

PHB'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri ise; suda çözünmez, neme dirençlidir. Oksijene karşı oldukça dayanıklıdır. Biyobozunur bir polimerdir. Biyoyumlu olma özelliğine sahiptir. Sadece dezavantaj oluşturabilecek özelliği ise petrol türevlerine göre maliyetli bir polimerdir (Dut, t.y.). PHB; birçok mikroorganizma tarafından zengin karbon kaynaklarıdır ancak N, P, S, O veya Mg gibi besinlerin kısıtlı olduğu koşullarda ve hücre içi ortamda enerji rezervi olarak biriken bir depolama maddesidir (Algur, 2018). PHB, karbon ve enerjinin prokaryotik depolama bileşikleridir (Sznajder, 2011). Bu polimerin temel karbon kaynakları glikoz ve nişasta gibi bileşiklerdir. Mikroorganizmalar gerekli enerjiyi elde etmek için PHB'yi metabolize eder ve ihtiyaçlar karşılanır. PHB, sitoplazmada hücre içi inklüzyonlar/granüller halinde bulunur. Bakterilerde biriken PHB'ler, faz kontrast mikroskopu ya da elektron mikroskopu ile görüntülenebilir (Şekil 2.9.) (Dut, t.y.). İlk olarak *Bacillus megaterium*'dan kloroformda ekstraksiyon yoluyla izole edilmiştir; bu granüller doğada kristaldir ve yüksek erime sıcaklığına sahiptir (Roohi vd., 2018) (Tablo 2.4.).



Şekil 2.9. *Priestia sp.* YH4'ün 30 °C'de MB ortamında 96 saatlik ekimden sonra optimize edilmiş koşullarda TEM görüntüsü ve PHB üretimi (Jung vd., 2023)

**Tablo 2.4.** Diğer biyobozunur biyopolimerlerle PHB'nin fiziksel özelliklerinin karşılaştırılması (Roohi vd., 2018).

Parametreler	PHB	PHBV	PP	PLA	PCL
Erime sıcaklığı (°C)	171 - 182	137 - 179	171 - 186	150 - 162	58 - 65
Camlaşma sıcaklığı (°C)	2 - 15	(-6) - 10	-10	45 - 60	(-65) - 60
Kristalleşme derecesi (%)	60	56	50-70	37	53.6
Çekme dayanımı ( $\sigma$ ) (MPa)	43	20	38	21-60	20.7 - 42
Yoğunluk ( $g/cm^3$ )	1.23 - 1.25	1.2	0.905	1.21 - 1.25	1.11 - 1.15
Kopma uzaması ( $\epsilon$ ) (%)	5	50	400	2.5 - 6	300 - 1000

### 2.2.1.2. Polihidroksibütirat (PHB)'in Mikroorganizmalar Tarafından Üretimi

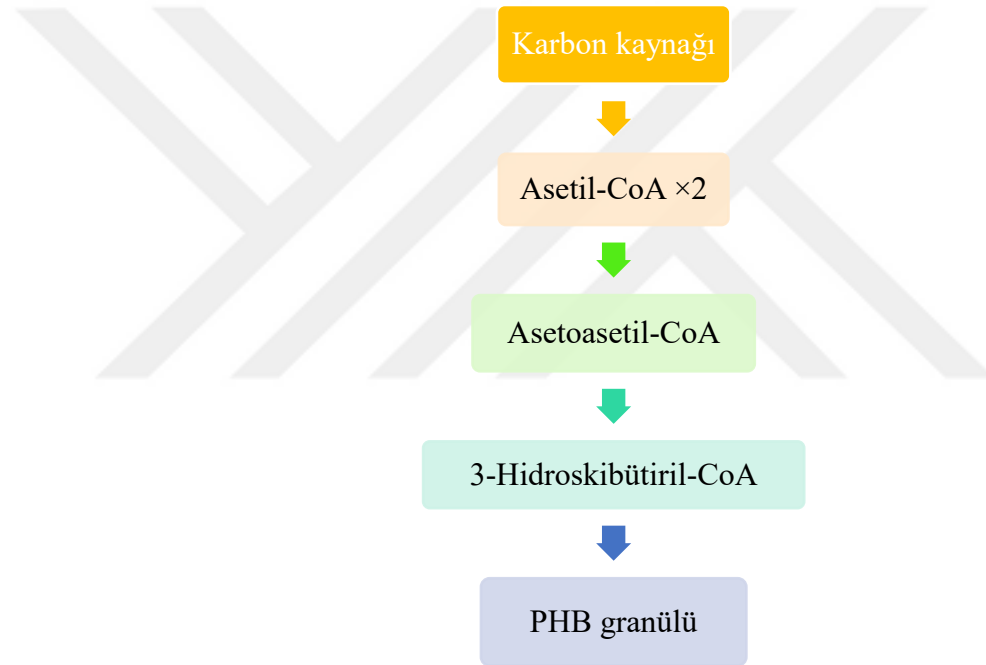
Canlı hücrelerde PHB sentezi genellikle glukozun substrat olarak kullanılmasıyla başlar ve çeşitli enzimlerin etkisiyle PHB polimeri sentezlenir. Biyobozunur polimerler, zamanla daha küçük moleküllere—oligomerler, dimerler ve monomerler—parçalanarak, nihayetinde karbondioksit ( $CO_2$ ) ve suya ( $H_2O$ ) mineralize edilir. Bu biyolojik ayrışma sürecinde *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Actinomyces*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Flavobacterium*, *Escherichia*, *Alcaligenes* ve *Comamonas* gibi bakteriler önemli görev üstlenmektedir. Öte yandan, biyolojik bozunma sürecinde aktif rol oynayan mantarlar arasında *Sporotrichum*, *Talaromyces*, *Phanerochaete*, *Ganoderma*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Paecilomyces*, *Thermomyces*, *Geotrichum*, *Cladosporium*, *Phlebia*, *Trametes*, *Candida*, *Penicillium*, *Chaetomium* ve *Aureobasidium* yer almaktadır (Roohi vd., 2018).

Pek çok mikroorganizma, fazla karbon ve azot, oksijen ve esansiyel elementler (N, P, S, Mg, K, Fe, vb.) gibi maddeler olmadan dengesiz büyüme koşullarında PHB üretir. PHB oluşumuna neden olan belirli besinler; Azot kaynağı eksikliği, karbon kaynağı fazlalığı, demir eksikliği, magnezyum eksikliği, manganez eksikliği, oksijen eksikliği, fosfat eksikliği, potasyum eksikliği, ağır metal eksikliğidir. PHB sentezleyebilen bakteriler iki ana gruba ayrılır. Birinci grup; N, P, Mg ve oksijen vb. kısıtlamaları ve karbon kaynağı fazlalığında PHB biriktirir. *Cupriavidus necator* ve *Bacillus thuringiensis* bu gruba aittir (Morlino vd., 2023).

PHB'nin degradasyonu PHB depolimeraz tarafından sağlanır. Yeni PHB sentezlemek için PHB monomerlerine parçalanır. PHB'nin monomeri olan 3-

hidroksibütirat elde edilir. Çeşitli endojen enzimlerle sırasıyla asetoasetat, asetoasetil CoA, 3- hidroksibütiril CoA ve son olarak polihidroksibütirat oluşumu gerçekleşir (Şekil 2.10.). Bakteriye aktarımından sonra bakteride PHB'nin granül halde deposu gerçekleşir (Uchino vd., 2007).

PHB üretiminde önem arz eden bazı türler Tablo 2.5.'de yer almaktadır. Bu türlerin karbon kaynaklarına bağlı olarak PHB üretim kapasiteleri birbirinden farklıdır. Her bakterinin kendi metabolizmasına uygun olarak kullandığı karbon çeşitleri farklı yüzdelerde PHB üretimine sebep olur. *Cupreavidus necator*, PHB üretme kapasiteleri hücrenin kuru ağırlığının yaklaşık %80'i kadar PHB üretir ve PHB üretiminde en çok çalışma yapılan türdür (L. Zhang vd., 2022).



Şekil 2.10. Genel PHB biyosentez yolu (Martínez vd., 2023)

*Methylobacterium organophilum* türü, glukozu karbon kaynağı olarak kullandığında hücre kuru ağırlığının yaklaşık %53'üne kadar, sükröz kullanıldığında ise yaklaşık %40'ına kadar polihidroksibütirat (PHB) sentezleyebilmektedir. PHB'nin ilk kez tanımlandığı mikroorganizma olan *Bacillus megaterium*, hücre kuru ağırlığının yaklaşık %46'sı oranında PHB üretim kapasitesine sahiptir. Bununla birlikte, *Pseudomonas stutzeri* ve *Azotobacter vinelandii* türlerinin ise hücre kuru ağırlıklarının %50 ila %70'i arasında değişen oranlarda PHB sentezleyebildikleri çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. (Algur, 2018).

**Tablo 2.5.** PHB üreten mikroorganizmalar ve kaynakları (Dut, t.y.)

<b>Bakteri</b>	<b>Karbon kaynağı</b>
<i>Alcaligenes latus</i>	Malt, soya atıkları, atık süt, sirke atıkları, susam yağı
<i>Bacillus cereus</i>	Glikoz, ε-kaprolakton, şeker pancarı melası
<i>Bacillus spp.</i>	Nutrient broth, glikoz, alkanoatlar, soya melası
<i>Burkholderia sacchari sp. nov.</i>	Adonitol, arabinoz, arabitol, selobiyoz, fruktoz, fukoz, laktoz, maltoz, melibiyoz, rafinoz, ramnoz, sorbitol, sukroz, trehaloz, ksilitol
<i>Burkholderia cepacia</i>	Palm olein, palm stearin, ham hurma yağı, hurma çekirdeği yağı, oleik asit, ksiloz, levulinik asit, şeker pancarı melası
<i>Caulobacter crescentus</i>	Caulobacter ortamı, glikoz
<i>Legionella pneumophila</i>	Nutrient broth
<i>Methylocystis sp.</i>	Metan
<i>Microtholunatus phosphovorius</i>	Glikoz, asetat
<i>Rhizobium meliloti, R. viciae, Bradyrhizobium japonicum</i>	Glikoz, sükroz, galaktoz, mannitol, trehaloz, ksiloz, rafinoz, maltoz, dekstroz, laktoz, piruvat, şeker pancarı pekmezi, peynir altı suyu
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Asetat, malat, fumarat, süksinat, propionat, malonat, glukonat, butirat, gliserol, sitrat
<i>Spirulina platensis (cyanobacterium)</i>	Karbondioksit
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Malt, soya atıkları, atık süt, sirke atıkları, susam yağı
<i>Cupriavidus necator</i>	Glukoz, sükroz, fruktoz, valerat, oktanoat, laktik asit, soya fasulyesi yağı

### 2.2.1.3. PHB'nin Biyoyuymumluluğu ve Biyolojik Parçalanabilirliği

PHB'nin nehirler, deniz suyu, toprak, çamur ve kompost gibi doğal ortamlarda biyobozunur olması, onu petrol türevi sentetik plastiklerden ayıran ve ticari değerini artıran en önemli özelliğidir. PHB'lerin biyolojik parçalanabilmesi için özel çevre koşulları gerekli değildir.

PHB'nin mikrobiyal degradasyonu hücre içi ve hücre dışı olarak gerçekleşir. İki farklı şekilde ortaya çıkar:

- Hücre içi lizisi üretici mikroorganizma tarafından gerçekleştirilir. Mikroorganizmalar bu parçalanmayı PHB granüllerine katabolize eder ve hücre içinde depolar. Böylelikle enerji ihtiyacını karşılar.

- Hücre dışındaki parçalanması ise; üretici mikroorganizma tarafından değil diğer mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir (Algur, 2018).

PHB, biyobozunur ve biyouyumlu özelliklere sahip olan PHA'lardan biridir. Biyomedikal alanlarda sıklıkla kullanılır (Wei vd., 2011). Olağanüstü biyobozunur ve biyolojik parçalanabilir özelliklerinden dolayı son zamanlarda daha çok dikkat çekmeye başlamıştır. PHB'lerin dezavantajı ise; maliyeti yüksek üretim imkanından dolayı geniş ölçekte kullanılmıyor olmasıdır (Z. Liu vd., 2025).

Lovera ve arkadaşları (Lovera vd., 2007) ise PHB/Polimer karışımıyla bu dezavantajın üstesinden gelmeyi amaçlamaktadırlar. Öncelikli olarak PHB ile bazı polimerleri (PEO, PLLA, PDLA, PCL) karıştırarak biyobozunur materyali elde etmeyi amaçlamışlardır. Özellikle PCL, biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olduğu da kanıtlanmış sentetik yarı kristalli lineer bir polyesterdir. Bunun yanı sıra PCL, çok çeşitli polimerlerle karışabilirlik sergiler, biçimlendirilebilir ve PHB'den önemli ölçüde daha düşük bir erime noktasına sahiptir. PCL ve PHB'nin bazı hücrel depolimerazlar tarafından hidrolitik olarak parçalanabileceği iyi bilinmektedir. PHB ve PCL'yi karıştırmakla her iki homopolimerin dezavantajlarının üstesinden gelmeye yardımcı olması amaçlanmaktadır (Lovera vd., 2007).

#### **2.2.1.4. Polihidroksibütirat (PHB)'ın Biyomedikal Uygulamaları**

Polihidroksibütirat (PHB), birçok bakteri türü tarafından kimyasal olarak üretilen doğal, biyolojik olarak parçalanabilen bir polimerdir. Biyobozunurluk, biyouyumluluk, kullanılabilirlik ve petrol bazlı termoplastiklerle karşılaştırılabilir fiziksel özellikler gibi birçok avantajı nedeniyle PHB, biyomedikal ve paketleme uygulamalarında potansiyel bir alternatiftir. Yüksek üretim maliyetleri, termal kararsızlık ve ikincil kristalleşme ve yavaş işleme nedeniyle zayıf mekanik özellikler gibi çeşitli fiziksel dezavantajlar, çekirdeklenme oranı, endüstriyel ve biyomedikal uygulamalarda geleneksel plastiklerle rekabetini sınırlar (Yeo vd., 2018).

Polihidroksialkanoatlar, tıp ve farmakoloji dahil olmak üzere çeşitli alanlarda uygulama için umut verici olan, doğal olarak meydana gelen, biyolojik açıdan parçalanabilen ve biyouyumlu polyesterlerin bir sınıfıdır. PHA'lar sınıfına dahil olan polihidroksibütirat (PHB) ise, mutlak biyouyumlulukları, yavaş biyolojik degradasyonları ve iyi mekanik dayanımları nedeniyle ortopedi için büyük ilgi görmektedir. PHA'ların PHB, PHB/PHV, PHB/PHHx gibi çeşitli kompozisyonları in

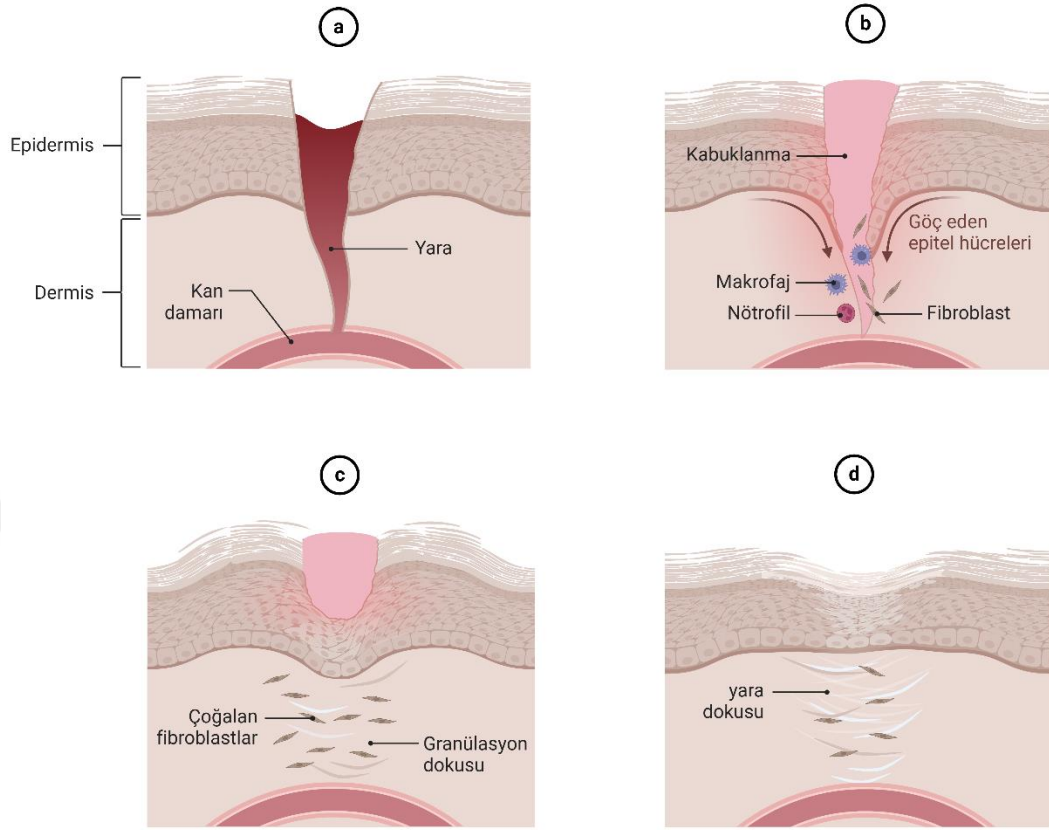
vitro ortamda osteojenik hücreleri kültüre için başarıyla kullanılmıştır. (Shishatskaya vd., 2006). PHB'nin gelecek vaat eden uygulama alanı, biyolojik olarak parçalanabilen kırıkta ve kemik vidaları ve plakaları, periodontal tedavi için biyolojik olarak parçalanabilen filmler, diş hekimliği, ortopedi, kranio-maksillofasiyal, herniyoplasti ve cilt cerrahisi için biyolojik olarak parçalanabilen cerrahi dikişler gibi implante tıbbi malzemelerin geliştirilmesidir.

PHB, modern farmakolojide PHB membranlarının farkında olan antiproliferatif ve antiinflamatuvar ilaçların sürekli olarak verilmesi için yeni sistemler oluşturmak için büyük bir potansiyel sunmaktadır. İlaç taşınımı, eş zamanlı difüzyon ve bozunma süreçleriyle gerçekleşir. İlaç taşınım hızı, ilacın doğasına, ilacı içeren PHB filmlerinin kalınlığına, ilacın polimere ağırlık oranına ve PHB'nin moleküler ağırlığına bağlıdır. PHB ayrıca PHB mikroküreleri ve mikrokapsülleri şeklinde sürekli ilaç taşınımı sunar. Suda çözünen ilaçlar, proteinler ve peptitler (hormonlar ve enzimler) ve nükleik asitler (DNA ve RNA plazmitleri) için geniş bir etki spektrumuna sahip kontrollü bir dağıtım sistemi oluştururlar (Roohi vd., 2018). PHB'nin yeni uygulamaları arasında dikişler, kemik iskeleleri, kalp kapakçıkları, iskelet miyotüp iskeleleri üretimi yer alır (Özgören vd., 2018). PHB'nin biyobozunur ve biyolojik olarak parçanabilir özelliği medikal materyallerde kullanılmasının sebeplerindedir.

### **2.3. Yara ve Yara İyileşmesi**

Deri, çevresel faktörlere karşı doğal bir bariyer görevi gören ve iç dokuları fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkilere karşı koruyan, insan vücudunun önemli, çok işlevli bir organıdır. Cilt hayati fonksiyonları yerine getirdiğinden, büyük ve derin yaralar gibi her türlü yapısal hasar sorun yaratabilir ve hızlı ve etkili tedavi gerektirebilir. Yanık, yara ve diyabetik yaraların tedavisinde cilt onarımı önemlidir. Uygun tedaviler yapılmadığında, cilt yaraları genellikle iltihabı uzatan, yeniden epitelizasyonu bozan, kolajen üretimini engelleyen ve yara iyileşmesini geciktiren bakteriyel enfeksiyona maruz kalır (Song vd., 2016). Yara, deride meydana gelen termal, fiziksel, mekanik ve elektriksel hasarlar sonucunda normal anatomik yapı ve işlevin bozulması olarak tanımlanabilir. Dışarıdan gelen zarar, alt dermisin üzerinde yüzeysel bir yaraya yol açabileceği gibi, dermis, epidermis ve hipodermise, hatta bazen ter bezlerine, kıl foliküllerine ve kan damarlarına kadar inen derin yaralara da neden olabilir. Yara iyileşme

süreci dört ana aşamadan oluşmaktadır: hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. Yara iyileşme aşamaları a) Hemostaz b) İnflamasyon c) Proliferasyon d) İyileşme (R. Wang vd., 2025)

### 2.3.1. Hemostaz Aşaması

Hemostaz, yaralanmaya anında verilen bir tepkidir ve kan kaybını durdurur. Aynı zamanda, anlık bir iskele tıkaçı oluşturarak yaralanmaya rağmen diğer organların işlevlerinin kesintisiz bir şekilde sürdürülmesine olanak tanır. Pıhtılaşma faktörlerinin salınımı, anlık iskele tıkaçının stabilitesini sağlamak amacıyla fibrin matrisinin birikimini teşvik eder. Bu tıkaç, ilerleyen aşamalarda fibroblastlar, lökositler, keratinositler ve endotelial hücrelerin gönderilmesi için uygun bir ortam oluşturur ve adeta bir büyüme faktörü deposu işlevi görür (Ambekar, 2019).

Trombositler yaralanmanın ilk aşamasında aktive olurlar ve agregasyon ile açığı kolajen yüzeylere bağlanmalarıyla hemostaz sürecinde pıhtı oluşumunda önemli bir rol üstlenirler. Trombositlerden salgılanan büyüme faktörleri arasında trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) yer alır. Bu faktörler, sürecin

ilerleyişini sağlamak için çeşitli sitokinlerle birlikte çalışır. Sitokinler, hedef hücrelerine endokrin, parakrin, otokrin veya intrakrin yollarla ulaşarak hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma, özel sinyal yollarını aktive eder ve sessiz durumda olan genlerin ifade edilmesini tetikler. Böylece, hedef hücrelerin yanıtlarını uyarabilirler. Örneğin, PDGF gibi bazı büyüme faktörleri sadece nötrofilleri ve makrofajları uyarmakla kalmaz, aynı zamanda fibroblastlar ve düz kas hücreleri için de mitojenik ve kemotaktik işlev görür. Bu nedenle, bir sitokin veya büyüme faktörü, farklı hedef hücreler ve reseptörler aracılığıyla birden fazla işlevi yerine getirebilir (Qing, 2017).

### 2.3.2. İnflamasyon Aşaması

İnflamasyon, yaralanmanın ardından 24-48 saat içinde çeşitli mediatörler ve kemotaktik faktörlerin aktive edilmesine yardımcı olur, bu süreç lökositlerin yaralanma bölgesine yönelmesini sağlar. İnflamasyon fazının tamamlanması için genellikle üç gün gereklidir. İnvazyonun tipik belirtileri, mast hücrelerinin histamin gibi enzimler içeren parçacıklar salmasıyla ortaya çıkar. Bu parçacıklar, kan damarlarının genişlemesine yol açar ve bu durum, nötrofillerin yaralı bölgeye etkin bir şekilde göç etmesine olanak tanır (Ambekar, 2019).

Kemokinler (veya kemotaktik sitokinler), belirli membrana bağlı reseptörlerle etkileşim kurarak kan dolaşımındaki inflamatuvar hücrelerinin yaralanma bölgelerine yönelmesini sağlayan küçük heparin bağlayıcı proteinlerdir. İlk inflamasyon evresinde, yani yaralanmadan 48 saat sonrasında, nötrofiller baskın hücre tipidir. Dolaşımdaki monositler, yara girerek yara iyileşmesinde kritik bir rol oynayan doku makrofajlarına dönüşmeden önce apoptozis süreciyle 24-36 saat içinde azalır. Bu süreçte, nötrofiller tarafından salınan ve makrofajlar ile diğer hücrelerin yara bölgesine çekilmesine yardımcı olan IL-8 kemokinleri önemli bir rol oynamaktadır. Kemokinler, dört korunmuş sistemin kalıntısının aralığı veya varlığına dayanarak CC, CXC, CX3C ve XC aileleri olarak sınıflandırılırlar. Özellikle CXC kemokinleri, öncelikle nötrofilleri ve lenfositleri çekme özelliğine sahiptir ve yara iyileşmesinin erken evrelerini düzenlediği düşünülmektedir (Zaja-Milatovic, 2011). Nötrofillerin ardından, monositler yara bölgesine doğru yönelir ve hem inflamatuvar evrede hem de iyileşme sürecinin her aşamasında önemli bir rol oynayan makrofajlara dönüşürler. Makrofajlar, atık maddeleri ve bakterileri fagosite ederken, aynı zamanda TNF, IL-6, IL-1 ve bFGF gibi inflamatuvar sitokinleri (büyüme

faktörleri dahil) üretir ve düzenlerler. IL-1, enflamatuar hücrelerin çoğalmasını teşvik ederken, endotel hücrelerin çoğalmasını destekleyerek anjiyogenezi artırır. TNF- $\alpha$ , fibroblastlar üzerinde mitojenik bir etkiye sahiptir. bFGF ise anjiyogenezi teşvik eden fibroblastlar, endotel hücreleri ve diğer mezenkimal hücreler için kemotaktik ve mitojenik bir faktör olarak öne çıkar. Buna ek olarak, bFGF yara kontraksiyonunu, epitelizasyonu ve kolajen, fibronektin ve proteoglikanların üretimini teşvik eder. Makrofajlar ayrıca yaralı dokuyu parçalamak ve yarayı temizlemek için kolajenazlar ve elastazlar salgırlar (Barrientos vd., 2008). Son yıllarda makrofajların aktivasyonu, uyarana bağlı olarak klasik M1 ve M2 durumları şeklinde sınıflandırılmaktadır. M1 aktivasyonu, Toll benzeri reseptör (TLR)-4 ligandları ve IFN- $\gamma$  tarafından tetiklenir ve bu, belirgin bir pro-inflamatuar makrofaj fenotipi ile sonuçlanır. Öte yandan, M2 aktivasyonu, makrofaj kaynaklı büyüme faktörlerini salgılayan IL-4 ve/veya IL-13 tarafından yönlendirilir; bu durum, alternatif (M2) aktivasyona sahip makrofajların yara iyileşmesi sürecinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. (Qing, 2017).

### 2.3.3. Proliferasyon

Proliferasyon aşaması, anjiyogenez, granülasyon dokusu oluşumu, yeniden epitelizasyon ve yara kontraksiyonu gibi çeşitli alt aşamalar aracılığıyla anlık iskele tıkcısının kalıcı doku tıkcısına dönüşümüne katkıda bulunur. Bu süreçte inflamatuvar hücreler fibroblastları çekmek amacıyla TGF- $\beta$  ve PDGF adlı bileşenleri salgırlar. Bu salgırların etkisiyle, fibroblast ve miyofibroblastların göçü başlangıç aşamasını tetikler. Yedi gün sonrasında, yoğun bir ekstraselüler matris birikimi, hücrelerin göçünü daha da destekler. Kolajenler, tüm yara iyileşme aşamaları için temel yapısal protein olmanın yanı sıra, özellikle proliferasyon aşamasında önemli bir rol oynar (Ambekar, 2019).

PDGF, FGF, VEGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  ve KGF gibi makrofajlar tarafından üretilen büyüme faktörlerine yanıt olarak, granülasyon dokusunun önemli bir parçası olan fibroblastlar, göç etmeye, çoğalmaya ve glikozaminoglikanlar ile proteoglikanlar gibi ECM bileşenlerini üretmeye başlarlar. Bu aşamada, kolajen üretimi, yara iyileşmesinin kritik bir unsuru olarak öne çıkar. Kolajen, prokolajen formunda hücre dışı alana salındıktan sonra, terminal segmentleri olan tropokollajene dönüşür. Tropokollajen, diğer tropokollajen molekülleriyle birleşerek, hidroksilizin ve hidroksiprolin açısından zengin kollajen filamentlerini oluşturur; bu da güçlü çapraz bağlar kurulmasına yardımcı olur. Kolajen liflerinin stabilitesi, moleküller arası çapraz bağların varlığına dayanır ve bu

bağların sayısı ne kadar fazla olursa yara iyileşme potansiyeli de o denli artar. Sonuç olarak, kolajen, diğer kolajen molekülleri ve proteinlerle sıkı çapraz bağlar oluşturarak iyileşen yaranın gerilme mukavemetini artırır. Ayrıca, prolin ve lizin kalıntılarının hidroksilasyonu, oksijen, C vitamini, demir ve  $\alpha$ -ketoglutarat gibi bileşenlerin mevcudiyetine bağlıdır. Kolajen lifleri, bazı yara iyileşmelerinde miyofibroblastların göçü sırasında bir çapa işlevi gören fibronektin yapısı içinde birikir (Qing, 2017).

#### **2.3.4. Yeniden modelleme**

Yeniden modelleme, yaralanmanın ikinci haftasından itibaren başlayan ve bir yıldan fazla sürebilen yara iyileşmesinin son aşamasıdır. İnflamasyon ve proliferasyon aşamalarında başlatılan tüm süreçler, yeniden şekillenme aşamasında tamamlanır. Öte yandan, ter bezleri ve kıl folikülleri ciddi yara hasarından sonra iyileşme yeteneğine sahip değildir. Makrofajlar, anjiyogenez sürecinde ve dokuların yeniden şekillenme aşamasında, hücre dışı matrisin (ECM) bileşimini değiştirerek önemli bir rol oynar. Bu süreçte, parçalayıcı enzimlerin salınımı ve ECM moleküllerinin sentezlenmesi aracılığıyla hem doğrudan hem de dolaylı olarak bağ, endotel ve epitel dokularının çoğalmasını teşvik edebilirler. Makrofajlar, endotel hücreleri ve miyofibroblastlar, yara bölgesini terk eder veya kalan hücreler apoptoz sürecine girer (Z. Liu vd., 2025).

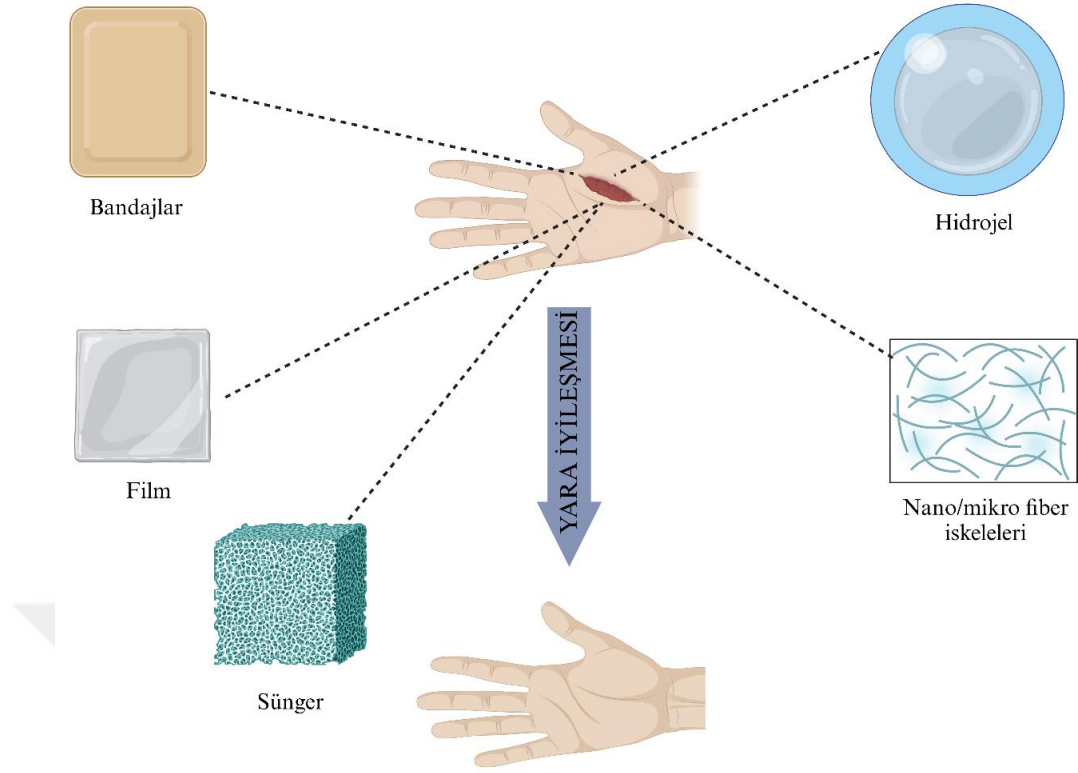
Endotelyal progenitör hücreler (EPC'ler) hem hematopoetik kök hücrelerin (CD34 ve CD133) hem de endotelyal hücrelerin (CD146, vWF ve VEGFR2) belirteçlerini ifade eder, bu da revaskülarizasyonun EPC'lerin kemik iliğinden yenilenen veya iyileşen doku alanlarına mobilizasyonuna dayandığını bilmemize yardımcı olur. EPC'ler endotel hücrelerinin bakımı ve onarımı için kritik öneme sahiptir. Çoğaldıkları, göç ettikleri ve farklılaştıkları için anjiyogenezde önemli bir rol oynarlar ve proanjiyojenik sitokinler için bir kaynak oluştururlar. Normal yara iyileşmesi sırasında, EPC'ler yeniden şekillenen mikrosirkülasyona etkili bir şekilde dahil edilir, böylece yara revaskülarizasyonuna ve zamanında iyileşmeye yol açar. Bu nedenle, yara iyileşmesinde birçok progenitör hücre de çok önemli roller oynamaktadır (Qing, 2017).

#### **2.4. Yara Örtüsü**

Yaralanma sonrasında cilt fonksiyonunu yeniden sağlamak ve yara iyileşmesini kolaylaştırmak için doku mühendisliği kavramı ortaya çıkmaktadır. Bu kavram, biyolojik

olarak parçalanabilen ve biyouyumlu malzemelerin sıklıkla doku yenilenmesi için ana iskeleyi oluşturmak üzere kullanıldığı bir alandır. Son yıllarda biyolojik sistemlerin biyomalzemelerin yüzey mimarisi ile etkileşimini incelemek için birçok girişimde bulunulmuştur. Yıllar geçtikçe, doku yenilenmesini geliştirmek ve doğal biyolojik sistemi taklit etmek için birçok modifikasyon stratejisi ve biyomalzemelerin entegrasyonu uygulamaya konulmuştur. Günümüzde, yaraları yalnızca kapatmakla kalmıyor, aynı zamanda yara örtüleri sayesinde yara iyileşme sürecini hızlandırarak cilt daha etkili bir şekilde desteklenmiştir (Borda vd., 2016). Yarayı kurumaktan ve enfeksiyondan koruyan, iyileşme sürecini kolaylaştıran modern yara örtülerinin tasarımında önemli ilerlemeler kaydedilmektedir. Hidrojeller, hidrokolloidler, süngerler, aljinatlar ve şeffaf filmler formundaki yara örtüleri geliştirilmiştir ve bazıları ticari olarak mevcuttur. Bu malzemeler hidrofobiklik, geçirgenlik ve adsorbsiyon kapasitesi gibi kendilerine özgü özellikleri bakımından farklılık gösterir.

İdeal bir yara örtüsü, yarayı zararlı dış etkenlerden izole etmeli, yara yüzeyindeki salguları absorbe etmeli, yaralanan bölgeyi bakteriyel enfeksiyondan korumalı, antiinflamatuvar bir ajan olarak görev yapmalı ve hücre çoğalmasını uyararak doku yenilenmesini kolaylaştırmalı ve iyileşme sürecini hızlandırmalıdır. Yara örtüsü malzemesi yumuşak, biyolojik olarak uyumlu, toksik olmayan ve alerjik olmayan şekilde olmalıdır. Çok fonksiyonlu yara pansumanlarının kullanılmasıyla etkili iyileşme süreci hızlandırılır. Fonksiyonel bir yara örtüsü planlanırken yaranın tipi ve özellikleri, iyileşme süresi ve yara örtüsünün kimyasal, fiziksel ve mekanik özellikleri dikkate alınmalıdır (Azimi vd., 2020). Yara iyileştirici fonksiyonunda çeşitli yara örtüleri vardır. Bandaj, gözenekli sünger yapısında nano/mikro jel, hidrojel ve doğal veya sentetik polimerlerden oluşan nano/mikro fiber iskeleleri örnek verilebilir. Yara üzerine çeşitli amaçlara bağlı olarak uygulanmaktadır (Şekil 2.12.)(Ambekar, 2019).



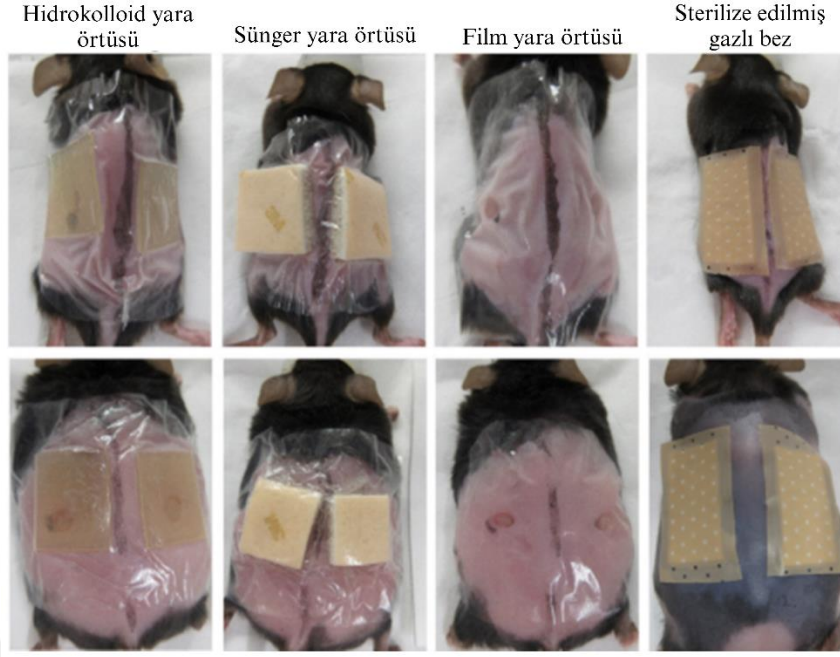
Şekil 2.12. Yara iyileşmesi

#### 2.4.1. Geleneksel Yara Örtüleri

Geleneksel yara pansuman ürünleri arasında, birincil veya ikincil pansuman olarak kullanılan malzemeler yer almaktadır. Bu ürünler arasında gazlı bez, tiftik, plasterler, doğal ve sentetik bandajlar ile pamuk yünü bulunur. Gazlı bezler, dokuma ve dokuma olmayan pamuk, suni ipek ve polyester liflerinden üretilmektedir. Ucuz ve kolayca temin edilebilen bu sargılar, yara drenajına destek sağlamak amacıyla birçok yarada kullanılabilir de, zamanla kuruduklarında yaraya yapışarak travmatik ve acı verici bir şekilde çıkarılmalarına yol açabilirler (Borda vd., 2016).

#### 2.4.2. Modern Yara Örtüleri

Modern pansumanlar, yaranın etrafında nemli bir ortam oluşturarak iyileşme sürecini kolaylaştırmada geleneksel pansumanlardan oldukça farklı bir yaklaşım sunar. Bu pansumanlar, sentetik ve doğal polimerlere dayanmakta olup, temel olarak hidrokolloid, aljinat, hidrojel, film ve sünger gibi kategorilere ayrılır (Şekil 2.13.) (Borda vd., 2016).



Şekil 2.13. Modern Yara Örtüsü Çeşitleri (Mukai, 2024)

#### 2.4.2.1. Hidrokolloid Yara Örtüleri

Hidrokolloid yara örtüleri, tarihsel olarak en yaygın kullanılan ve en etkili yara tedavi yöntemlerinden biridir. Bu örtüler, iç kısımda kolloidal bir katman ve dış kısımda su geçirmeyen bir katman olmak üzere iki katmandan oluşur. Karboksimetilselüloz, jelatin ve pektin gibi jel yapıcı maddelerle birlikte, elastomerler ve yapıştırıcılar gibi farklı bileşenleri içermektedirler. Pansuman, yara eksüdasıyla temas ettiğinde hidrokolloidler sıvıyı hapseder ve koruyucu bir jel tabakası oluşturur. Emici özellikleri sayesinde suyu geçirebilmelerine rağmen, bakteriler için oldukça az geçirgendirler. Sargı altında oluşan nemli ortam, kolajen sentezini ve fibroblast çoğalmasını artırarak hızlı bir epitelizasyon sürecini destekler ve böylece yara iyileşmesini teşvik eder (Borda vd., 2016).

#### 2.4.2.2. Hidrojel Yara Örtüleri

Hidrojel, metakrilatlar ve polivinil pirolidin gibi sentetik polimerlerden üretilen, %70-90 su içeriğine sahip ve çözünmeyen bir malzemedir. Bu polimerik bileşenler, suyu hapsedecek şekilde çapraz bağlanmıştır. Yüksek su içeriği, granülasyon dokusunu ve epiteli nemli bir ortamda tutarak, kauçuksu bir doku sunar. Düşük arayüzey gerilimi, hidrojinin büyük bir biyouyumluluğa sahip olmasını sağlar; bu da tahriş edici olmayan ve

komşu bölgelerdeki iltihabi reaksiyonların en aza indirilmesine yardımcı olur. Ayrıca, hidrojel yara örtüleri, yumuşak elastik özellikleri sayesinde yaranın rahatsızlık vermeden iyileşmesini sağlar. Böylece, hem uygulama hem de çıkarma aşamalarında kolaylık sunar (Şekil 2.14.) (Borda vd., 2016).



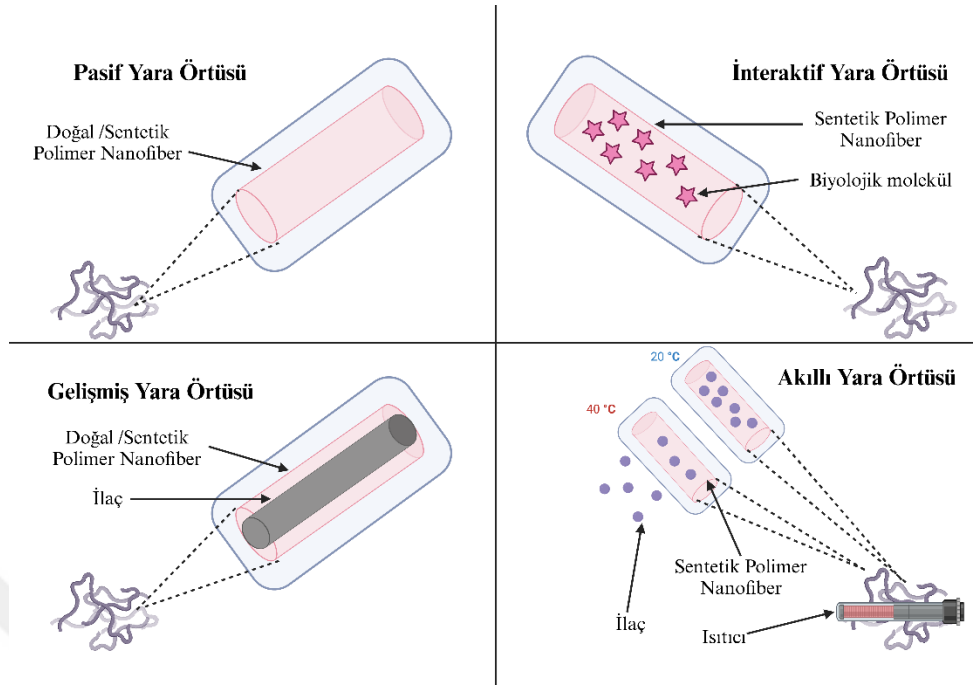
Şekil 2.14. Hidrojel Yara Örtüsü (Sun vd., 2025)

#### 2.4.2.3. Yarı Geçirgen Sünger Yara Örtüleri

Sünger yara örtüleri, hidrofilik ve hidrofobik özelliklere sahip, yapışkan kenarları olan veya olmayan gözenekli poliüretan süngerlerden üretilmektedir. Dış katman, hidrofobik özellikleri sayesinde sıvıyı geçirmemekte, ancak açık gözenek yapısı sayesinde O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ve su buharı alışverişine olanak tanımaktadır. Bu köpük sargılar, yüksek emicilik kapasitesine (bu, köpüğün dokusu, kalınlığı ve gözenek boyutuna bağlı olarak değişir) sahip olmalarının yanı sıra, yastıklayıcı ve koruyucu özellikler de sunmaktadır. Ayrıca, mükemmel bir ısı yalıtımı sağlaması ve nemli bir ortam oluşturması ile dikkat çekmektedir. Vücut yüzeylerine de iyi bir uyum gösterirler (Borda vd., 2016).

#### 2.4.2.4. Biyoaktif Yara Örtüleri

Bu yara örtüleri, yara iyileşme sürecinde önemli rol oynayan biyomalzemelerden üretilmiştir. Biyouyumlulukları, toksik olmamaları ve biyolojik olarak parçalanabilirlikleri ile öne çıkarlar. Ayrıca, kolajen, hyaluronik asit, kitosan, aljinat ve elastin gibi hem doğal hem de yapay kaynaklardan türetilmektedirler. Bu polimerler, yaranın türüne bağlı olarak tek başlarına ya da çeşitli kombinasyonlar halinde kullanılabilir. Bazı durumlarda, bu pansumanlar büyüme faktörleri ve antimikrobiallerle birleştirilerek daha etkili hale getirilebilir (Ambekar, 2019). Biyoaktif yara örtüleri pasif yara örtüsü, interaktif yara örtüsü, gelişmiş yara örtüsü, akıllı yara örtüsü olmak üzere kategorize edilir (Şekil 2.15.).



Şekil 2.15. Yara örtüsü çeşitleri (Ambekar, 2019)

Pasif yara örtüsü, gözenekli yapıları sayesinde oksijen geçirgenlik sağlayarak yara iyileşmesi için uygun bir ortam oluşturan lif yapıları pasif yara örtüsü olarak adlandırılır. Pasif yara örtüsü, doğal polimerlerin yanı sıra sentetik polimerler kullanılarak da üretilir ve en çok uygun ortam ve mekanik hasardan korunma gerektiren yaralar için popülerdir. Uppal ve arkadaşları, uygulanan voltaj, mesafe ve akış hızı gibi elektroörgirme parametrelerinin hyaluronik asit çapı üzerindeki etkisini incelemek için hyaluronik asidi elektroörgirmiş ve ayrıca hyaluronik asidin hava geçirgenliğinin vazelinli gazlı bezden daha fazla olduğunu bulmuştur (Uppal vd., 2011).

İnteraktif yara örtüsü, sadece uygun ortam sağlamakla kalmayıp aynı zamanda bakteri üremesinin kontrolüne de yardımcı olan yara örtüleri interaktif yara örtüsü olarak adlandırılır. İnteraktif yara örtüsü, biyolojik olmayan polimer (sentetik polimer) ve biyolojik molekülün sırasıyla işleme kolaylığı, anti-bakteriyel özellik ve yara bölgesi afinitesi nedeniyle kombinasyondur. İmmünojenik reaksiyonlar ve safsızlık olasılığı, sargının kapsamını kısıtlamaktadır. Liu ve arkadaşları 250 nm çapındaki polilaktid-poliglikolid (PLGA)/kolajen nanolifi incelemiş ve PLGA/kolajen nanoliflerin insan fibroblastına karşı mükemmel bir afiniteye sahip olduğunu ve bunun ilk aşamada yara iyileşmesini hızlandırmak için faydalı olduğunu bulmuşlardır (Liu vd., 2010).

Gelişmiş yara örtüsü, ilaç yüklü nanofiber, bakteriyel enfeksiyonu tedavi edebilen gelişmiş interaktif yara örtüsünün bir parçasıdır. İlacın dahil edilebildiği üç tip nanolif vardır: İlaç yüklü tek eksenli elektroğrılmış nanolifler, İlaç yüklü çift eksenli elektroğrılmış nanolifler, İlaç yüklü üç eksenli elektroğrılmış nanolifler. Son yıllarda, ilaç yüklü nanolifler en yaygın olarak çekirdek/kabuk yapısından oluşan koaksiyel elektroğirme tekniği ile üretilmiştir. Çekirdek ilaç içerirken, kabuk polimer matris içerir (Ambekar, 2019).

Akıllı yara örtüsü, birden fazla işlevi yerine getirme yeteneğinin yanı sıra, akıllı sensörler aracılığıyla gerçek zamanlı izleme imkânı sunarak etkili bir tedavi sağlar. Bu sensörler, yara iyileşme sürecini takip etmede önemli bir rol oynamaktadır. Schueren ve arkadaşları, nitrazin sarısı ile işlevselleştirdikleri PCL/chitosan nanofiberlerin yara iyileşmesindeki potansiyel uygulamalarını ortaya koymuşlardır (Van Der Schueren vd., 2013). Tamayol ve ekibi ise, isteğe bağlı ilaç taşınımı sağlayabilen ısıya duyarlı nanofiber ağlar geliştirmiş ve bu ağ üzerine yerleştirilen biyolojik olarak parçalanabilir metalik ısıtıcılar tarafından uyarılan ilaçlar sayesinde etkili bir tedavi süreci gerçekleştirmiştir (Tamayol vd., 2017).

## **2.5. İskele Üretimi İçin Üretim Teknolojileri**

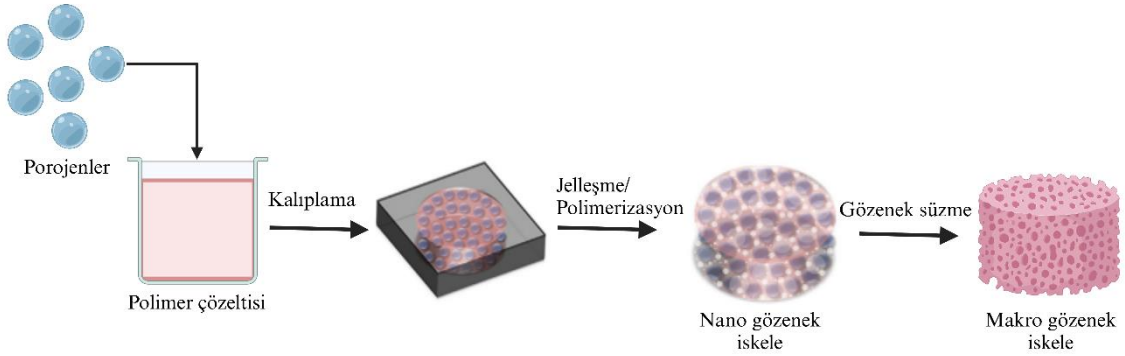
Biyopolimer tabanlı yapı iskeleleri farklı yöntemler kullanılarak geliştirilmiştir. Solvent dökümü ve partikül süzülmesi, termal olarak indüklenen faz ayrımı, emülsiyon dondurma, elektroğirme, ve hızlı prototipleme gibi en popüler teknikler bulunmaktadır (Park vd., 2017).

### **2.5.1. Solvent dökümü ve partikül süzme tekniği**

Solvent dökümü ve partikül süzme, gözenekli iskelelerin oluşturulmasında yaygın olarak kullanılan etkili bir yöntemdir. Bu metot, polimer partiküllerinin uygun bir çözücü içerisinde tamamen çözülmesini ve ardından boşluk oluşturmak amacıyla tuz, şeker veya parafin küreleri gibi parçacıklarla birleştirilmesini içerir. Elde edilen karışım, istenilen iskele geometrisine uygun bir kalıba dökülür; zamanla çözücü buharlaşarak geride dağılmış partiküllerden oluşan bir iskele yapısı bırakır. Boşlukların boyutu, kullanılan parçacıkların türüne bağlıdır ve yapılarına göre bu parçacıkların çıkarılması için bir sıvı

kullanılabilir. Bu yöntem, %90'a kadar gözeneklilik sağlayabilmesi bakımından dikkat çekmektedir ve boşluk boyutlarıyla doğrudan ilişkilidir.

Solvent dökümü ve partikül süzme, özel ekipman gerektirmeyen basit ve maliyet etkin bir tekniktir. Ayrıca, çeşitli biyolojik olarak parçalanabilen polimerler ve seramiklerle bir arada kullanılabilir, bu da belirli doku mühendisliği uygulamalarına uygun özel mekanik özelliklere ve bozunma oranlarına sahip iskelelerin üretilmesine olanak tanır (Z. Zhou vd., 2024). Ancak, bu tekniğin bazı sınırlamaları vardır. Yalnızca işlemede kullanılan tuz parçacıklarını geride bırakan yoğun bir yüzey tabakasına sahip ince filmler üretebilir. Tüm porojenik parçacıkların filtrasyonu, solventte uzun süre bekletmeyi gerektirir. Bu işlem gözenekli yapının mekanik özelliklerine zarar verebilir. Bazen iskelelerdeki çözücü kalıntıları dokulara ve proteinlere zarar verebilir. Organik çözücülerin toksik etkilerini ortadan kaldırmak için gaz köpürtme ile oldukça gözenekli biyopolimer köpükler üretilebilir (Arif vd., 2023). Bu teknik, travmatik yaralanmalar veya kemik hastalıklarından kaynaklanan kemik defektlerinin tedavisinde potansiyel uygulamalar sunmaktadır (Şekil 2.16.).

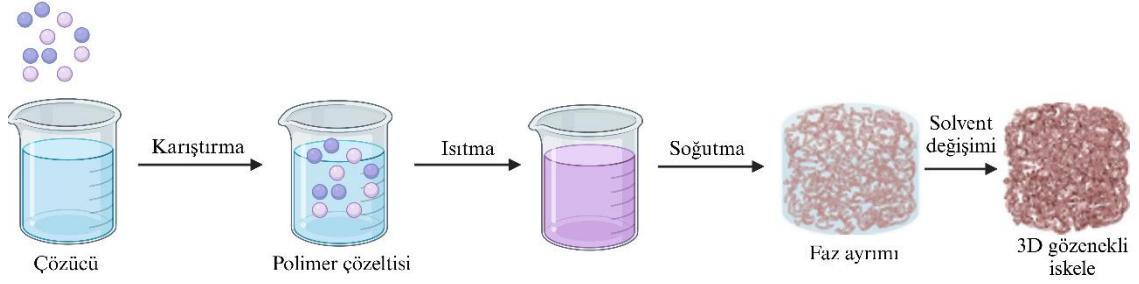


Şekil 2.16. Solvent dökümü ve partikül süzme tekniği (Sola vd., 2019)

### 2.5.2. Termal olarak indüklenen faz ayrımı tekniği

Süblimasyonla indüklenen faz ayrıştırma (SIPS) tekniği, membran ve iskelelerin üretiminde yaygınlaştıran bir yöntemdir. Bu süreç, bir polimerin yüksek sıcaklıklarda belirli bir çözücü içinde çözünmesini ve ardından hızlı bir şekilde soğutulmasını içerir. Çözücünün donması sonucunda oluşan katı faz süblimleşerek gözeneklilik meydana getirir (Şekil 2.17.). Ortaya çıkan iskele yapısı, polimer türü, çözücü, çözelti konsantrasyonu ve faz ayırma sıcaklığı gibi çeşitli

faktörlerden etkilenmektedir (Zhou vd., 2024). Bu işlemin sonunda, polimer açısından zengin faz katılır ve polimer açısından zayıf faz uzaklaştırılarak oldukça gözenekli bir polimer ağı oluşturulur. Solvent genellikle süblimasyon, liyofilizasyon veya özütleme ile çıkarılır ve mikro gözenekli bir destek yapısı elde edilir (Arif vd., 2023).



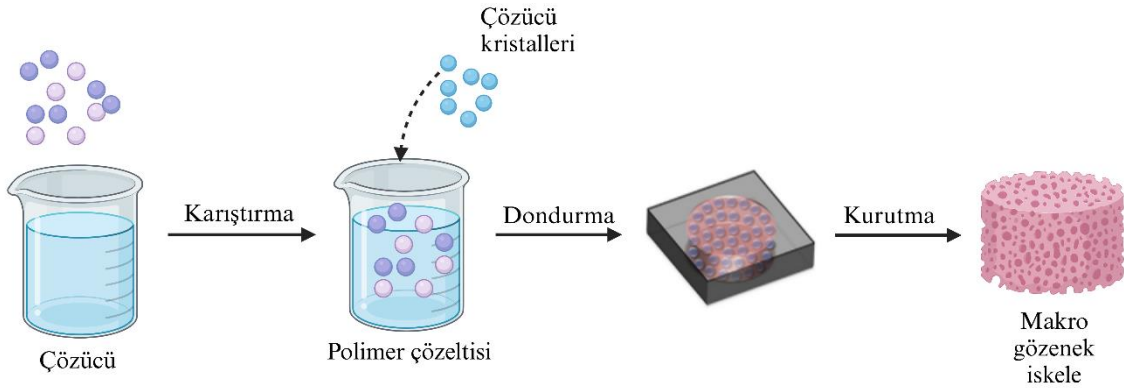
Şekil 2.17. Termal olarak indüklenen faz ayrımı tekniği (Conoscenti vd., 2017)

### 2.5.3. Emülsiyon dondurarak kurutma tekniği

Emülsiyon dondurarak kurutma tekniği, kemik doku mühendisliği uygulamalarında büyük gözenekliliğe ve birbirine bağlı gözeneklere sahip kalın iskeleler üretmek için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. Bu teknik, polimer, çözücü ve su kullanılarak bir emülsiyon oluşturulmasını ve ardından bunun dondurularak kurutulmasını içerir. Yağ içinde homojen bir su emülsiyonu üretmek için bir poliglikolik asit ve metilen klorür çözeltisine ultra saf su eklenebilir. Bu emülsiyon daha sonra sıvı nitrojen içinde dondurularak çözücünün buharlaşmasına ve gözenekli bir yapı oluşturmasına neden olur (Z. Zhou vd., 2024).

Soğutma aşamasında, polimer solüsyonu tüm malzemelerin donduğu bir sıcaklığa soğutulur. Bu, çözücüde polimer moleküllerini boşluklarda birleşmeye zorlayan buz kristallerinin oluşumuna neden olur. İkinci adımda, çözücü donmuş çözücünün denge buhar basıncından daha düşük bir basınç kullanılarak uzaklaştırılır. Çözücünün tamamen süblimleşmesi, birbirine bağlı gözenekli bir mikro yapıya sahip kuru bir polimer çerçeve ile sonuçlanır (Şekil 2.18.). Bu teknik ile %90'a kadar gözenekliliğe, çeşitli bağlantılara ve 200 mikrometreye kadar gözenek boyutlarına sahip iskeleler elde etmek mümkündür. Polimer konsantrasyonunu, donma süresini ve donma sıcaklığını ayarlayarak köpüklerin gözenek boyutunu, gözenekliliğini ve bağlanma derecesini kontrol etmek mümkündür.

Bu teknikle üretilen iskelelerin kalitesi, emülsiyon içindeki sulu fazın çözücüye oranına bağlıdır (Arif vd., 2023).

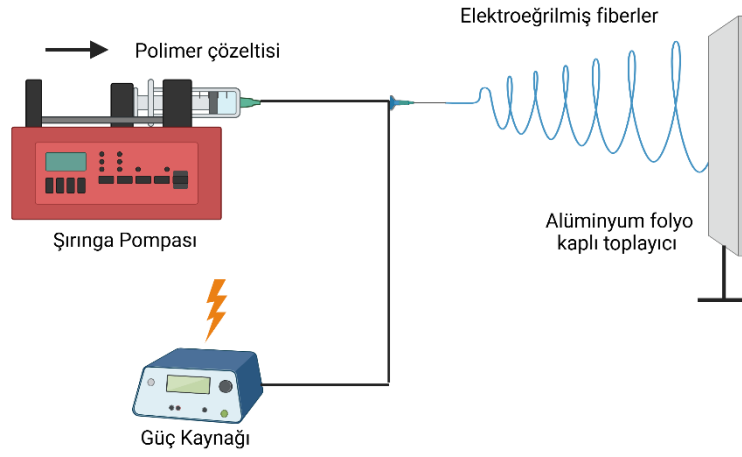


Şekil 2.18. Emülsiyon dondurarak kurutma tekniği (Morais vd., 2016)

#### 2.5.4. Elektroçirime tekniği

Fiber üretim yöntemleri arasında elektroçirime, kontrol edilebilir özelliklere, bileşime, şekle ve morfolojiye sahip çeşitli malzemelerden yapılmış fiber yapıları oluşturmak için uygun ve çok yönlü bir yöntemdir. Elektroçirime teknolojisi kullanılarak nanofiberlerin oluşumu, viskoelastik bir çözeltinin tek eksenli gerilmesine veya elektrostatik kuvvetlerin etkisi altında erimesine dayanır. Dikkat çekici özellikleri nedeniyle elektroçirime fiberleri, yara örtüleri, ilaç taşıyıcıları ve doku mühendisliği iskeleleri gibi gelişmiş biyomedikal malzemelerin tasarımında tercih edilmektedir (Azimi vd., 2020).

Elektroçirime teknolojisi, yüksek voltajlı bir elektrik alanı kullanarak nanometre ve mikrometre çaplarında polimer fiberler üretir. Elektroçirime cihazı 3 bölümden oluşur: Yüksek voltajlı güç kaynağı, sıvı besleme cihazı (mikro şırınga pompası ve şırınga dahil), fiber toplayıcı (Şekil 2.19.). Sıvı besleme cihazı, akış hızını doğru bir şekilde kontrol etmek için mikroenjeksiyon pompasına monte edilmiş, içinde polimer çözeltisi bulunan bir kaptır. Elektroçirime prensibi, polimer çözeltisinin viskoz gücü, yüzey gerilimi, karşılıklı itme kuvvetlerinin bir sonucu olarak nozullarda damlacık oluşumuna dayanır.



Şekil 2.19. Elektroğirme tekniği

Elektroğirme üç durumda gerçekleşir: jet başlatma, uzama ve katılaşma. Bu süreçte, iğnenin ucundaki bir polimer çözeltisi, voltaj kritik bir değere ulaşana kadar yüksek voltajlı bir güç kaynağı kullanılarak şarj edilir. Bu, polimer çözeltisi üzerinde bir yük oluşturarak ince bir jet şeklinde iğneden dışarı çekilmesine neden olur ve daha sonra 'Taylor konisi' olarak bilinen karakteristik bir şekil oluşturur. Sıvı jet havada ilerlerken, çözücü hızla buharlaşır ve kuru nanofiberler metal toplayıcı üzerinde yakalanır (Hemmati vd., 2021). Elektroğrılmış bir iskeletonin oluşumundaki en önemli faktör çözücü seçimidir. Elektroğirme yöntemindeki çözücüler fiber oluşumunu önemli ölçüde etkiler. Yanlış çözücü seçimi başarısız sonuçlara yol açabilir ve fiber oluşumu gözlenmez. Hem doğal hem de sentetik polimerler, çeşitli çözücülerde belirli konsantrasyonlarda elektroğirme için hazırlanır (Tablo 2.6.).

**Tablo 2.6.** Polimer çeşitleri ve çözücileri

Polimer	Çözücü	Konsantrasyon	Referans
PHB	DMF:TFA	%9 3:1	(Mohammadalipour vd., 2023)
P3HB	TFE:Kloroform	%10 7:3	(Jang vd., 2021)
Kolajen	HFIP	%8 (w/v)	(Felgueiras, 2017)
PHB/Kolajen (tip I)	HFIP	100/0 (w/w) 70/30 (w/w) 50/50 (w/w)	(Salvatore vd., 2018)
PHBV	Kloroform:DMF	1:1 (v/v)	(Mutlu vd., 2018)
P(3HB-co-4HB), Kolajen	Kloroform / PBS, Etanol	%15 wt / 1:1 v/v	(Vigneswari vd., 2016)
PHB / Jelatin	Kloroform / Asetik asit	%8 w/v PHB / %30 w/v Jelatin- %75 w/v asetik asit	(Sanhueza vd., 2021)
PLA/PVP	DCM	%15 wt	(W. Li vd., 2019)

Polimerlerin elektroçirime veya diğere yöntemlerle nanofiber/mikrofiber eldesinden sonra fiberler çeşitli biyoaktif ajanlarla işlevselleştirilebilir. Antimikrobiyal peptitler, çeşitli nanopartiküller fiziksel veya kimyasal yöntemlerle fiberin yapısına immobilizasyonu ve enkapsülasyonu sağlanır. Antibiyotiklerin yerini alabilecek yeni bir antimikrobiyal madde potansiyeli, antimikrobiyal peptitler (AMP) olarak karşımıza çıkmaktadır. Geniş bir antimikrobiyal sınıfı oluşturan AMP'ler, yalnızca mikroorganizmalar değil, aynı zamanda doğanın flora ve faunasında bulunan doğuştan gelen bağışıklık sistemlerinde de yer almaktadır. Bu peptitler, patojenlere karşı konak savunma peptitleri olarak tanımlanmakta olup, genellikle yüksek net pozitif yüke sahip olmaları ve molekül yapılarında hidrofilik ve hidrofobik bölgelerin bir kombinasyonunu içermeleri ile karakterizedir. Yüksek pozitif yükün, AMP'lerin bir patojenin zarında birikerek gözenekler oluşturma ve hücreye giriş sağlama yeteneği üzerinde önemli bir etki yarattığı düşünülmektedir (Ramos vd., 2011).

Antimikrobik etkili peptitlerin pozitif yük taşıyan ve hidrofobik yapıya sahip olmaları, bu bileşiklerin bakteri membranlarıyla etkili bir şekilde etkileşim kurabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Antimikrobiyal peptitlerin birçoğu, bu özellikleri sayesinde herhangi bir reseptöre gereksinim duymadan, doğrudan negatif yüklü bakteri yüzeyine bağlanarak etki gösterir. Şu ana kadar en çok incelenen antimikrobiyal peptitler, hedef hücre zarına etki ederek iki katmanlı lipid yapısının bozulmasına yol açan katyonik peptitlerdir. Bu peptitlerin büyük bir kısmı hem hidrofilik hem de hidrofobik özellikler gösteren amfipatik karaktere sahip maddelerdir. Bu tür yapı, antimikrobiyal peptitlerin

lipid bileşenleri (hidrofobik kısım) ve fosfolipid grupları (hidrofilik kısım) ile etkileşime girme yeteneğini artırmaktadır (Schmidt, 2013).

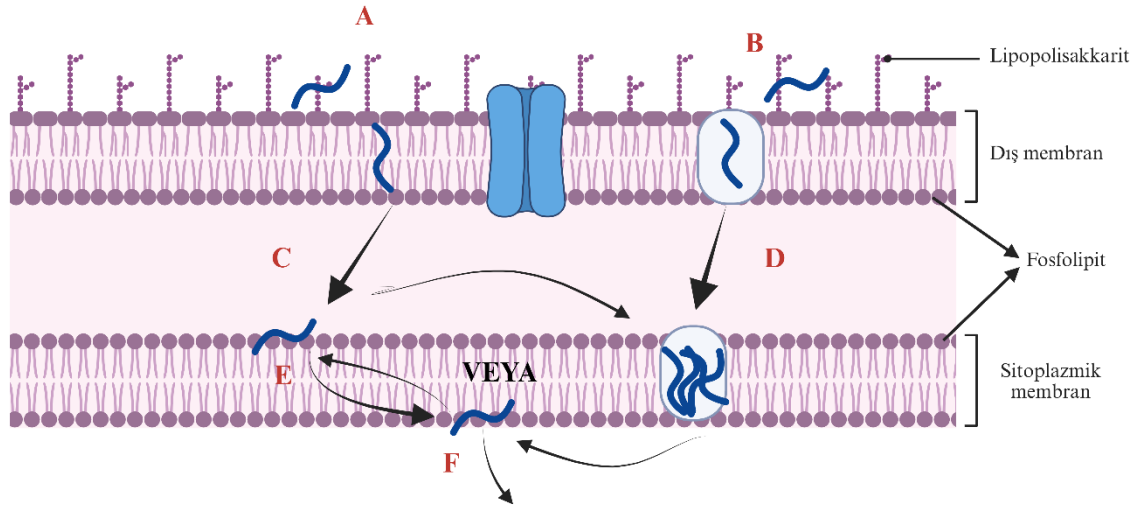
Antimikrobiyal peptitlerin (AMP'lerin) büyük çoğunluğu, pozitif yüklü ve hidrofobik yapıları sayesinde herhangi bir özgül reseptöre ihtiyaç duymaksızın, doğrudan bakteriyel yüzeye etkileşime girerek antimikrobiyal etkilerini göstermektedir. Gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan lipopolisakkarit (LPS) tabakası ile Gram pozitif bakterilerde yer alan asidik yapılu lipoteikoik asit, AMP'lerin elektrostatik etkileşim yoluyla bağlanabilmesini sağlayan negatif yük kaynakları olarak görev yapmaktadır. Ayrıca, bakterilerin fosfolipit yapısına sahip iç membranının negatif yük taşıması, antimikrobik etkinin daha da etkili olmasına yardımcı olmaktadır (Ma vd., 2024).

Yapılan araştırmalar, birçok antimikrobiyal peptidin (AMP) bakteriler üzerindeki etkilerini, yapılarına, hidrofobikliklerine, boyutlarına veya amino asit dizilimlerine bağlı olmaksızın çok küçük miktarlarda bile gerçekleştirebildiğini ortaya koymuştur. Bu etkiler, AMP'lerin antimikrobiyal etkisi, genellikle ortak bir mekanizma ile negatif yüklü fosfolipit yapısına sahip sitoplazmik membrana bağlanmaları ve bakteri hücrelerine penetre olmaları sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu bağlanma, hücre zarında iyonlar ve sıvıların hücre içi ile dış ortam arasında geçişine olanak tanıyan geçirgen kanalların oluşmasına neden olur. Bununla birlikte, katyonik peptitlerin sitoplazmik membrana ulaşabilmesi için, Gram negatif bakterilerde lipopolisakkarit (LPS) içeren dış membranı, Gram pozitif bakterilerde ise lipoteikoik asit içeren hücre duvarı yapısını aşmaları gerekmektedir (Q.-Y. Zhang vd., 2021).

Antimikrobiyal peptitlerin bakteri membranından geçişleri aşağıdaki gibidir :

- Şekil 2.20.(A)'da AMP lipopolisakkarit tabakasına yapışarak, iki değerlikli katyonları nötralize eder ve bu işlem sonucunda oluşan çatlaklardan içeri sızar.
- Şekil 2.20(B)'de AMP, lipopolisakkarit tabakasındaki iki değerlikli katyon bağlanma bölgelerine tutunarak hücre membranını bozar ve dış membranı aşarak içeriye nüfuz eder.
- Şekil 2.20(C)'de AMP'ler, sitoplazma membranına paralel bir konumda bağlanır.
- Şekil 2.20(D)'de AMP'ler, sitoplazma membranında birikerek agregat yapıları oluşturur.
- Şekil 2.20(E)'de Sitoplazma membranındaki fosfolipitlerin yüzeyde değişimi ve AMP'lerin kanal oluşturma süreçleri

- Şekil 2.20(F) AMP'lerin sitoplazma membranını aşarak hücre içine iletilmesi



Şekil 2.20. Antimikrobiyal peptitlerin bakteri dış ve sitoplazma membranından geçişi (Merve Ataman, 2016)

Sitotoksitenin azaltılması ve antimikrobiyal stabilitenin artırılması amacıyla AMP'ler, malzemelerin yüzeyine immobilize edilmektedir. Antimikrobiyal aktivitenin yanı sıra, antimikrobiyal peptitlerin immobilizasyonu; lipopolisakkaritlerin nötralizasyonu, inflamatuvar yanıtın modülasyonu ve epitel hücrelerinin göçü, çoğalması ve farklılaşması gibi çeşitli biyoaktiviteler gösterir. Bu durum, yara iyileşme sürecinin hızlanmasına katkı sağlamaktadır. AMP'ler, nanoyapı oluşturulmadan önce çözeltiliye dahil edilmesi, oluşturulduktan sonra yüzeye bağlanması veya kapsüllenmesi gibi çeşitli yollarla nanoyapılarla etkili bir şekilde birleştirilmiştir/immobilize edilmiştir. AMP'leri elektroğrılmış örtüler üzerine immobilize etmek için kullanılan birçok strateji vardır. En yaygın ve en basit olanı birlikte eğirme yöntemidir. Burada, AMP'ler polimerik nanolifler üretilirken immobilize edilir, fiberi oluşturan tüm unsurlar aynı anda elektroğrılır. AMP çözünürlüğü, antimikrobiyal aktivitesinin ve hedef özgüllüğünün bağlı olduğu çok önemli bir fizyokimyasal özelliktir (Felgueiras, 2017).

Elektroğrılmış fiberleri AMP'lerle birleştirmek için kullanılan fiziksel yöntemler vardır (Felgueiras, 2017).

**Adsorbsiyon:** Adsorbsiyon en basit yaklaşımdır. Sadece elektroğrılmış matların doyumluğa ulaşması için gereken süre boyunca seçilen AMP'leri içeren bir çözeltiliye daldırılmasını gerektirir. Basit ve etkili bir yöntem gibi görülse de mekanik kuvvetlerle

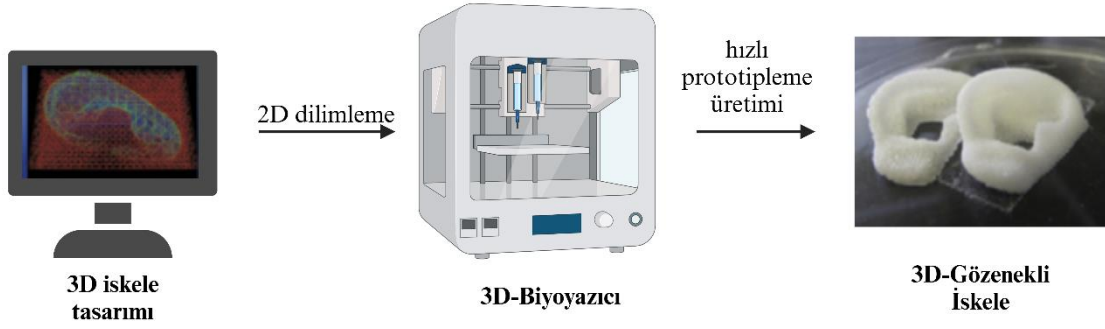
etkisiz hale getirilen AMP'lerin hızlı bir şekilde desorpsiyonu bir komplikasyon olmaya devam ettiğinden bağlayıcı ajanlar kullanmadan zordur.

**Katman katman birleştirme:** Katman katman yaklaşımda, AMP'ler iki poliyonik polimer arasına sıkıştırılır. Bu yöntem kullanılarak, uygun zamanda elektrospun çözeltileri değiştirilerek kontrollü AMP yüklemesine sahip esnek sayıda katman hazırlanabilir. Dezavantaj olarak, ilk katmanlarda immobilize edilen AMP'ler yaralı bölgeye doğru yayılmakta zorluk çekecektir. Bu, AMP'lerin matın en dış katmanına immobilize edilmesinden daha karmaşık bir sistemdir; matın kalınlığını, difüzyon yolunu ve peptit-polimer etkileşimlerini hesaba katmak gerekir. Buna ek olarak, elektroğrılmış katmanlar içinde hapsedilen AMP'ler de yapışmış bakteriler tarafından çıkış yollarının tıkanmasına maruz kalabilir. Öte yandan, çok katmanlı bir sistem, içine hapsedilen ilaçların veya AMP'lerin kontrollü bir şekilde salınması için en avantajlı olabilir.

Fiziksel immobilizasyon yöntemleriyle kıyaslandığında, kovalent bağlanma AMP'lerin sızmasını en aza indirmekte, uzun vadeli stabilite sağlamada ve toksisiteyi azaltmada birçok avantaj sunmaktadır. AMP'lerin kovalent immobilizasyonu iki ana yöntemle gerçekleştirilebilir. Bunlardan ilki, sağlam AMP'lerin elektroğrılmış yüzeye kovalent olarak bağlanmasını içeren "aşılama" yaklaşımıdır. İkincisi ise, AMP'lerin matın yüzeyine kovalent olarak immobilize edilmiş reaktif gruplar taşıyan başlatıcılardan veya ara parçalardan sentezlenmesini gerektiren "yüzey başlatmalı" stratejidir. "Aşılama" stratejileri, aminler, karboksilik asitler, aldehitler veya tiyoller gibi serbest bağlayıcı gruplar oluşturmak amacıyla elektroğrılmış yüzeylere çeşitli yöntemlerle (oksidasyon, UV radyasyonu, atmosferik plazma, ozonlama vb.) aktivasyonunu gerektirmektedir (Felgueiras, 2017).

### 2.5.5. 3D Biyobaskı

Hızlı prototipleme (RP), iyi tasarlanmış doku mühendisliği iskeleleri üretmek için yakın zamanda geliştirilmiş bir yöntemdir. RP, morfolojik özellikleri, kimyasal bileşimi ve mekanik özellikleri tam olarak kontrol eden katman katman bir 3D mimari oluşturmak için bilgisayar destekli bir tasarım modeli kullanır. Bu, art arda gelen malzeme katmanlarının farklı şekillerde yerleştirildiği ek bir işlemle elde edilir (Şekil 2.21.).



Şekil 2.21. 3D Biyoyazıcı

Bu teknik, boyutu ve şekli özel gereksinimlere göre uyarlanabilen yüksek oranda tekrarlanabilir iskeleler üretmek için kullanılabilir. 3D biyoyazıcı teknolojisi, canlı hücreleri ve büyüme faktörlerini üretim sırasında hidrojel tipi iskelelere gömmek için kullanılmış ve biyomimetik yapı iskelelerinin üretimindeki faydasını göstermiştir (Park vd., 2017). Günümüzde 3D baskı iskeleleri, çeşitli yaralı dokuların restoratif rejenerasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Elektroegirme gibi, 3D baskıda da kalsiyum fosfat ve kolajen, poli laktit asit ve poli e-kaprolakton (PLA-PCL) gibi birçok kompozit kullanılır (Sundar vd., 2021).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

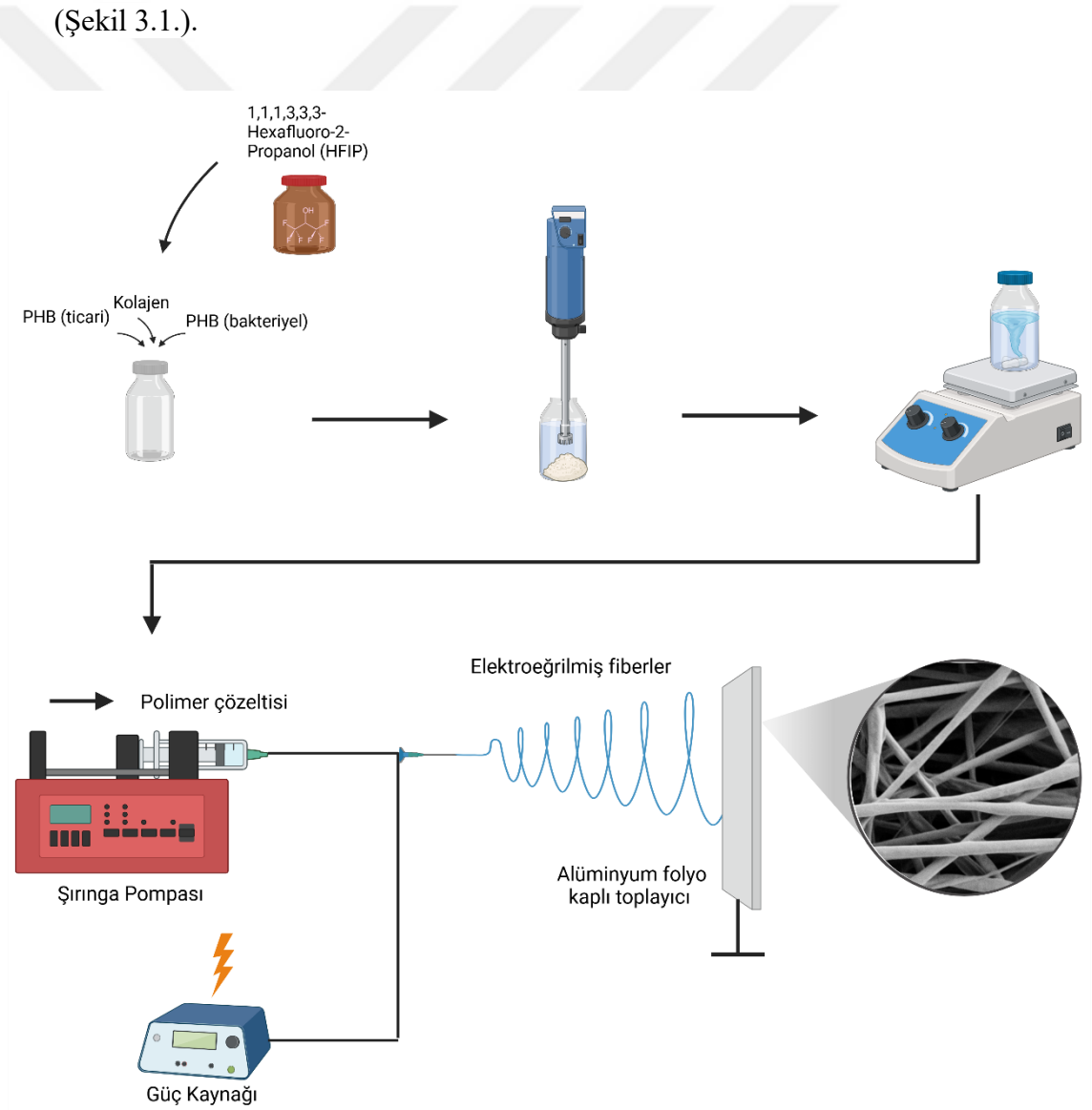
Bu çalışmada elektroğirme yöntemi ile *Cereibacter sphaeroides* O.U.001'den elde edilen PHB (103 kDa), ticari olarak alınan PHB (Merck, 363502-10G, 500 kDa) ve deniz kaynaklı kolajen kullanılarak LL-37 antimikrobiyal peptit (QYABIO, 597562-32-8) ile işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen nanofiber yara örtüsü prototipi geliştirilmesi hedeflendi. Geliştirilen yara örtüsü prototipinin karakterizasyonu için alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM) analiziyle yüzey morfolojisi, fizikokimyasal özelliklerine Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), Termogravimetrik Analiz (TGA) ve kristal yapısı X-ışını difraktometresi (XRD) ile karakterize edildi. Geliştirilen yara örtüsü prototipinin hücre çalışmaları için L929 ve HS2 hücre hatları kullanıldı. Bu hücre hatları üzerinden L929 hücre hattı kullanılarak yara örtüsü prototipinin sitotoksikite analizi, HS2 hücre hattına ise çizik uygulanarak çizik testi gerçekleştirildi. Bununla birlikte LL-37 antimikrobiyal peptit ile işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen yara örtüsünün patojenik *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922) bakteri suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi ELISA yöntemi ile belirlendi. LL-37 antimikrobiyal peptit ile işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen/LL-37 yara örtüsü prototipinin LL-37 varlığı Mikro BCA salım testiyle test edildi.

#### 3.1. Elektroğirme ile PHB/Kolajen Yara Örtüsü Prototipinin Geliştirilmesi

PHB/Kolajen yara örtüsü elektroğirme tekniği ile aşağıda verilen protokol takip edilerek oluşturulmuştur.

1. %2 (w/v)'lik PHB/Kolajen (1:1 (w/w)) polimer çözeltisi, bakteriyel PHB, ticari PHB ve kolajen farklı oranlarda kullanılarak hazırlandı.
2. %0 bakteriyel PHB/Kolajen polimer çözeltisi hazırlamak için 0.2 g ticari PHB, 0 g bakteriyel PHB ve 0.2 g kolajen tartıldı.
3. %25 bakteriyel PHB/Kolajen polimer çözeltisi için 0.05 g bakteriyel PHB, 0.15 g ticari PHB ve 0.2 g kolajen tartıldı.
4. %50 bakteriyel PHB/Kolajen polimer çözeltisi hazırlamak için 0.1 g bakteriyel PHB, 0.1 g ticari PHB ve 0.2 g kolajen tartıldı.

5. %75 bakteriyel PHB/Kolajen polimer çözeltisi hazırlamak için 0.15 g bakteriyel PHB, 0.05 g ticari PHB ve 0.2 g kolajen tartıldı.
6. %100 bakteriyel PHB/Kolajen polimer çözeltisi hazırlamak için 0.2 g bakteriyel PHB, 0 g ticari PHB ve 0.2 g kolajen tartıldı.
7. Tartılan PHB ve kolajen polimerleri çözücü olarak 20 mL HFIP (Hekzafloroizopropanol) içerisinde çözülüp çözeltiler hazırlandı.
8. Çözeltilerin belli bir homojeniteye ulaşması için homojenizatörde 10 dakika 15000 rpm'de ve bir gece manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.
9. Homojen hale gelen çözeltiler, sırasıyla plastik şırıngalara (10 mL, 22G, Set Inject) çekildi ve şırınga, şırınga pompası düzeneğine yerleştirildi.
10. Elektroğirme lifleri alüminyum folyo üzerinde toplandı ve nanofiber elde edildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Polimer çözeltisi hazırlama ve elektroğirme aşaması

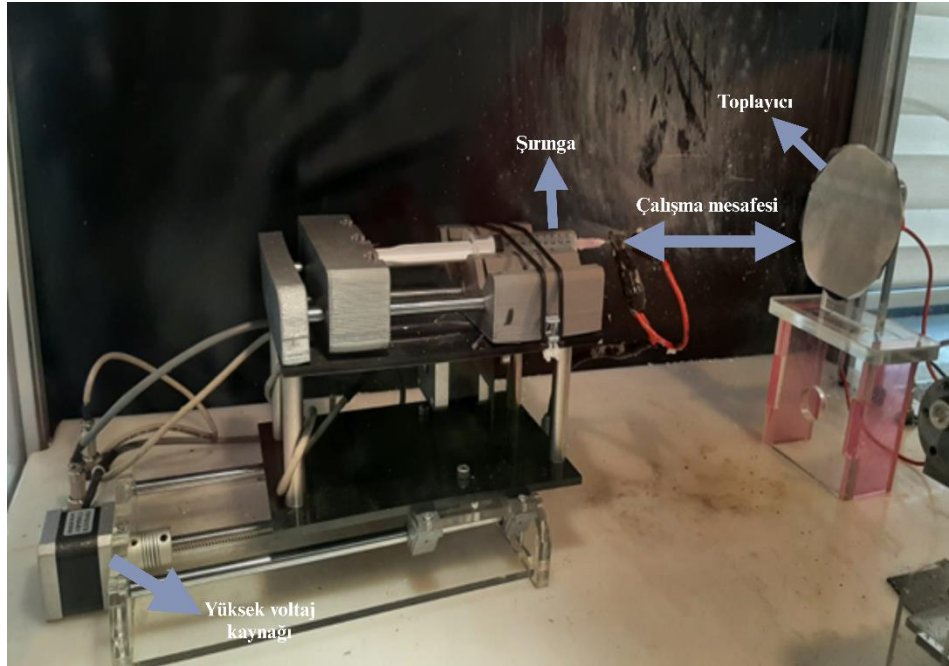
Polimer çözeltisi hazırlama aşamasında kullanılan PHB<sub>(bakteriyel)</sub>, PHB<sub>(ticari)</sub> ve kolajen miktarları aşağıda verilmiştir. PHB<sub>(bakteriyel)</sub>'in HFIP'de çözünürlüğü %0.1 g/mL'dir (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1.** Polimer çözeltisi hazırlama

Nanofiber çeşitleri	PHB <sub>(b)</sub> * / PHB <sub>(t)</sub> ** (w)	Kolajen (w)	Çözücü
%0 bakteriyel PHB/Kolajen	0 g PHB <sub>(b)</sub> / 0.2 g PHB <sub>(t)</sub>	0.2 g Kolajen	HFIP (20 mL)
%25 bakteriyel PHB/Kolajen	0.05 g PHB <sub>(b)</sub> / 0.15 g PHB <sub>(t)</sub>	0.2 g Kolajen	HFIP (20 mL)
%50 bakteriyel PHB/Kolajen	0.1 g PHB <sub>(b)</sub> / 0.1 g PHB <sub>(t)</sub>	0.2 g Kolajen	HFIP (20 mL)
%75 bakteriyel PHB/Kolajen	0.15 g PHB <sub>(b)</sub> / 0.05 g PHB <sub>(t)</sub>	0.2 g Kolajen	HFIP (20 mL)
%100 bakteriyel PHB/Kolajen	0.2 g PHB <sub>(b)</sub> / 0 g PHB <sub>(t)</sub>	0.2 g Kolajen	HFIP (20 mL)

\*PHB<sub>(bakteriyel)</sub>, \*\*PHB<sub>(ticari)</sub>

Nanofiberi elde etmek için yüksek voltaj kaynağı, bir alüminyum yuvarlak toplayıcı ve üçlü şırınga pompası ve bir şırıngadan oluşan bir elektroğirme düzeneği kullanıldı. Elektroğirme parametreleri olarak 1.8 mL/h akış hızı, 18 cm çalışma mesafesi ve 27 kV voltaj koşulları optimize edilerek işleme devam edildi (Şekil 3.2.).



**Şekil 3.2.** Elektroğirme cihazı

### **3.2. LL-37 Antimikrobiyal Peptit ile PHB/Kolajen Yara Örtüsü Prototipinin İşlevselleştirilmesi**

LL-37 antimikrobiyal peptit ile PHB/Kolajen nanofiberinin işlevselleştirilmesinde fiziksel bir yöntem olan adsorbsiyon yöntemi kullanıldı. Adsorbsiyon yöntemi, fiziksel bir yöntem olarak biyolojik molekülün malzemeye emdirilmesi durumudur.

1. LL-37 (4493.33 g/mol, %99.21 saflık, asetonitril 'de %33, distile suda %67 çözünürlüğe sahip) çözeltisi hazırlamada 1 mg/mL nihai konsantrasyon elde etmek için 5 mg LL-37 5 mL çözücü (asetonitril/distile su) içinde çözdürüldü.
2. Petride bulunan 0.6 cm çapında kesilmiş fiberlerin üzerine 25 µL LL-37 çözeltisi (1 mg/mL) damlatıldı ve kurumaya bırakıldı.

### **3.3. Geliştirilen Yara Örtüsü Prototipinin Karakterizasyonu**

#### **3.3.1. FT-IR Kullanılarak Fizikokimyasal Analiz**

Nanofiberlerin FT-IR spektrumları, FTIR spektrometresi (Thermo Scientific, Nicolet iS20) kullanılarak kaydedildi. Bu analizde LL-37 antimikrobiyal peptit yüklü %0 bakteriyel PHB/Kolajen, %25 bakteriyel PHB/Kolajen ve %50 bakteriyel PHB/Kolajen fiber matlarının kimyasal bağlarındaki belirli fonksiyonel grupların varlığı, 400-4000 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığında incelendi.

#### **3.3.2. XRD Analizi**

Bakteriyel PHB, ticari PHB ve LL-37 antimikrobiyal peptit yüklü PHB/Kolajen nanofiberlerinin dağılımını ve kristal yapısını belirlemek amacıyla X-ışını kırınımı analizi gerçekleştirildi. Tüm nanofiberlerin faz oluşumu, uyumluluğu ve saflığı, 1,54 Å dalga boyuna sahip Cu K $\alpha$  radyasyonu kullanılarak PANalytical EMPYREAN X-ışını difraktometresi ile incelendi. Bu inceleme, 2°/dak tarama hızı ve 0,05° adım boyutu ile 10°-90° aralığında elde edilen saçılma desenine dayanmaktadır. Analiz sırasında uygulanan jeneratör voltajı 45 kV, tüp akımı ise 40 mA olmuştur.

### 3.3.3. Termal Özellikler

Termogravimetrik analiz (TGA (Setaram, Labsys Evo)), 15 dakika boyunca 10 °C/dk ısıtma hızıyla 20 mL/dk azot atmosferi altında 25 ila 600 °C arasında değişen sıcaklık nedeniyle nanofiberlerin kütle farkını belirlemek için gerçekleştirildi ve termogravimetri grafiği elde edildi.

### 3.3.4. Hidrofilik Profili Değerlendirmesi

Nanofiberlerin hidrofilikliği, Biolin Scientific Attension Theta Lite cihazı kullanılarak dijital video tabanlı optik temas açısı ölçümüyle belirlendi. Her bir nanofiberden 2x2 cm'lik numuneler kesilerek düzlenek üzerine nanofiber yerleştirildi. Bilgisayar kontrollü bir sistemle, örnek yüzeyindeki nanofiberlere 5 µL hacimdeki su damlacıkları damlatıldı ve 2 dakika boyunca ardışık görüntüler kaydedildi. Damlacığın sağ ve sol kenarlarındaki temas açıları ölçüldü. Her numune için ortalama değerler hesaplandı.

### 3.4. Hücre Kültürü Testleri

Bu çalışmada hücre kültürü deneyleri için L929 (fare fibroblast hücre hattı) ve HS2 (insan keratinosit hücre hattı) olmak üzere iki hücre hattı kullanıldı. L929 hücre hattı, LL-37 antimikrobiyal peptid işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen nanofiberinin biyoyumluluk ve toksik etkisine bakılması için kullanıldı. HS2 hücre hattı ise PHB/Kolajen nanofiberinin in vitro yara iyileştirme uygulamaları için değerlendirildi (Sangeetha vd., 2024).

Uygun hücre kültürü koşullarının sağlanması amacıyla L929 ve HS2 hücre hattı için DMEM besiyeri (Gibco™ 41966029) kullanıldı. Bu besiyerinde 4.5 g/L D-glikoz, pirüvat, L-glutamin ve fenol kırmızısı bulunmaktadır. Ayrıca, besiyeri %70 Fetal Sığıır Serumu (FBS) (Gibco™ A5256701) ve %1 gentamisin antibiyotiği ile zenginleştirildi. Hücreler, 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %21 O<sub>2</sub> ortamında ayarlanmış inkübatörde kültüre edildi. Hücrelerin yıkanması, ölü hücrelerin uzaklaştırılması ve tripsin öncesi besiyerinin çıkarılması işlemleri PBS ile gerçekleştirildi. Hücrelerin pasajlanması ve toplanmasında ise Tripsin-EDTA (SERANA 43060223) kullanıldı.

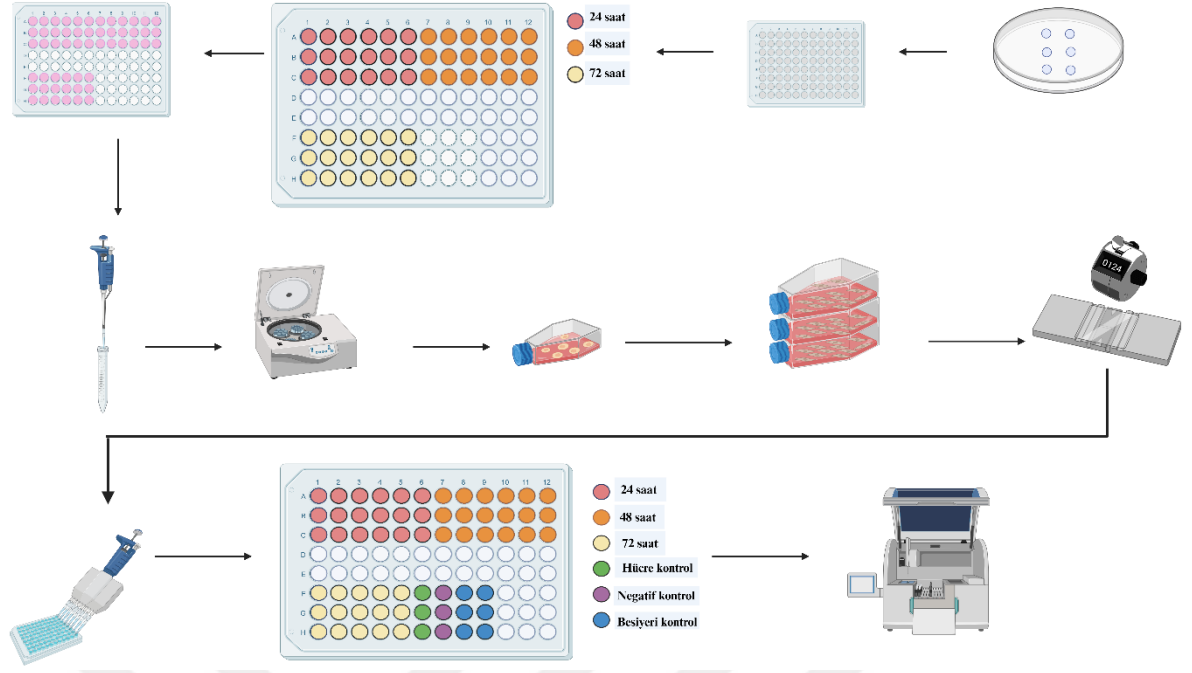
### 3.4.1. Sitotoksisite Analizi

PHB/Kolajen nanofiberlerin fibroblast hücrelerinin üremesine etkisi, XTT sitotoksisite testi kullanılarak analiz edildi. İzlenen protokol aşağıda verilmektedir.

1. PHB/Kolajen nanofiberler boş medium (L929:DMEM) içerisinde 24, 48, 72 saat tutuldu. Nanofiberler kuyucuklardan çıkarılıp ekstrakt kısımları ayrıldı.
2. L929 hücreleri tripsin çözeltisi ile kaldırılıp tripan mavisi boyama ile sayıldı.
3. 96 kuyucuklu mikropalakaya negatif kontrol ve besiyeri kontrol kuyuları hariç, kuyu başına toplam  $5 \times 10^3$  hücre ekildi. 24 saat boyunca  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  inkübatöründe inkübe edildi.
4. İnkübasyon sürecinden sonra besiyerleri atıldı. Nanofiberlerin ekstraktı olan besiyerleri, L929 hücre ekili 96 kuyucuklu mikropalakaya aktarıldı.
5. Kuyucuklardaki hücreler 10X ile ters ışık mikroskopunda görüntülendi.
6. Mikropalakadaki her bir kuyucuğa 50  $\mu\text{L}$  XTT çözeltisi (50  $\mu\text{L}$  aktivatör ile eklenen 500  $\mu\text{L}$  XTT) eklendi ve plakalar 4 saat boyunca inkübe edildi.
7. 450, 500 ve 630 nm'de mikropalaka spektrofotometresi kullanılarak her bir kuyucuğun optik yoğunlukları (OD) ölçüldü (Şekil 3.3.).

L929 hücrelerinin hücre canlılık yüzdesi, aşağıdaki ifade kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Numunenin OD'si}_{(450,500,630 \text{ nm})}}{\text{Pozitif kontrolün OD'si}_{(450,500,630 \text{ nm})} - \text{Negatif kontrolün OD'si}_{(450,500,630 \text{ nm})}}$$



Şekil 3.3. Sitotoksisite analizi aşamaları

### 3.4.2. Çizik Testi

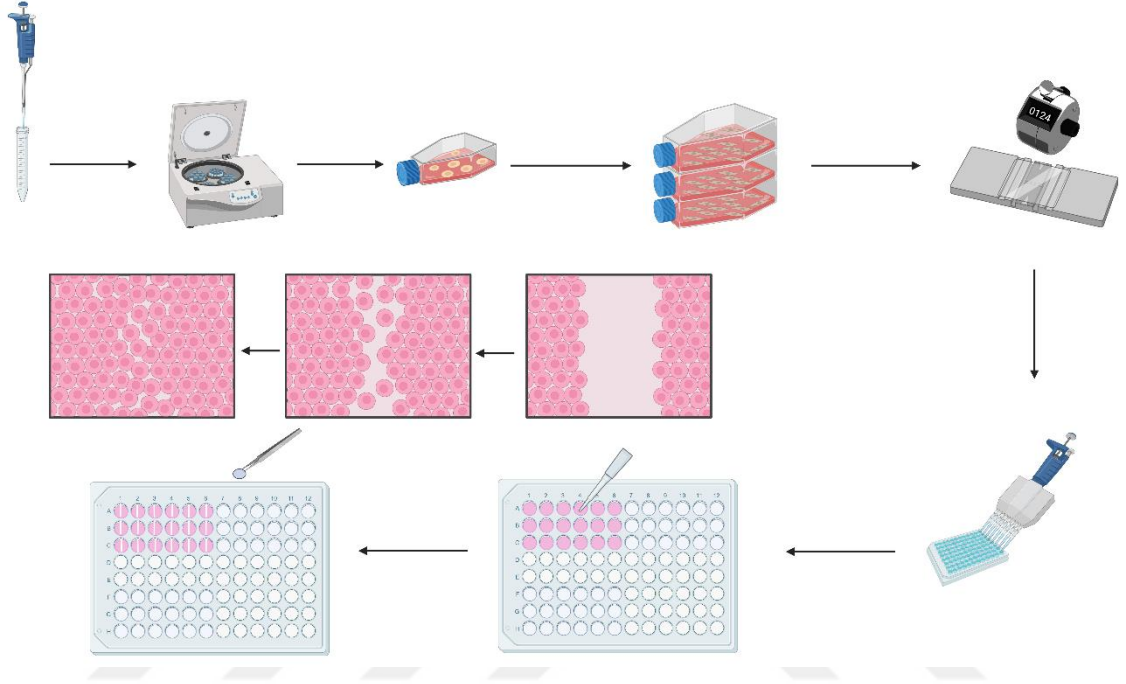
LL-37 antimikrobiyal peptit ile işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen yara örtüsünün in vitro yara iyileştirme etkisi çizik testi tekniği ile aşağıda verilen protokol takip edilerek yapıldı (Siva, 2025).

1. 96 kuyucuklu mikroplyakaya her bir kuyucuğa  $0,4 \times 10^5$  HS2 hücresi ekildi.
2. Mikroplyaka LL-37 antimikrobiyal peptitle işlevselleştirilmiş %0, %25 ve %50 PHB/Kolajen nanofiberler ve LL-37 antimikrobiyal peptit ile işlevselleştirilmemiş %0, %25 ve %50 PHB/Kolajen nanofiberler olarak üç tekrarlı olmak üzere ikiye ayrıldı.
3. 24 saat sonra hücrelerin kuyucukları kapladığı gözlemlendi.
4. Hücre kaplı kuyucuklara steril pipet ucuyla çizik atıldı.
5. Kuyucuklardaki hücrelerin üzerindeki çiziklerin üzerine nanofiberler yerleştirildi.
6. Ters ışık mikroskobunda 4X ile 1., 3. ve 7.günlerde nanofiberler çıkarılarak çizik kapanması gözlemlendi (Şekil 3.4.).
7. Çizik kapanma ölçümü ImageJ yazılımıyla ölçüldü.

Çizik kapanma yüzde hesaplaması aşağıdaki gibidir:

$$\text{Çizik kapanma (\%)} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times \%100$$

$A_0$ : ilk andaki çizik boyu,  $A_t$ : belli zamandaki çizik boyu.



Şekil 3.4. Çizik testi

### 3.4.3. In Vitro Biyobozunurluk Testi

LL-37 antimikrobiyal peptit ile işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen yara örtüsünün in vitro yara in vitro biyobozunurluluk testi aşağıda verilen protokol takip edilerek yapıldı (Güneş Çimen vd., 2022).

1. %0 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37, %25 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 ve %50 PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberleri 0.6 cm çapında diskler halinde zımba yardımıyla kesildi.
2. Kesilen nanofiberler 96 kuyucuklu mikropalakaya üç tekrarlı olacak şekilde yerleştirildi.
3. Nanofiberlerin üzerine 150  $\mu$ L DMEM besiyeri eklendi.
4. 1, 7 ve 14. günlerde nanofiberler besiyerlerinden çıkarılıp kurutulularak tartımları yapıldı.

5. Ağırlık kayıplarına bakılarak % ağırlık kaybı grafiği çizildi.

### **3.5. Geliştirilen Nanofiberlerin Morfolojik Analizleri**

Elektroçirilmiş nanofiberlerin fiber morfolojisi ve yüzey özellikleri, numunelerin bir iridyum nano tabaka (Leica, EM, ACE600) ile püskürtme kaplamasından sonra, 5 kV hızlanma voltajı kullanılarak FESEM (ZEISS, Gemini, SEM 500) ile incelendi. Her numunenin FESEM görüntülerinden rastgele seçilen 100 lifin ortalama çapı, ImageJ yazılımı aracılığıyla hesaplandı.

### **3.6. Nanofiber Yüzeyine Hücre Adezyonunun Konfokal Mikroskopunda Değerlendirilmesi**

LL-37 antimikrobiyal peptit ile işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen yara örtüsünün biyouyumluluğunu tespit etmek için konfokal mikroskopunda hücre tutunması aşağıda verilen protokol takip edilerek gözlemlendi (Flaig vd., 2024).

1. Fiber örneği 500 µL sodyum cacodylate tampon çözeltisi ile bir defa yıkandı.
2. Fiber üzerine 1'er mL 4 % Paraformaldehyde (PFA) çözeltisi eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında fiksasyon işlemi gerçekleştirildi.
3. Fiber örneklerinden PFA çekildi ve iki defa 300 µL Tween-80 solüsyonu ile bekleme olmaksızın oda sıcaklığında arka arkaya yıkandı.
4. Daha sonra Triton-X çözeltisiyle 5 dakika bekletilip hücre zarı geçirgen hale getirildi.
5. Boyama çözeltisi hazırlamak için 4mL PBS içerisine 1µL rhodamine-phalloidin ve 1µL DAPI eklendi.
6. Fiber üzerine 2'şer mL boyama çözeltisi eklendi ve inkübatörde 20 dakika bekletildi.
7. 300 µL Tween 80 çözeltisiyle 2 defa yıkandı.
8. Tween 80 atıldı, örnek üzerine 1 mL PBS eklendi.
9. Fiber lam üzerine alındı ve lam üzerindeki fiber üzerine 1-2 damla Fluoromount Aqueous Mounting Medium damlatıldı.
10. Lamel ile kapatıldı ve 1-2 saat kurumaya bırakıldı.

11. Kuruyan lam konfokal mikroskobunda görüntülendi.

### 3.7. Nanofiber Yüzeyine Hücre Adezyonunun FESEM’de Değerlendirilmesi

LL-37 antimikrobiyal peptit ile işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen yara örtüsünün biyoyumluluğunu tespit etmek için alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobunda hücre tutunması aşağıda verilen protokol takip edilerek gözlemlendi (Venugopal vd., 2008).

1. Nanofiberler bir zımba ile 0.6 cm çapında kesilmiş ve nanofiberlerin her iki tarafı 30 dakika boyunca UV ışını ile sterilize edilerek 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına yerleştirildi. Nanofiberler PBS çözeltisi ile iki kez durulandı.
2. HS2 hücreleri CO<sub>2</sub> inkübatöründe DMEM besiyerinde (%70 FBS ve gentamisin ile) kültüre edildi.
3. Hücre kültürü plakalarına yerleştirilen nanofiberler üzerine  $1,5 \times 10^5$  hücre ekildi.
4. Nanofiber iskelelere ekilen hücreler 0,1 M sodyum kakodilat tamponu (pH 7,4) ile iki kez durulandı ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca 0,1 M sodyum kakodilat içinde hazırlanan %3 glutaraldehit içine daldırılarak sabitlendi.
5. Örnekler distile suda üç kez durulandı ve sırasıyla %50, %75, %90 ve %100 (v/v) konsantrasyonlarda etanol çözeltisi kullanılarak, her birinde 20 dakika bekletilerek dehidre edildi.
6. Bütün numuneler 100 µl HMDS ile muamele edildi ve bir gece boyunca çeker ocakta kurutuldu.
7. Kurutulan numuneler daha sonra iridyum ile kaplandı ve FESEM altında gözlemlendi.

### 3.8. In Vitro Antibakteriyel Aktivite Değerlendirmesi

Elektroergilmiş fiber matların in vitro antibakteriyel etkinliği, *E. coli* ve *S. aureus* mikroorganizmalarına karşı Broth mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirildi. Önceki çalışmalar, enfekte yaralarda patojenlerin en sık rastlanan türleri olarak *E. coli*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın bulunduğunu ortaya koymaktadır (Foroutan Koudehi vd., 2019).

### **Broth mikrodilüsyon yöntemi:**

1. *E. coli* (ATCC 25922) ve *S. aureus* (ATCC 29213) bakteri suşları 16 saat boyunca 37 °C'de Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerinde çoğaltıldı.
2. 0.6 cm çapındaki nanofiberler UV altında sterilize edildi.
3. UV'den sonra fiberlerin üzerine 25 µL LL-37 çözeltisi (1 mg/mL) damlatılıp kabin içerisinde kurumaya bırakıldı.
4. Steril su içinde 0.50 McFarland (McF) ayarlaması yapıldı.
5. Broth mikrodilüsyon analizi için 96 kuyucuklu mikropılaka 5 sütun 3 satır olacak şekilde kullanıldı.
6. 5×3 kuyucukların hepsine Mueller Hinton Broth (MHB) besiyeri (90 µL) konuldu.
7. İlk sütun hariç diğer kuyucuklara 0.5 McFarland ayarlanmış bakteri kültüründen (10 µL) konuldu.
8. 3 , 4 ve 5. sütunlara 3 tekrarlı olacak şekilde sırasıyla %0 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37, %25 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 ve %50 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberleri yerleştirildi. Kontrol grubu olarak ise 2.sütun 4. ve 5. kuyucuklara Gentamisin ve Oksasillin antibiyotik diskleri yerleştirildi.
9. İnkübasyon 16 saat boyunca 37°C 'de gerçekleştirildi. 16 saat inkübasyon sonucunda ELISA (600 nm) da okuması yapıldı.

### **3.9. Mikro BCA Salım Testi**

Mikro BCA protein testi, seyreltik numunelerin protein konsantrasyonunu belirlemek için popüler bir yöntemdir. Üç Mikro BCA reaktifinin birlikte karıştırılması, eşit hacimde numune ile karıştırıldığında proteini ölçmek için yeterince konsantre olan bir çalışma ajanı (WR) ile sonuçlanır.

1. Nanofiberler 7 gün boyunca PBS'te bekletilip her günün sonunda ekstrakt kısımları toplandı.
2. Mikropılakanın her bir kuyucuğuna albumin standardı (150µL) ve bilinmeyen numune olarak LL-37 ile işlevselleştirilmiş sırasıyla %0, %25 ve %50 PHB/Kolajen nanofiberlerinin ekstraktları alındı.

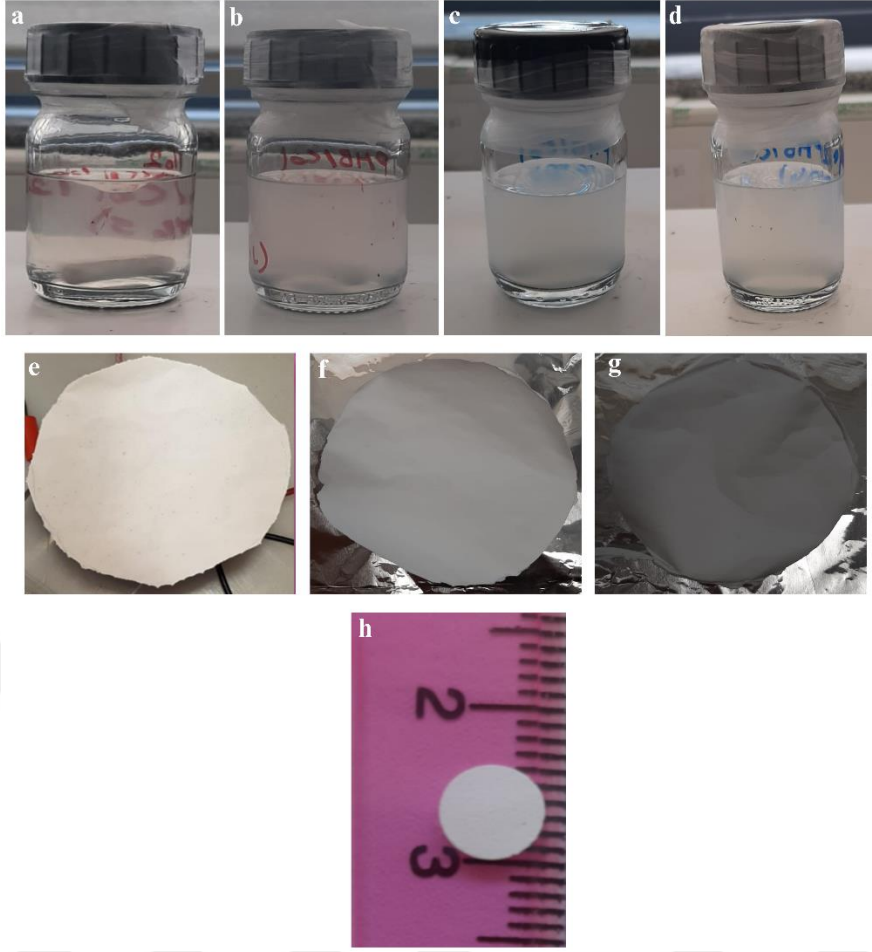
3. Numunelerin üzerine çalışma ajanı (150µL) eklendi. Plaka 37°C'de 2 saat inkübe edildi.
4. Plaka oda sıcaklığına soğutuldu.
5. Bir plaka okuyucuda 562 nm'de absorbansı ölçüldü.
6. Her bir BCA standardı için 562 nm okumasını µg/mL cinsinden konsantrasyonuna karşı çizerek bir standart eğri hazırlandı.
7. Her bir bilinmeyen numunenin protein konsantrasyonunu belirlemek için standart eğri kullanıldı.



## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1. PHB/Kolajen Nanofiber Üretimi

Yapılan çalışmada nanofiberlerin üretimi için elektroğirme cihazı (ERAKTEK) kullanıldı. Salvatore ve arkadaşları tarafından 2018'de yapılan bir çalışmada PHB/Kolajen oranı (100/0, 70/30, 50/50) farklı oranlarda denenmiş ve 1:1 oranının olması yani kolajenin oranının artırılması viskoziteyi ve fiber çapını etkilediği görülmüştür. PHB/Kolajen oranının artmasıyla kolajen miktarından kaynaklanan daha yüksek viskozitesine bağlanmıştır (Salvatore vd., 2018). Bununla birlikte, kolajen içeriğinin fiber boyutu üzerindeki ters etkisinin PHBV/kolajen karışımları için de literatürde belgelendiğini belirtmek gerekir (Prabhakaran vd., 2013). Bu doğrultuda bu çalışmada da PHB/Kolajen (1:1) oranı kullanılmasına karar verildi. %0 bakteriyel PHB/Kolajen, %25 bakteriyel PHB/Kolajen ve %50 bakteriyel PHB/Kolajen polimer çözeltilerinden nanofiber elde edildi. Fakat %75 ve %100 bakteriyel PHB/Kolajen polimer çözeltilerinden nanofiber elde edilemedi. %75 ve %100 bakteriyel PHB'nin moleküler ağırlığına bağlı olarak HFIP içerisinde çözünmedi ve bulanık, viskozitesi düşük bir polimer çözeltisi olduğu için nanofiber eldesi gözlemlenmedi (Şekil 4.1.).



**Şekil 4.1.** Polimer çözeltileri ve nanofiberler a) %0 bakteriyel PHB/Kolajen çözeltisi b) %25 bakteriyel PHB/Kolajen çözeltisi c) %50 bakteriyel PHB/Kolajen çözeltisi d) %100 bakteriyel PHB/Kolajen çözeltisi e) %0 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiber f) %25 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiber g) %50 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiber h) 0.6 cm çapında nanofiber diski

Bu tür değişken bulguların nedeni muhtemelen karışımdaki iki polimerin sabit konsantrasyonda verdiği farklı viskozitelerde yatmaktadır. Viskozitenin, elektrostatik alan altında püskürtmeyi ve jet/fiber incelmelerini etkileyen önemli bir parametre olduğu ve daha az viskoz polimer çözeltilerinin daha ince fiberler ürettiği iyi bilinmektedir. Bu nedenle, çözücü, polimerlerin moleküler ağırlığı, toplam polimer konsantrasyonu ve/veya karışım bileşimi, belirli boyuttaki elektroğrılmış fiberlerin sentezini etkileyen değişkenlerdir. Kolajen söz konusu olduğunda, spesifik hayvan dokusu ve ekstraksiyon protokolü ve bakteriyel PHB'nin ekstrakte edilen bakteri çeşidi polimer çözeltisinin nihai viskozitesini daha da etkileyecektir (Salvatore vd., 2018). Bununla birlikte, özellikle hidrofilik kolajenin artan fraksiyonlarının varlığında, su çözeltilerinde lif şişmesinin meydana gelebileceğini ve bunun hücre kolonizasyonu için mevcut olan genel gözenekliliği önemli ölçüde azaltabileceğini belirtmek gerekir. Elektroğrılmış ağlar,

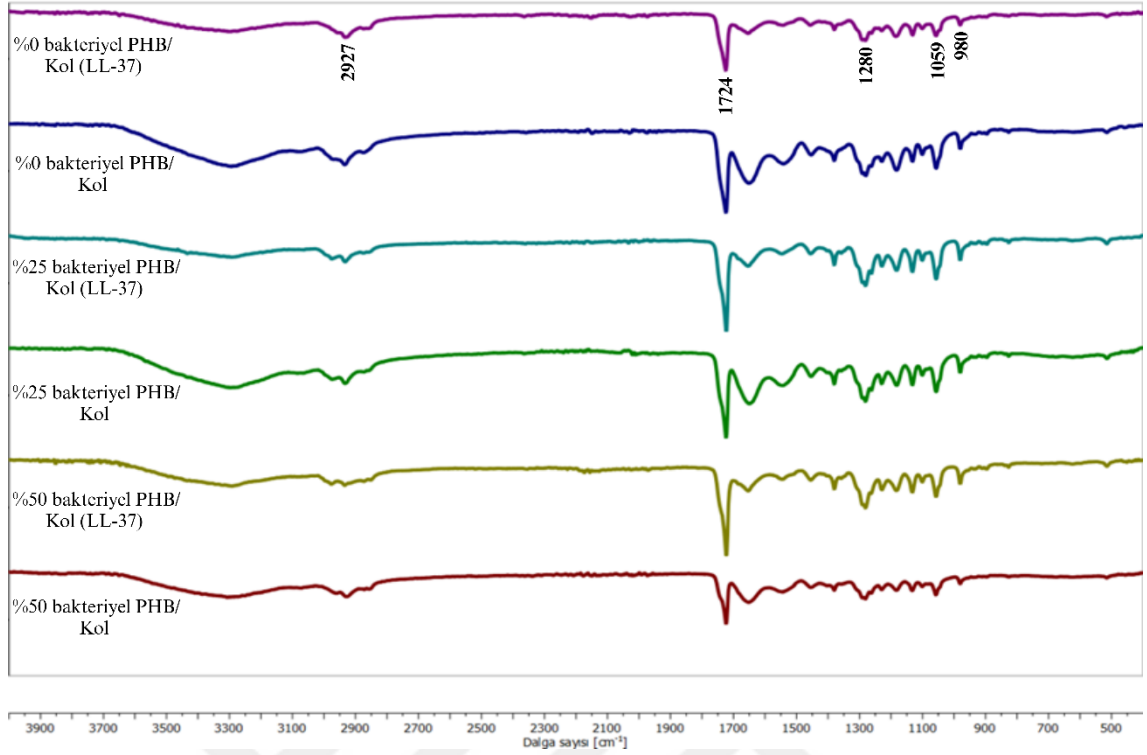
hücre-malzeme etkileşimlerinin teşvik edilmesinin son derece önemli olduğu doku mühendisliği ve yara iyileşmesi gibi spesifik biyomedikal uygulamalara ideal bir şekilde uyum sağlar.

## 4.2. Karakterizasyon Analizi

Nanofiberlerin karakterizasyonu için FTIR, XRD, TGA ve optik temas açısı cihazları kullanıldı. Karakterizasyon analizleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (BİTAM) yapıldı.

### 4.2.1. FT-IR Analizi

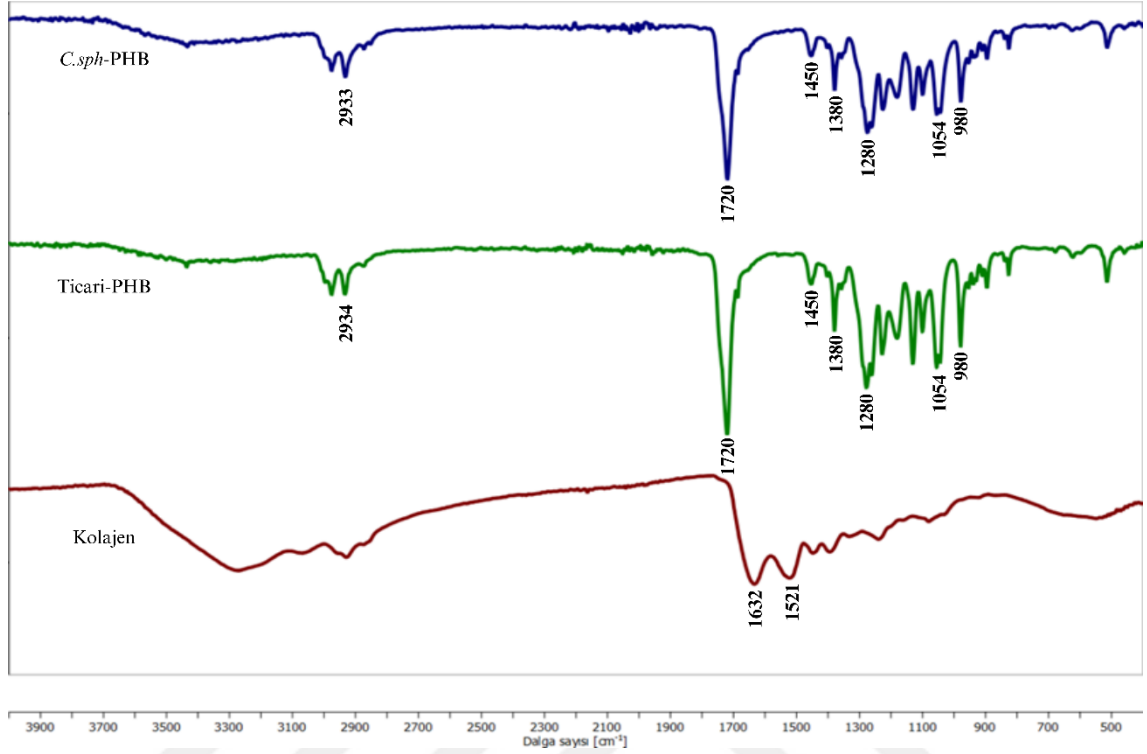
Nanofiberlerin içeriğindeki *Cereibacter sphaeroideis* bakteri suşundan ekstrakte edilen PHB biyopolimeri, Sigma Aldrich'ten satın alınan PHB ve kolajen polimerlerinin fonksiyonel gruplarını tanımlamak amacıyla FT-IR analizi gerçekleştirildi. Polihidroksibütiratın fonksiyonel grupları, belirli dalga boylarına karşılık gelen farklı pik noktaları ile karşılaştırılarak incelendi. FT-IR pik dalga boyu sonuçları, Şekil 4.2.'de sunuldu. Ticari, bakteri kaynaklı PHB ve deniz kaynaklı kolajenin FT-IR spektrumu 3900 ile 500  $\text{cm}^{-1}$  aralığında gözlemlendi (Şekil 4.2.). FTIR dalga boyuna karşılık gelen fonksiyonel PHB grupları çizelge 4.2'de gösterilmektedir.



**Şekil 4.2.** %0, %25 ve %50 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberlerinin FTIR dalga sayısı ( $\text{cm}^{-1}$ ) karşılaştırması

PHB'nin FTIR spektrumu, nanofiber içeriğinin polihidroksibutirat olduğunu gösteren çeşitli fonksiyonel grup pikleri gösterir. FTIR kullanılarak analiz edilen polimer, PHB'nin karakteristik bir C=O pikleri (ana fonksiyonel gruplar) gösterecek ve böylece ekstrakte edilen polimerin PHB olduğunu doğrulayacaktır (Amir vd., 2024). Tablo 4.1.'de,  $2976\text{-}2932\text{ cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon, CH grubunun varlığını gösterirken,  $1724\text{-}1719\text{ cm}^{-1}$ 'deki dalga boyu zirvesi (pik), bir C=O fonksiyonel grubunun varlığını gösterdi. Tablo 4.1. ve Şekil 4.3.'e göre,  $1453\text{ cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon spektrumu, bir  $\text{CH}_2$  fonksiyonel grubunun varlığını gösterirken,  $1380\text{ cm}^{-1}$ 'deki dalga boyu spektrumu,  $\text{CH}_3$  fonksiyonel grubu varlığını doğruladı ve  $1280\text{-}1275\text{ cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon spektrumu ile C-O fonksiyonel grubunun varlığı tespit edildi. Prabhakaran ve arkadaşları tarafından 2013'den yapılan bir çalışmada kolajenden gelen amid I ve amid II'yi temsil eden pikler, her iki PHBV/Col iskelesi için sırasıyla  $1640$  ve  $1537\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenmiştir. Bu da kompozit PHBV/Col iskeleleri üzerinde kolajenden gelen  $1,640\text{-}1,500\text{ cm}^{-1}$  (Amid II N-H) ve  $1,360\text{-}1,250\text{ cm}^{-1}$  (Amin C-N) amino fonksiyonel grupların varlığını göstermektedir (Prabhakaran vd., 2013). Bu doğrultuda çalışmamızda da deniz kaynaklı

kolajenden elde edilen FTIR dalga boyu  $1632\text{ cm}^{-1}$ 'de amid II,  $1521\text{ cm}^{-1}$ 'de ise amid I fonksiyonel grupları kolajenin varlığını doğruladı.



Şekil 4.3. Ticari PHB, ekstrakte edilmiş PHB ve kolajenin FTIR dalga sayısı ( $\text{cm}^{-1}$ ) karşılaştırması

Tablo 4.1. Bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin fonksiyonel grupları ve FTIR dalga sayısı ( $\text{cm}^{-1}$ )

Fonksiyonel grup	FTIR pik dalga sayısı ( $\text{cm}^{-1}$ )
CH <sub>3</sub>	1380
CH <sub>2</sub>	1450
C-H	2976-2932
C=O	1724-1719
C-O	1280-1275
O-H	3436

#### 4.2.2. XRD Analizi

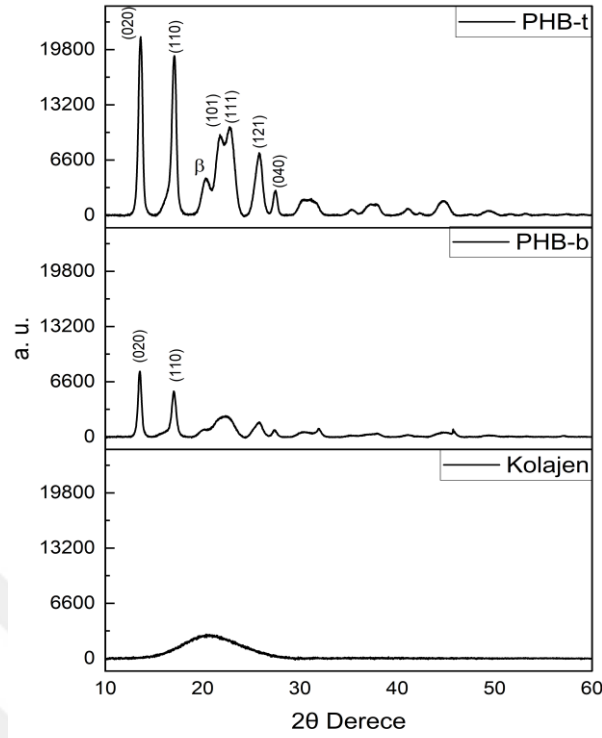
X-ışını kırınımı (XRD) analizleri, ticari olarak temin edilen PHB-t, bakteriyel yollarla sentezlenen PHB-b ve kolajen örneklerinin kristalin yapı özelliklerini karşılaştırmak amacıyla gerçekleştirildi. Ölçümler,  $10^{\circ}$ – $60^{\circ}$  aralığında  $2\theta$  taraması ile gerçekleştirildi. PHB-t ve PHB-b örneklerine ait kırınım desenlerinde, polihidroksibutiratın (PHB) ortorombik kristal fazına karşılık gelen karakteristik yansıma

pikleri açıkça gözlemlendi. Özellikle  $2\theta \approx 13^\circ$  (020),  $16.8-17^\circ$  (110),  $21^\circ$  (101),  $22-22.5^\circ$  (111),  $25^\circ$  (121) ve  $27^\circ$  (040) düzlemlerine karşılık gelen bu pikler, her iki örnekte de belirgin şekilde ortaya çıkmakta olup,  $\alpha$ -PHB kristal fazının varlığını teyit etmektedir (Pradhan vd., 2018). Bu bulgular, *Cupriavidus necator* ve *Bacillus* türleri gibi bakterilerden elde edilen PHB örnekleriyle daha önce yapılan çalışmalarda bildirilen kristal yapılarla da örtüşmektedir.

Bununla birlikte,  $2\theta \approx 20^\circ$  civarında gözlenen bir kırınım piki, literatürde  $\beta$ -faz kristallerine atfedilmektedir. PHB'nin kristal yapıları açısından en yaygın formu, tipik olarak eriyik, soğuk veya çözelti kristalleşmesi koşullarında oluşan  $\alpha$ -fazdır. Laycock ve arkadaşlarına göre, yönlü olarak gerilmiş PHB filmlerinde elde edilebilen  $\beta$ -faz, metastabil karakterdedir ve  $130^\circ\text{C}$ 'de tavlama işlemiyle yeniden  $\alpha$ -faza dönüşerek kristallik derecesinde artış sağlar (Mottin vd., 2016).

PHB-t örneğinde, kırınım piklerinin daha yüksek yoğunlukta ve daha keskin olması, bu örneğin PHB-b'ye kıyasla daha yüksek bir kristallik derecesine sahip olduğunu göstermektedir. Bu farklılık, büyük ölçüde polimer zincirlerinin molekül ağırlıklarına bağlanabilir. PHB-t örneği yaklaşık 500 kDa'luk bir molekül ağırlığına sahipken, PHB-b örneği yalnızca 102 kDa düzeyindedir. Yüksek molekül ağırlığına sahip polimer zincirleri daha uzun ve daha fazla dolanıklık içerdiğinden, kristalin bölgelerde daha düzenli bir şekilde hizalanma eğilimi gösterir. Bu yapı, XRD deseninde daha keskin, yoğun ve simetrik kırınım pikleri ile kendini gösterir. Öte yandan, daha kısa zincir uzunluğuna sahip PHB-b örneği, kristalin bölgelerde yeterli düzene ulaşamadığı için, daha geniş tabanlı ve düşük yoğunluklu piklerle karakterize edilir. Ayrıca, kısa zincirli polimerlerin amorf faza katkı oranı daha yüksek olduğundan, PHB-b örneği kristal-amorf morfolojisinde amorf yapının daha baskın olduğu bir yapı sergilemektedir.

Kolajen örneğine ait XRD deseninde ise belirgin kristalin pikler gözlenmemektedir.  $2\theta \approx 20^\circ$  civarında geniş, düşük şiddetli bir bant dışında herhangi bir karakteristik yansıma mevcut değildir. Bu durum, kolajenin uzun menzilli düzenlilikten yoksun, büyük oranda düzensiz bir moleküler yapıya sahip olduğunu ve kristalin faz içermediğini göstermektedir. Sonuç olarak kolajen örneği amorf yapı özellikleri göstermektedir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. PHB-t, PHB-b ve kolajene ait XRD Spektrumları

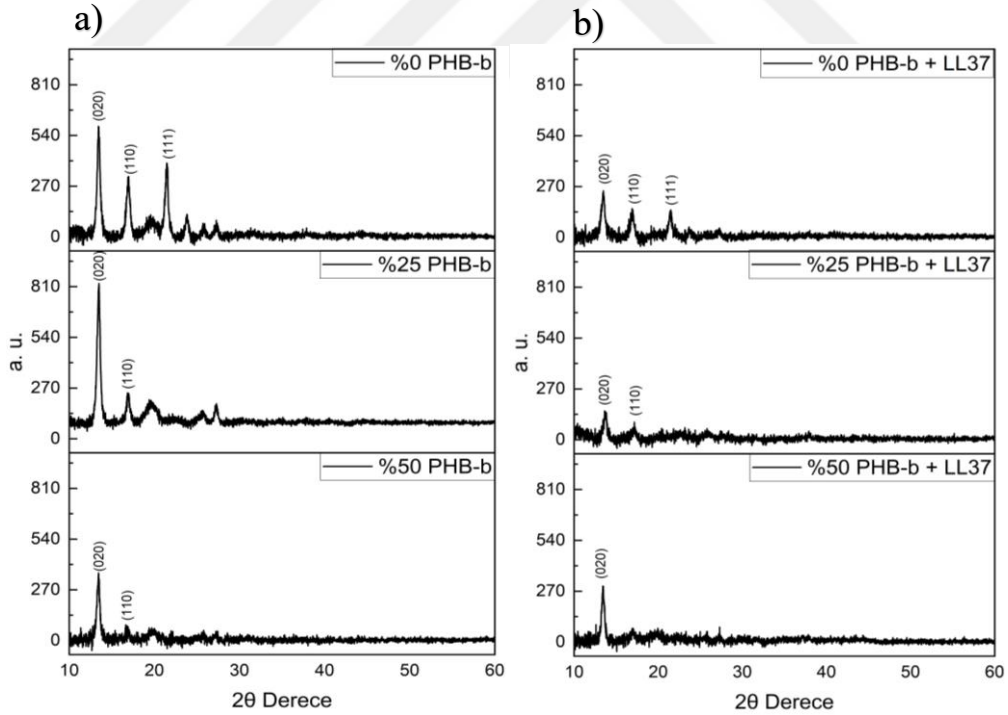
Şekil 4.5.(a)'da verilen X-ışını kırınımı (XRD) desenleri, %50 kolajen ve %50 PHB içeren üç farklı kompozit yapının kristalin özelliklerini karşılaştırmalı olarak sunmaktadır. Tüm numunelerde, PHB'ye ait karakteristik ortorombik kristal faz yansımaları olan (020), (110) ve (111) düzlemlerine karşılık gelen kırınım pikleri, özellikle  $2\theta \approx 13^\circ$ ,  $17^\circ$  ve  $22^\circ$  civarında belirgin şekilde gözlemlenmektedir. %0 PHB-b numunesi, yalnızca ticari PHB içerdiğinden, en yoğun ve keskin pik profiline sahiptir. Bu durum, yüksek molekül ağırlıklı (yaklaşık 500 kDa) ticari PHB'nin düzenli kristal bölgeler oluşturma yeteneğini ve yüksek kristallik derecesini yansıtmaktadır.

%25 PHB-b içeren numunede, kırınım pikleri benzer konumlarda bulunmasına rağmen şiddetlerinde azalma ve hafif pik genişlemeleri dikkati çekmektedir. Bu değişim, bakteriyel PHB'nin (yaklaşık 102 kDa) daha düşük molekül ağırlığına sahip olması nedeniyle kristal faz oluşumunu kısmen sınırlamasından kaynaklanmaktadır. Bakteriyel PHB'nin kısa zincir uzunluğu ve düşük zincir düzenliliği, kristal bölgelerde hizalanmayı zorlaştırarak amorf fazın katkısını artırmaktadır.

%50 PHB-b içeren numunede ise kristal piklerinin şiddetinde daha belirgin bir düşüş gözlemlenmektedir. Özellikle (111) düzlemine karşılık gelen pikin neredeyse

kaybolduğu görülmektedir. Bu durum, bakteriyel PHB oranının artmasıyla birlikte sistemin genel kristallik derecesinin anlamlı şekilde azaldığını göstermektedir. Artan bakteriyel PHB miktarı, amorf yapı içeriğini artırmakta ve kolajen ile birlikte kristalin fazların oluşumunu daha da engellemektedir. Aynı zamanda, kolajenin yapısal olarak amorf karakterde olması ve kristalin bölgelerde düzenlenmeye katkı sağlamaması, bu düşüşü daha da pekiştirmektedir.

Şekil 4.5.(b)'de sunulan XRD kırınımları kompozit numunelere antimikrobiyal peptid LL37'nin uygulanması sonrası elde edilmiştir. LL37 peptidinin kompozit sistemlere dahil edilmesi, PHB'nin kristalin yapısı üzerinde belirgin bir bozulmaya neden olmuş, kristallik derecesinde gözle görülür bir azalma meydana getirmiştir. %0 PHB-b + LL37 örneğinde ticari PHB'ye ait karakteristik (020), (110) ve (111) yansımaları hâlen gözlemlenebilmekle birlikte, bu piklerin şiddetinde azalma ve genişliklerinde artış tespit edilmiştir. Bu etki, %25 ve özellikle %50 PHB-b içeren örneklerde daha belirgin hâle gelmiş, kristalin fazlara ait yansımalar zayıflamış veya tamamen kaybolmuştur.



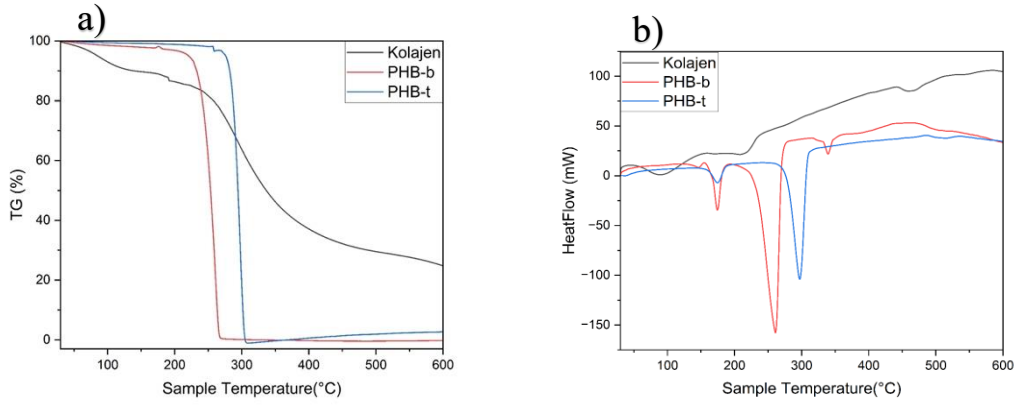
Şekil 4.5. a) %50 Kolajen ve %50 PHB(PHB-t + PHB-b) b) %50 Kolajen, %50 PHB(PHB-t + PHB-b) ve LL37 içeren numunelere ait XRD Spektrumları

Bu sonuçlar, LL37'nin polimer matrisindeki kristal yapı üzerine fiziksel bir müdahalede bulunduğunu göstermektedir. Molekül ağırlığı 4493 Da olan LL37, amfifilik

yapısı ve yüksek hareketliliği sayesinde PHB zincirleri arasına difüze olarak ikincil bağları zayıflatmakta, zincirler arası etkileşimleri engellemekte ve böylece kristalin bölgelerin oluşumunu baskılamaktadır. Bu etki, klasik plastikleştirici mekanizmalarıyla benzerlik göstermektedir. Özellikle bakteriyel PHB'nin düşük molekül ağırlığı nedeniyle daha kısa ve düzensiz zincir yapısına sahip olması, LL37'nin bu zincirler arasında daha kolay yerleşmesini ve kristal düzeni bozmasını kolaylaştırmaktadır. PHB-b oranındaki artış ve LL37 ilavesi, kristallik derecesini azaltarak polimer zincirlerinin hareketliliğini artırmakta; bu durum, liflerin daha kolay çekilmesini sağlayarak boyutsal olarak daha ince çaplı nanoliflerin elde edilmesine olanak tanımaktadır.

#### 4.2.3. TGA ve DSC Analizleri

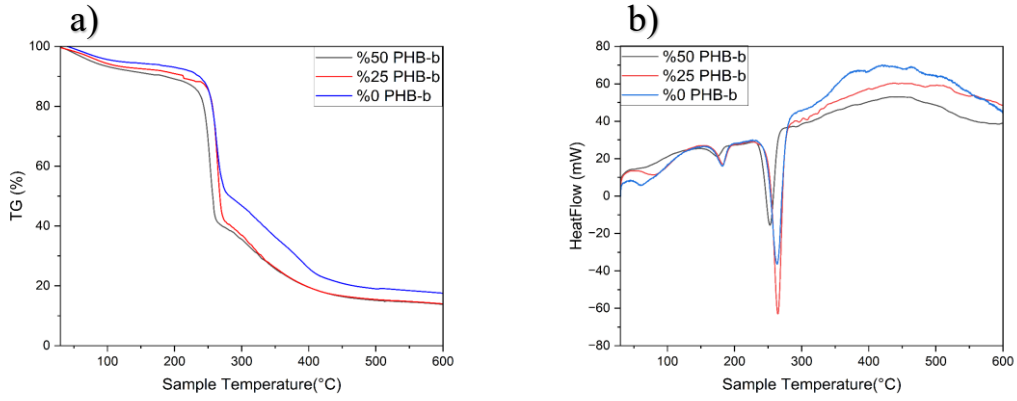
Şekil 4.6.'da verilen TGA ve DSC analizleri, ticari PHB (PHB-t), bakteriyel PHB (PHB-b) ve kolajenin termal davranışlarını karşılaştırmalı olarak ortaya koymaktadır. TGA eğrisine göre PHB-t yaklaşık 280–310 °C arasında, PHB-b ise 260–290 °C aralığında bozunmaya başlamaktadır. Bu durum, ticari PHB'nin yüksek molekül ağırlığına ve kristallik derecesine bağlı olarak daha geç bozunduğunu göstermektedir. PHB-b, daha kısa zincir uzunluğu ve düşük molekül ağırlığı nedeniyle daha erken bozunmakta ve daha az ısıl stabilite göstermektedir. Her iki PHB türü de tek kademeli, keskin bir bozunma profili sergilerken, kolajen çok kademeli bir bozunma eğrisi göstermektedir. İlk kütle kaybı 100 °C altında su ve uçucu bileşiklerin uzaklaşmasıyla gerçekleşirken, 250–350 °C aralığında protein zincirlerinin parçalanması, 400 °C üzerindeyse karbonlaşma evresi gözlemlenmektedir. Kolajenin kalan kalıntı miktarı oldukça yüksektir ve bu durum, organik yapısının parçalanmasından sonra bile inorganik veya karbon bazlı artıkların kalabildiğini göstermektedir.



**Şekil 4.6.** Ticari PHB (PHB-t), bakteriyel PHB (PHB-b) ve kolajenin (Kol) (a) termogravimetrik analiz (TGA) ve (b) diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) eğrileri

DSC analizleri, ısıl geçiş davranışlarını ortaya koymaktadır. PHB-t yaklaşık 175–180 °C’de belirgin, keskin ve yüksek entalpili bir erime piki verirken, PHB-b’de aynı sıcaklıkta daha geniş ve düşük şiddetli bir erime piki gözlemlenmektedir. Bu durum, PHB-t’nin yüksek kristallik derecesi ve homojen zincir yapısına işaret ederken, PHB-b’nin düşük molekül ağırlığına bağlı olarak kristalleşme kabiliyetinin zayıf olduğunu göstermektedir. Her iki PHB türü için yaklaşık 270–300 °C aralığında bozunmaya karşılık gelen ikinci bir endotermik geçiş de mevcuttur. Kolajene ait DSC eğrisinde gözlemlenen termal geçişler, çok aşamalı yapısal bozunma sürecini yansıtmaktadır. İlk olarak yaklaşık 105 °C civarında merkezlenen geniş endotermik pik, kolajenin yapısında tutulan serbest ve bağlı suyun uzaklaşmasına karşılık gelmektedir. Bu süreç, kolajenin higroskopik doğası nedeniyle yaygın olarak gözlemlenir. Ardından, yaklaşık 220 °C’de minimuma ulaşan ikinci bir endotermik geçiş gözlenmekte olup bu pik, kolajen moleküllerinin üç sarmallı (triple helix) yapısının bozulduğu denatürasyon sürecine işaret etmektedir. Denatürasyon, kolajenin ikincil ve üçüncül yapısının kaybıyla birlikte yapısal bütünlüğünü yitirmesi anlamına gelir. Yaklaşık 450 °C civarında gözlenen endotermik geçiş ise kolajenin pirolitik bozunma sürecini temsil etmektedir; bu noktada polipeptid zincirlerinin kimyasal yapısı parçalanmaya başlar (Cucos, t.y.).

Şekil 4.7.’de verilen TGA ve DSC analizleri, kolajen içeriği sabit tutularak PHB’nin farklı oranlarda bakteriyel kaynaklı olduğu (%0, %25 ve %50 PHB-b) üç farklı kompozit sistemin termal özelliklerini karşılaştırmalı olarak değerlendirmektedir. Bu analizler, bakteriyel PHB (PHB-b) oranındaki artışın kompozitlerin kristallik derecesi ve ısıl kararlılığı üzerindeki etkilerini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirildi.



**Şekil 4.7.** %0, %25 ve %50 oranlarında bakteriyel PHB (PHB-b) içeren PHB/Kolajen kompozitlerinin termal özellikleri: (a) Termogravimetrik analiz (TGA) eğrileri, (b) Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) eğrileri

TGA (Termogravimetrik Analiz) sonuçlarına göre, tüm numunelerde ana bozunma yaklaşık 280–310 °C aralığında gerçekleşmektedir; ancak bozunma profilleri PHB-b oranına bağlı olarak farklılık göstermektedir. En erken bozunma %50 PHB-b içeren numunede gözlemlenirken, bunu sırasıyla %25 ve %0 PHB-b içeren sistemler takip etmektedir. Bu durum, bakteriyel PHB'nin düşük molekül ağırlıklı ve kısa zincirli yapısı nedeniyle zincir uçlarının termal bozunmaya daha yatkın olmasından kaynaklanmaktadır. Buna karşılık, %0 PHB-b içeren kompozitte yalnızca ticari PHB bulunduğu için, yüksek molekül ağırlığına ve kristallik derecesine bağlı olarak bozunma daha geç başlamış ve daha kararlı bir profil sergilenmiştir.

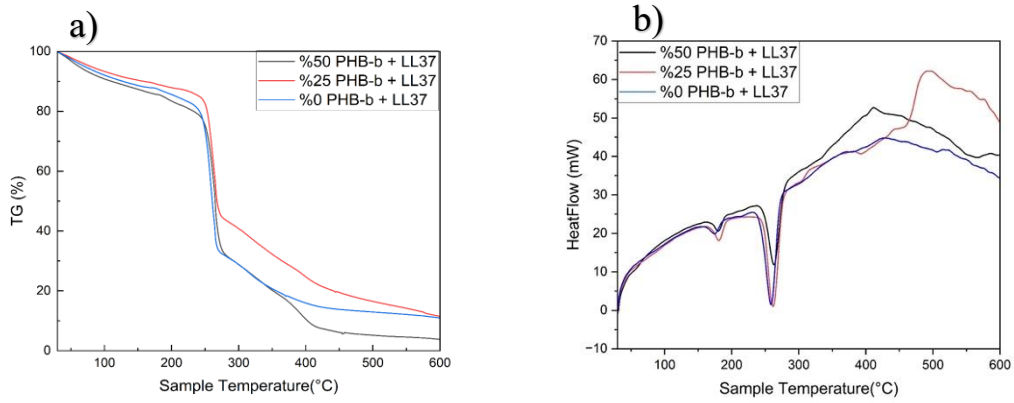
Kalıntı miktarları incelendiğinde, en yüksek kalıntı oranı %0 PHB-b içeren sistemde gözlemlenmiştir. PHB-b oranı arttıkça kalıntı miktarı azalmıştır. Bu durum, bakteriyel PHB'nin ticari PHB zincirleri arasına girerek kristal düzeni bozduğu, termal bozunmayı kolaylaştırdığı ve karbonlaşma eğilimini sınırladığı şeklinde yorumlanabilir. PHB-b'nin kısa ve düzensiz zincir yapısı, bozunma ürünlerinin daha uçucu olmasını sağlayarak kalıntı oluşumunu azaltmaktadır. Bu bulgular, PHB-b katkısının yalnızca kristallliği değil, aynı zamanda bozunma mekanizmasını da etkilediğini göstermektedir.

DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetri) verileri, kompozitlerin kristallik düzeyi ve ısıl geçiş davranışlarını değerlendirmektedir. Tüm numunelerde yaklaşık 175–180 °C civarında PHB'ye ait karakteristik erime pikleri gözlemlenmiştir. Ancak bu piklerin şiddeti PHB-b oranı arttıkça azalmaktadır. %0 PHB-b içeren örnek, keskin ve yüksek entalpili erime piki ile yüksek kristallik derecesini yansıtmaktadır. Buna karşın, %25 ve %50 PHB-b içeren sistemlerde erime pikleri daha geniş ve düşük şiddetlidir. Bu durum,

bakteriyel PHB'nin düşük molekül ağırlığına bağlı olarak kristal bölgelerin düzenli oluşumunu sınırladığını göstermektedir. Ayrıca 300–500 °C aralığında gözlenen farklı ısı akışı profilleri, bozunma kaynaklı ekzotermik olaylara işaret etmekte olup, artık organik kalıntıların oksidatif bozunması, yani içsel oksidasyon süreçleri ile ilişkilidir. Bu çok aşamalı geçişler, kolajenin protein yapısına özgü ısıl yanıtını ve kompleks bozunma davranışını açıkça yansıtmaktadır. Bu geçişlerin de PHB-b oranına bağlı olarak azaldığı görülmektedir (Davidenko vd., 2010).

Sonuç olarak, bakteriyel PHB oranındaki artış, kompozit sistemlerde hem ısıl kararlılığı azaltmakta hem de kristalin faz oluşumunu sınırlayarak yapının amorf karakterini artırmaktadır. Bu durum, TGA analizinde daha erken başlayan bozunma eğilimleri ve DSC analizinde erime piklerinin zayıflamasıyla tutarlıdır. Bulgular, bakteriyel PHB katkısının işlenebilirliği artırmakla birlikte, kristallik ve ısıl dayanım özelliklerinde belirgin azalmaya neden olduğunu ortaya koymaktadır.

Şekil 4.8.'de verilen TGA ve DSC analizleri, LL37 içeren PHB/Kolajen kompozitlerinde farklı oranlardaki bakteriyel PHB (PHB-b) katkısının termal davranış üzerindeki etkilerini göstermektedir. TGA verilerine göre, tüm numunelerde ana bozunma 280–310 °C aralığında gerçekleşmekte olup, bozunma başlangıç sıcaklığı PHB-b oranına bağlı olarak değişmektedir. En erken bozunma %50 PHB-b içeren sistemde gözlemlenirken, %25 ve %0 PHB-b içeren sistemler birbirine oldukça yakın bir bozunma profili sergilemektedir. Kalıntı miktarları açısından değerlendirildiğinde, %0 ve %25 PHB-b içeren kompozitlerdeki kalıntı oranları birbirine oldukça yakınken, %50 PHB-b içeren sistemde belirgin bir azalma görülmektedir. Bu durum, yüksek oranlı PHB-b katkısının zincir yapısını daha fazla bozarak bozunmayı kolaylaştırdığını ve karbonlaşmayı sınırladığını düşündürmektedir.



**Şekil 4.8.** LL-37 içeren ve farklı oranlarda bakteriyel PHB (PHB-b) içeren PHB/Kolajen kompozitlerinin termal özellikleri: (a) Termogravimetrik analiz (TGA) eğrileri, (b) Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) eğrileri

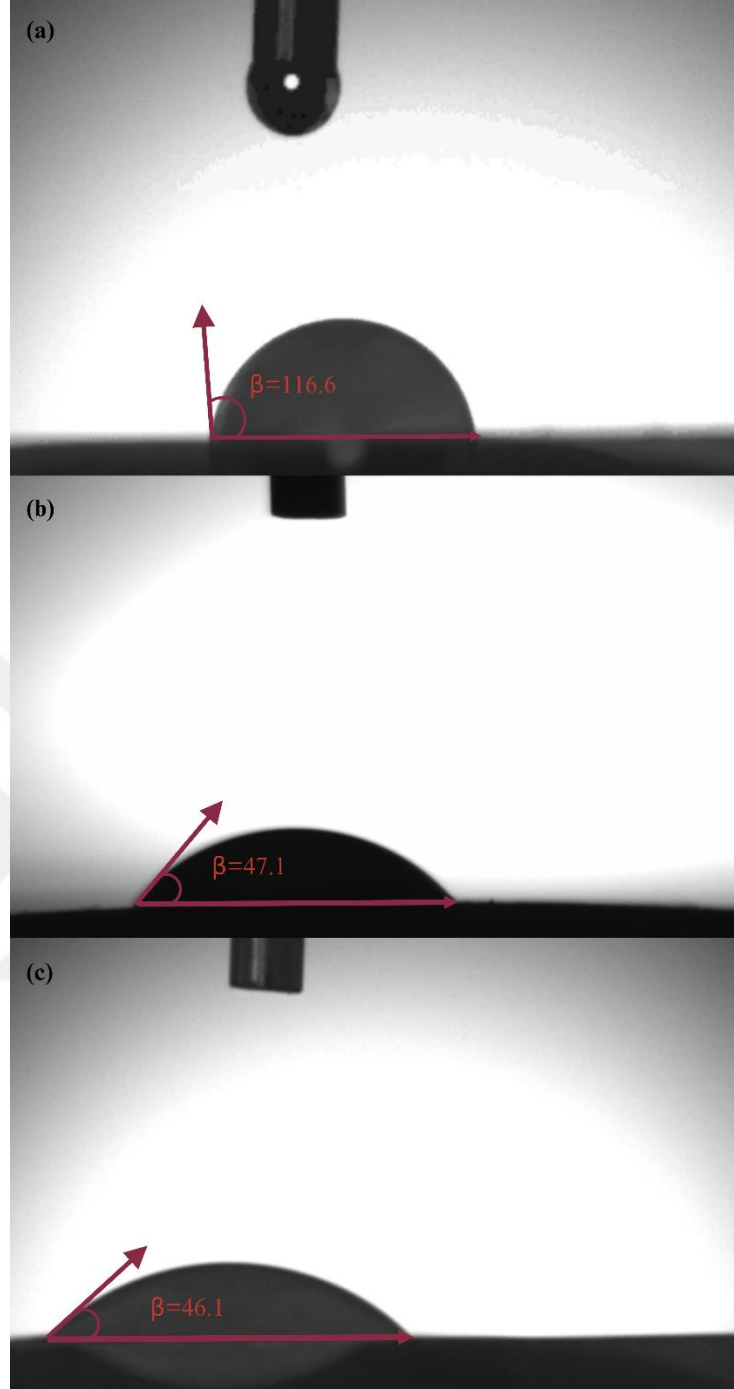
DSC verileri de bu eğilimle tutarlıdır. Yaklaşık 175–180 °C civarında gözlenen endotermik pikler PHB'nin erime davranışına karşılık gelmekte olup, bakteriyel PHB oranı arttıkça bu piklerin şiddeti azalmış ve genişlemiştir. Bu, PHB-b'nin kristal yapı oluşumunu sınırlayarak yapının daha amorf bir karakter kazanmasına neden olduğunu göstermektedir. 300–500 °C aralığında görülen geniş ekzotermik geçişler, PHB'den ziyade kolajene ait pirolitik bozunma ve içsel oksidasyon süreçlerine karşılık gelmektedir. Özellikle %25 PHB-b içeren sistemde bu geçiş daha belirgin olup, kolajen ve LL-37 arasındaki etkileşimlerin termal bozunmayı etkileyebileceğini düşündürmektedir. Genel olarak, PHB-b oranındaki artış kristallliği ve termal stabiliteyi azaltmakta; bu etki, LL-37'nin yapıya katkısıyla birlikte sistemin bozunma davranışını kompleks hale getirmektedir.

#### 4.2.4. Hidrofilik Profili Değerlendirmesi

Şekil 4.9, geliştirilen nanofibröz iskelelerin ıslatma özelliklerini değerlendirmek için kullanılan su temas açısı ölçümlerinin sonuçlarını göstermektedir. Her bir nanofiber yüzeyinin ölçülen temas açısı değerleri sunuldu. Yapılan bir çalışmada kristalin bölgeleri nedeniyle hidrofobik bir yapıya sahip olan PHB'nin nanofibröz iskelelerinin yüzeyinin su temas açısı değeri 91.49° olarak ölçülmüştür. PHB'nin CTS ile karıştırılmasıyla elde edilen PHB/CTS biyokompozit nanofibröz iskelelerin su temas açısı (WCA) 44,39° olarak ölçülmüştür ve PHB'ninkinden önemli ölçüde daha düşüktür. CTS'nin hidrofilikliği esas olarak hidrofilik amino ve hidroksil gruplarına atfedilmiştir. Sonuç

olarak, PHB ile harmanlandığında, lifli iskele örneğinin ıslanabilirliğini arttırdığı gözlemlenmiştir (Bayram Sarıipek, 2024). Kolajen nanofiberlerin yüzey ıslanabilirliği, statik su temas açısı ölçülerek araştırılmıştır. Bu test elektroğrılmış kolajen nanofiberler üzerinde gerçekleştirilmiştir, ancak bu biyopolimerin yüksek hidrofilikliği nedeniyle su damlacıkları hızla emilmiş ve elektroğrılmış Kol-pamuk, Kol/EPS1%-pamuk ve Kol/EPS2%-pamuk numuneleri için su temas açısının ölçülmesini imkansız hale getirmiştir (Naderi Gharahgheshlagh vd., 2024).  $\alpha$ -sarmal yapıya sahip LL-37 antimikrobiyal peptitler amfifilik özellik taşıyor; bu tür peptitlerin bir ucu hidrofilik, diğer ucu ise hidrofobik bir bölgeye sahiptir. Hidrofilik ve lipofilik yapı, antimikrobiyal peptitlerin antimikrobiyal işlevinin temelini oluşturur (C. Li vd., 2025).





Şekil 4.9. a) %0 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37, b) %25 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37, c) %50 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiber matların ortalama su temas açıları

Bu çalışmada da *Cereibacter sphaeroides*'ten ekstrakte edilen PHB, ticari olarak satın alınan PHB ve deniz kaynaklı kolajen harmanlanarak nanofiberler elde edildi. Elde edilen nanofiberler LL-37 antimikrobiyal peptit ile işlevselleştirildi. %0 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberinin su temas açısı 116.6° olarak ölçüldü. Bakteriyel PHB oranı %25 arttırılarak %25 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberinin su temas açısı 47.1° ölçüldü ve son olarak %50 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberinin su temas

açışı 46.1° ölçüldü. Bakteriyel PHB oranı arttıkça nanofiberin hidrofiliğinin arttığı, ıslatma davranışını belirgin bir şekilde iyileştirdiği gözlemlendi.

### 4.3. Hücre Kültürü Testleri

#### 4.3.1. Sitotoksikite Analizi

Geliştirilen PHB/Kolajen nanofiber yara örtüsü prototipinin L929 hücresi üzerinde sitotoksik etkisinin anlaşılması için XTT analizi yapıldı. Bu analizde nanofiberlerin L929 hücresi üzerindeki etkisinin anlaşılması için hem bakteriyel PHB yüzde oranları (%0, %25 ve %50) değiştirilip hem de LL-37 antimikrobiyal peptit varlığı değiştirilip hücre hattına uygulandı.

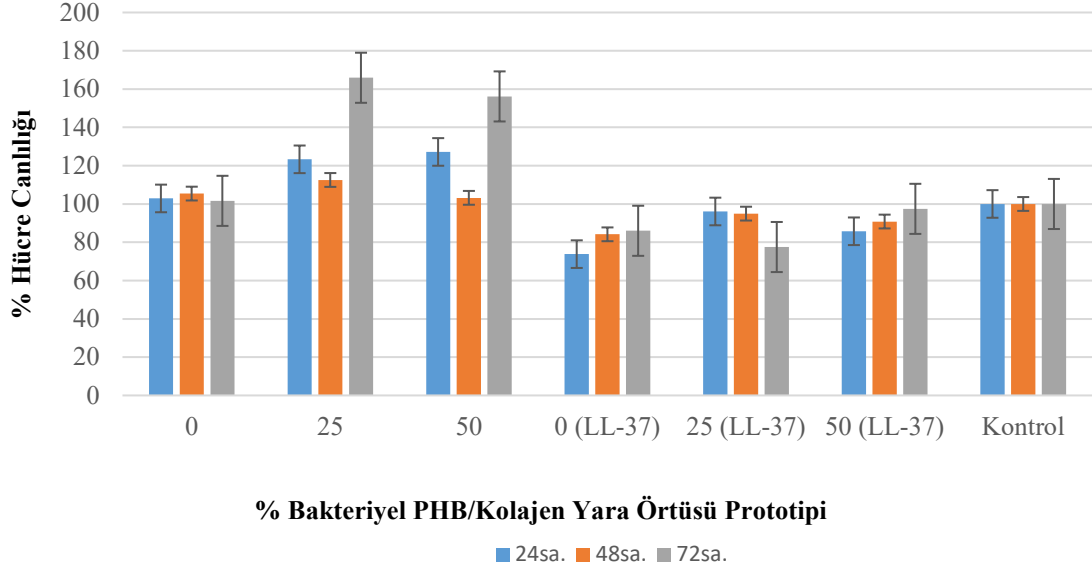
Fiber matlar hücre kültürü besiyerinde 24, 48, 72 saat bekletildi. Bu ekstreler kültür kabını kaplamış L929 hücreleri üzerinde 24 ve 48 saat inkübe edildi ve hücreler ters mikroskop altında 10X büyütme ile görüntülendi. Ekstrelerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri 48 saat inkübasyon ardından XTT sitotoksikite kiti kullanılarak da değerlendirildi. Kontrol hücre grubu proliferasyonu %100 kabul edilerek, test gruplarıyla inkübe edilen hücrelerin proliferasyonu belirlendi. L929 hücreleri üzerinde çözünmüş PHB türlerinin sitotoksik konsantrasyonları nanofiberler içerisinde kullanılan PHB miktarından 400-500 kat kadar yüksektir. HFIP’de çözünmüş PHB’nin mat içerisinde kullanılan miktarları toksik değildir (Tablo 4.2.).

**Tablo 4.2.** Ticari ve Bakteriyel PHB’lerin IC50 değerleri

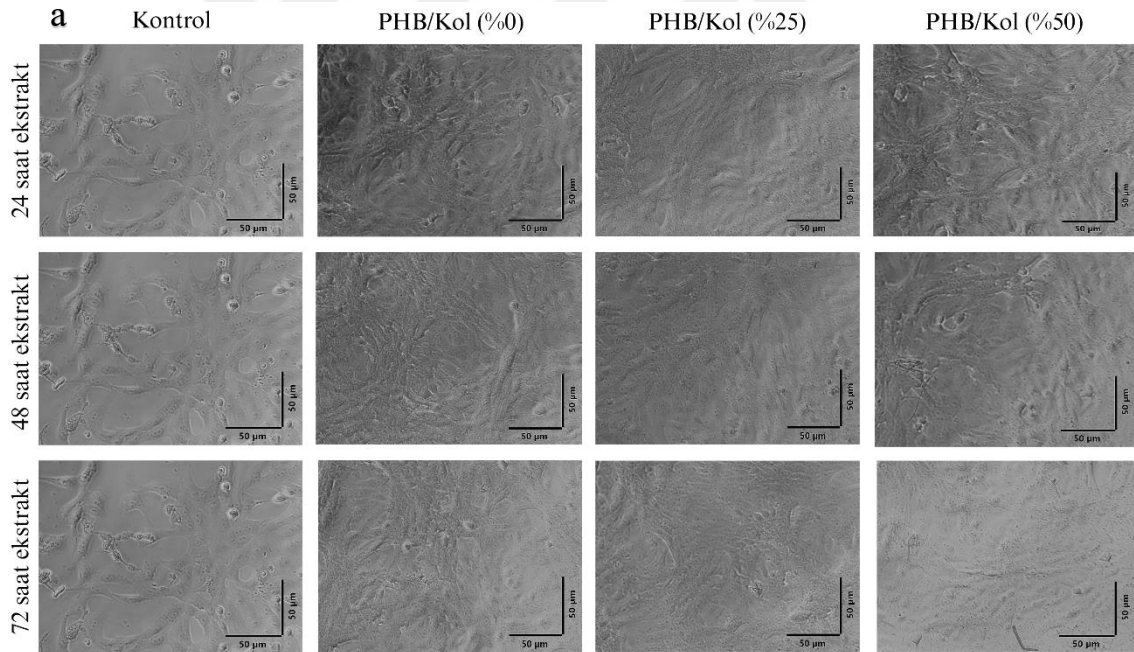
	PHB IC50 (g/mL)		
	T*	B**	
24 sa.	4.73	4.13	
48 sa.	5.36	4.88	
72 sa.	4.54	4.72	
Nanofiberlerin toplam PHB içeriği:			0.01 g/mL

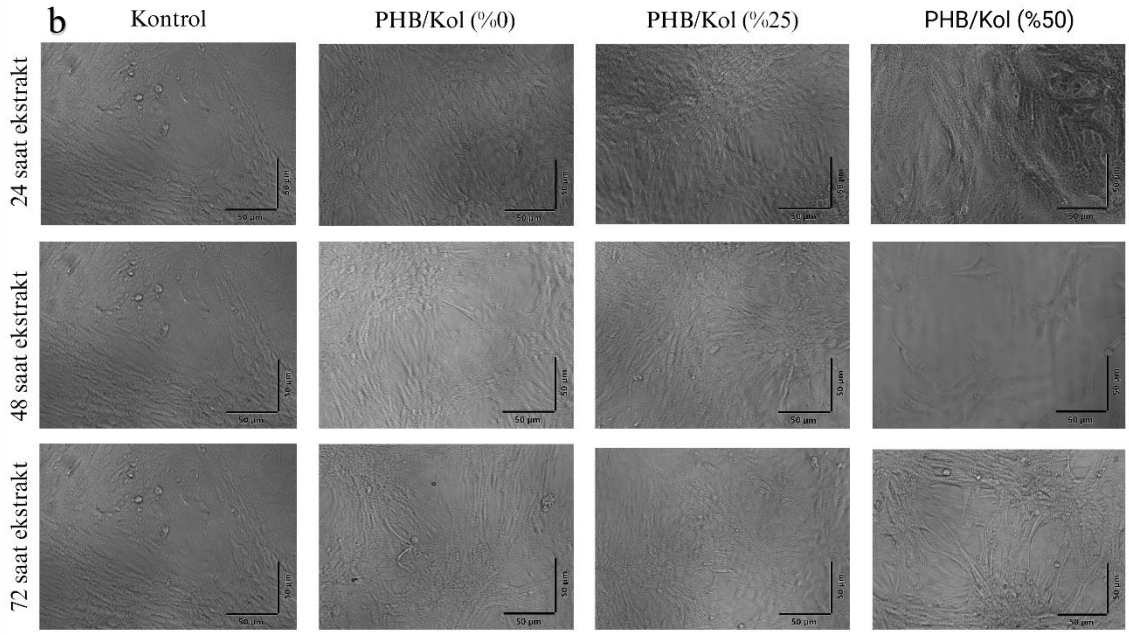
\*Ticari PHB, \*\*Bakteriyel PHB

Şekil 4.10’da XTT sonuçlarından anlaşılacağı üzere hücre proliferasyon değerleri %70 üzerinde bulundu. Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.’ye bakılıp hücrelerin morfolojileri de dikkate alındığında fiber mat türlerinin biyoyumlu oldukları değerlendirildi.

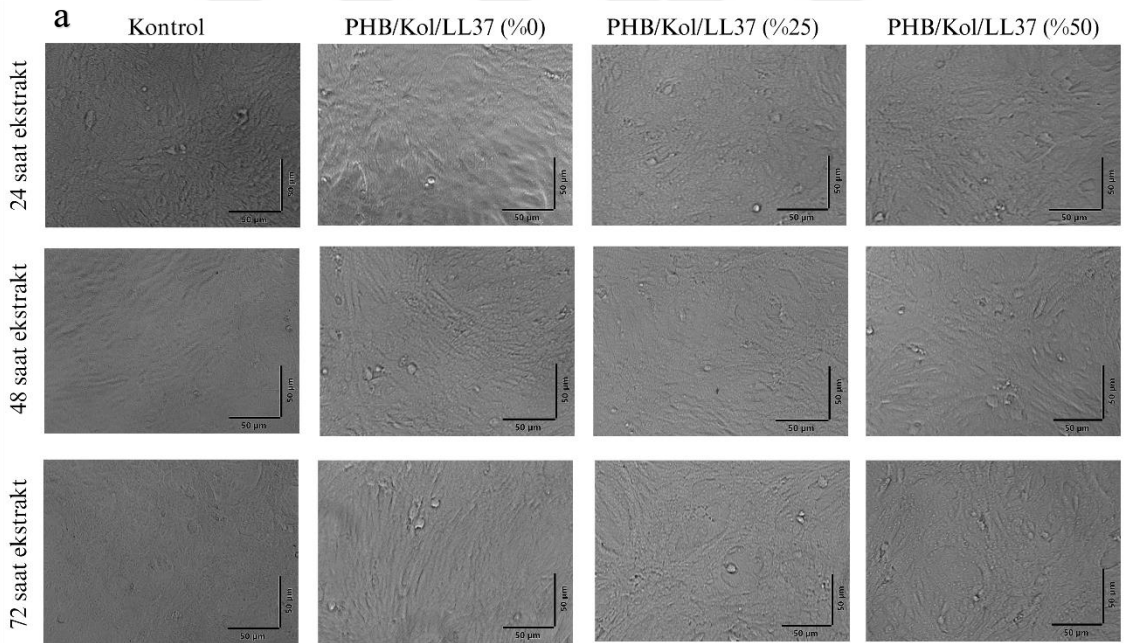


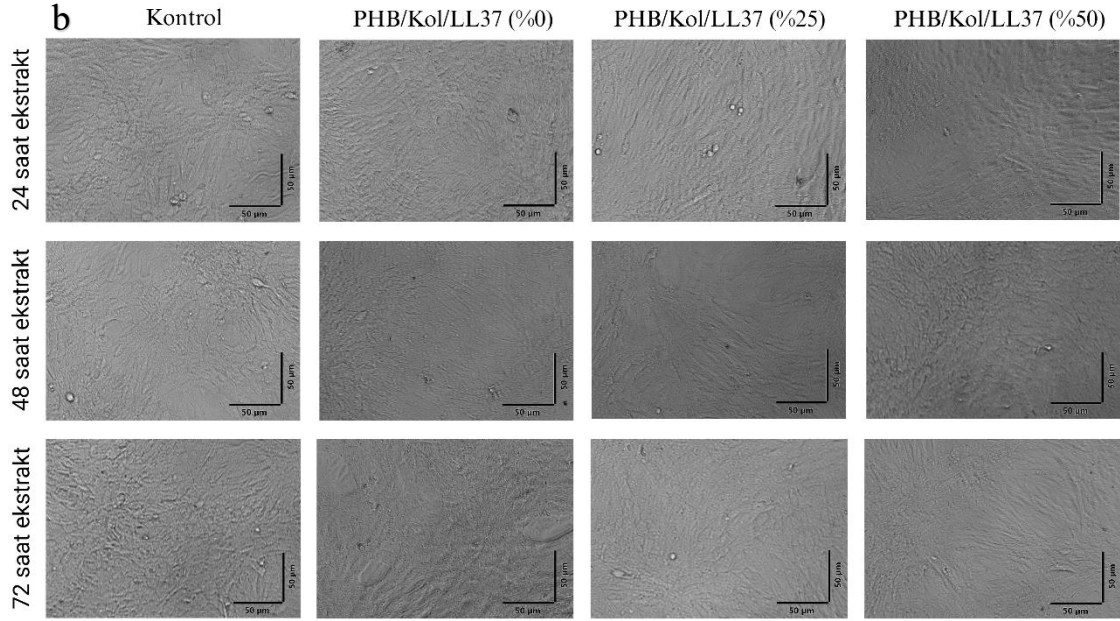
**Şekil 4.10.** %0, %25 ve %50 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberleri ile muamele edilmiş L929 hücre hattının XTT yöntemi kullanılarak elde edilen hücre canlılığı analiz sonuçları





**Şekil 4.11.** a) 24 saat PHB/Kolajen nanofiberiyle muamele edilmiş L929 hücresi mikroskop görüntüleri  
b) 48 saat PHB/Kolajen nanofiberiyle muamele edilmiş L929 hücresi mikroskop görüntüleri

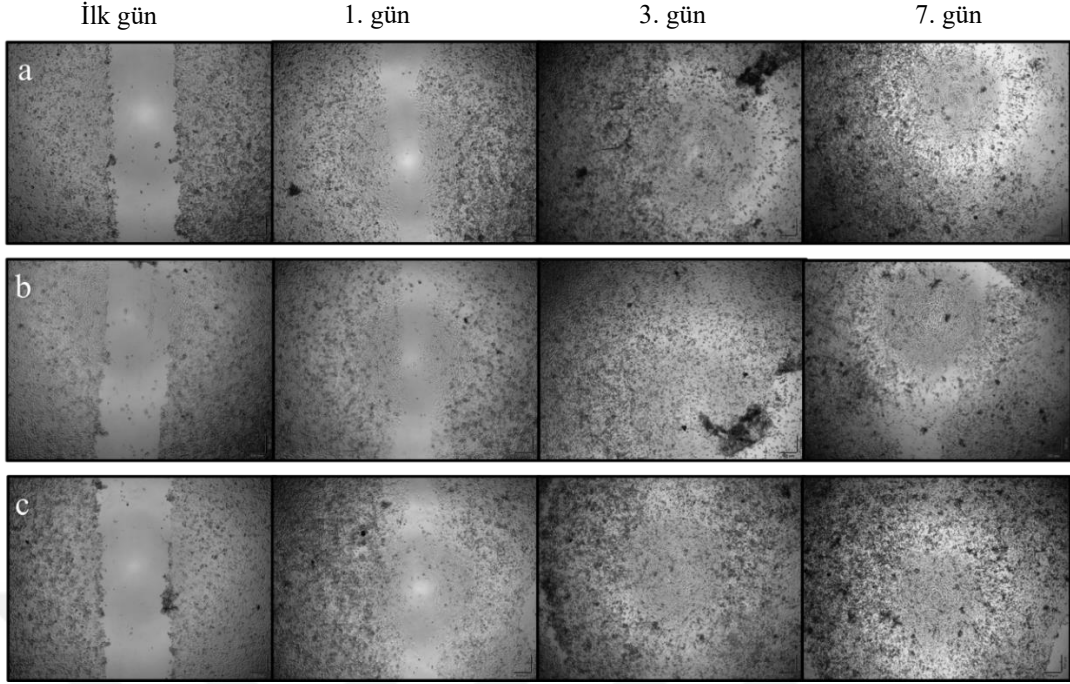




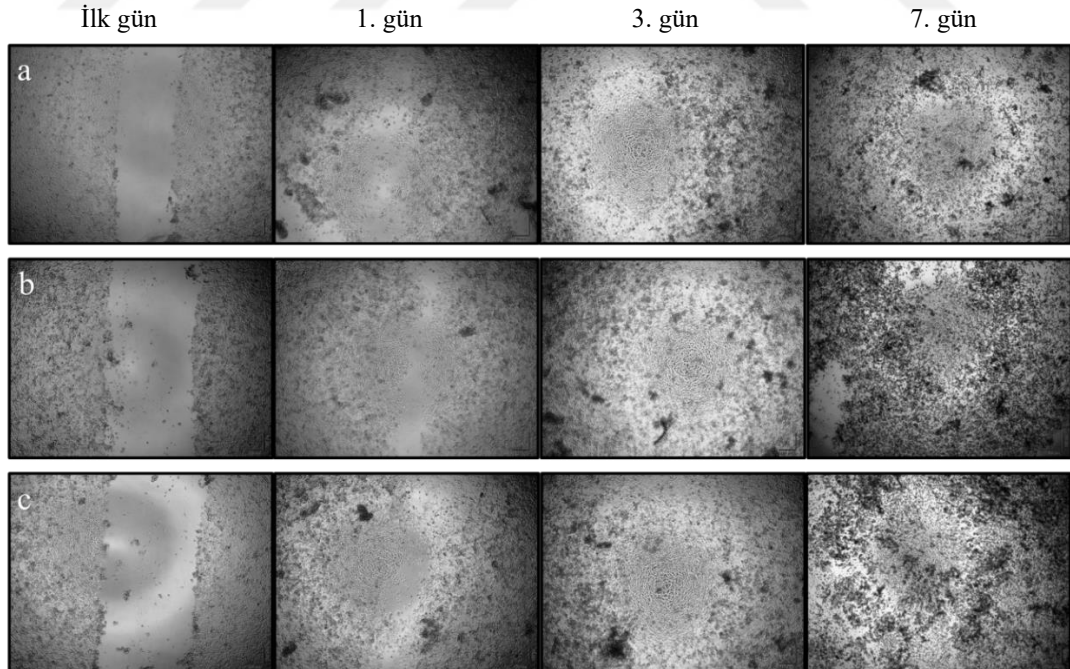
**Şekil 4.12.** a) 24 saat boyunca LL-37 antimikrobiyal peptitle işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen nanofiberiyle muamele edilen L929 hücresi mikroskop görüntüleri b) 48 saat boyunca LL37 antimikrobiyal peptitle işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen nanofiberiyle muamele edilen L929 hücresi mikroskop görüntüleri

#### 4.3.2. Çizik Testi

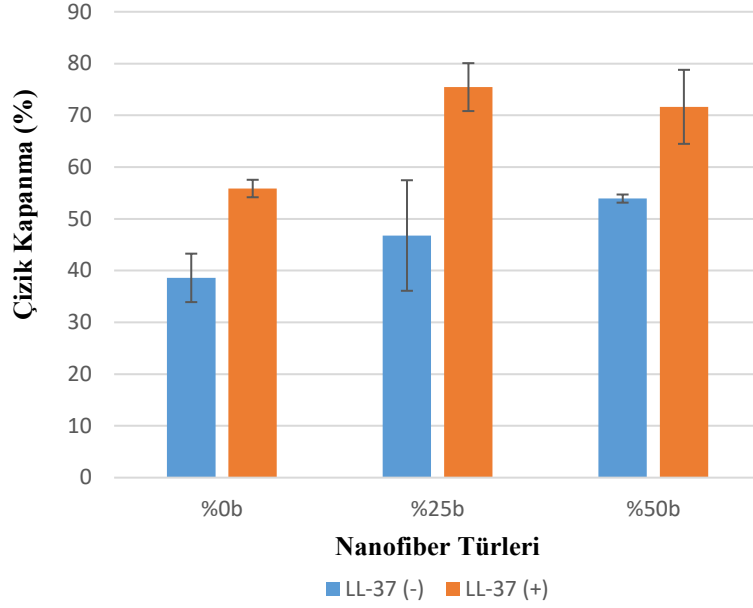
Şekil 4.13, %0 bakteriyel PHB/Kolajen, %25 bakteriyel PHB/Kolajen, %50 bakteriyel PHB/Kolajen ve Şekil 4.14, LL-37 ile işlevselleştirilmiş %0, %25 ve %50 PHB/Kolajen gibi çeşitli nanofiber gruplarında yara iyileşmesinin mikroskopik görüntüleri görülmektedir. Fahimirad ve arkadaşları tarafından 2024'te yapılan çalışmada PCL/PVA/CsLL37 ve PCL/PVA/CsVEGF'nin PCL/PVA gruplarına kıyasla yara iyileşmesini hızlandırmada daha üstün olduğunu göstermektedir (Fahimirad vd., 2024). Bu çalışmayla LL-37 antimikrobiyal peptidin yara iyileştirici etkisi vurgulanmıştır. Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.'de bulunan mikroskop görüntüleri üzerinden ölçüm yapılarak 1,3 ve 7. günlerdeki çizik kapanma yüzdeleri hesaplandı. Bu hesaplamalar karşılaştırıldığında, LL-37 ile işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen nanofiberlerde çizik kapanmasının %15-30 daha hızlı olduğu görüldü (Şekil 4.15.).



**Şekil 4.13.** Çizik Testi a) %0 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinin HS2 hücresine muamelesi sonucu sırasıyla ilk gün, 1, 3 ve 7.günlerde çizik kapanma mikroskop görüntüleri b) %25 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinin HS2 hücresine muamelesi sonucu sırasıyla ilk gün, 1., 3. ve 7.günlerde çizik kapanma mikroskop görüntüleri c) %50 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinin HS2 hücresine muamelesi sonucu sırasıyla ilk gün, 1., 3. ve 7.günlerde çizik kapanma mikroskop görüntüleri



**Şekil 4.14.** Çizik Testi. a) LL-37 ile işlevselleştirilmiş %0 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinin HS2 hücre hattına muamelesi sonucu sırasıyla ilk gün, 1., 3. ve 7.günlerde çizik kapanma mikroskop görüntüsü. b) LL-37 ile işlevselleştirilmiş %25 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinin HS2 hücre hattına muamelesi sonucu sırasıyla ilk gün, 1, 3 ve 7.günlerde çizik kapanma mikroskop görüntüleri. c) LL-37 ile işlevselleştirilmiş %50 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinin HS2 hücre hattına muamelesi sonucu sırasıyla ilk gün, 1., 3. ve 7.günlerde çizik kapanma mikroskop görüntüleri.



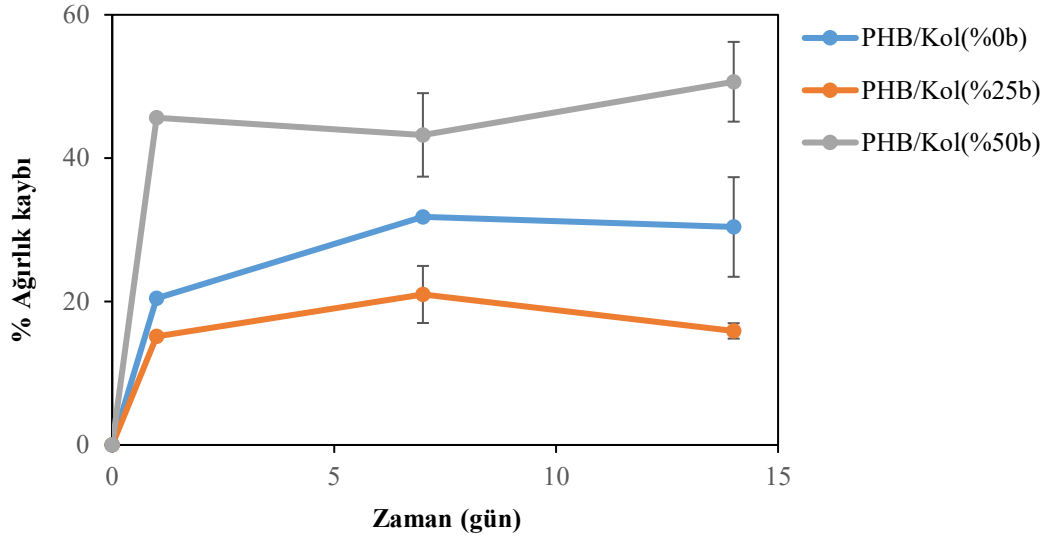
Şekil 4.15. HS2 hücre hattına çizilen çiziklerin kapanma yüzdeleri grafiği

#### 4.3.3. In Vitro Biyobozunurluk Testi

%0 bakteriyel PHB/Kol, %25 bakteriyel PHB/Kol ve %50 bakteriyel PHB/Kol nanofiber materyal örnekleri biyobozunurluk oranlarını belirlemek için 14 gün boyunca DMEM içerisinde bekletildi ve 1, 7 ve 14. günlerde ağırlıkları kaydedildi. Başlangıç ağırlığı tartıldıktan sonra DMEM'de bırakılan örnekler her hafta kaba suyu alınarak 37°C'de bir gün süreyle etüvde kurutuldu ve kalan ağırlıkları takip edildi. Ölçülen bu ağırlık değerlerine göre ağırlık kaybı ortalamaları hesaplandı (Tablo 4.3.). Şekil 4.16.'da verildiği gibi grafiksel ağırlık kaybı eğrisi çizildi.

Tablo 4.3. Ağırlık kaybı ortalama değerleri (%)

	PHB/Kol(%0b)	PHB/Kol(%25b)	PHB/Kol(%50b)
<b>ilk gün</b>	0	0	0
<b>1.gün</b>	20,45	15,15	45,65
<b>7.gün</b>	31,82	21±4	43,25±5,8
<b>14.gün</b>	30,40±7	15,91±1	50,66±5,56



**Şekil 4.16.** PHB/Kolajen nanofiber matların on dört günlük in vitro biyobozunurluk eğrileri

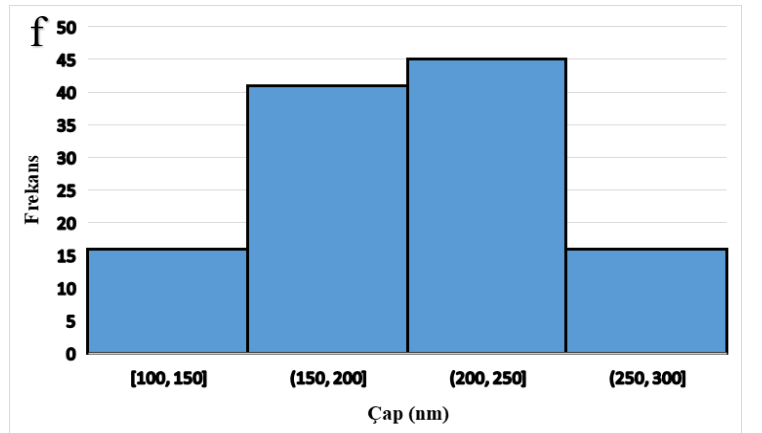
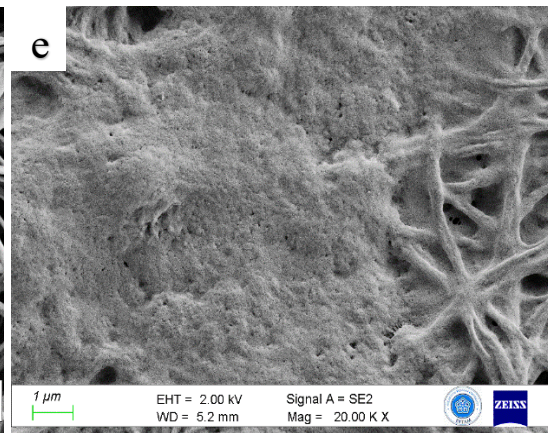
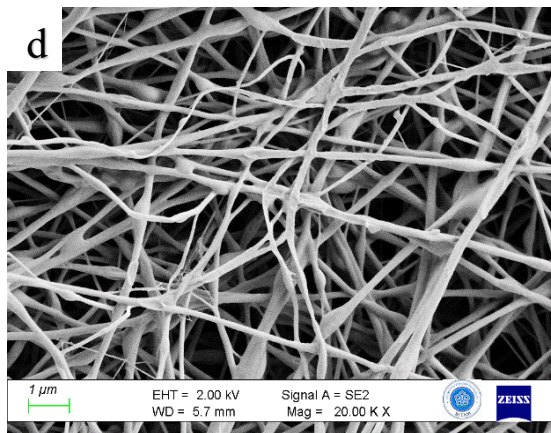
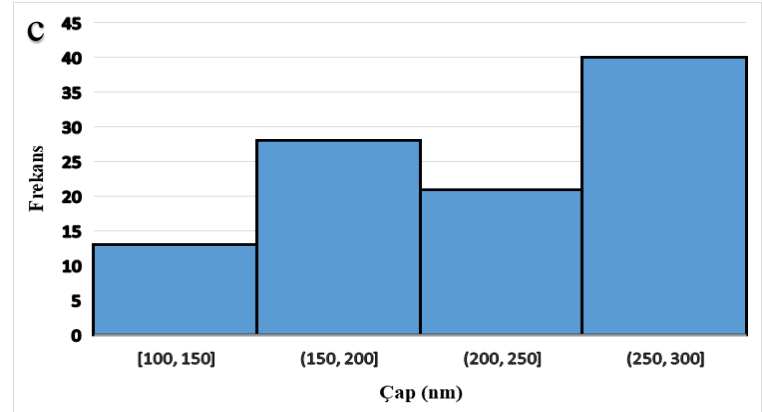
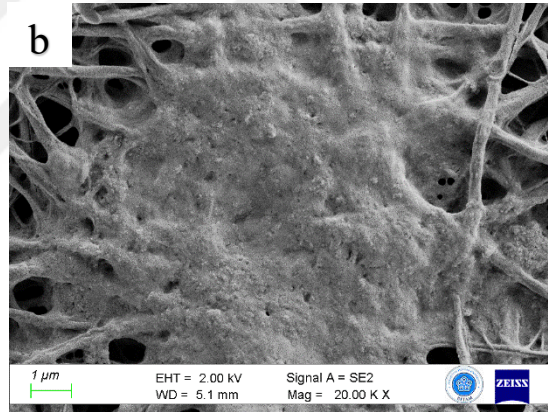
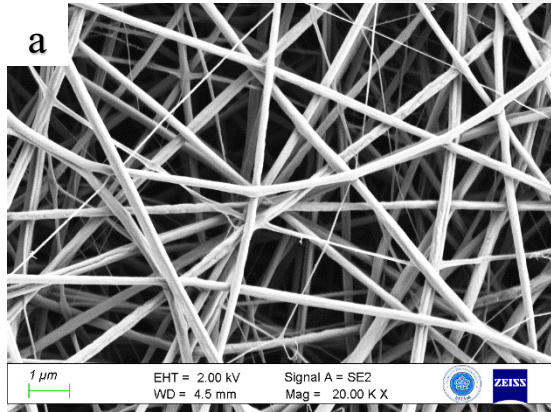
Zamana bağlı ağırlık kaybı (%) eğrilerinden, tüm numune türlerinin bozunma oranlarının %30 ile %50 arasında değiştiği görülmektedir. PHB/Kolajen (%0), PHB/Kolajen (%25) ve PHB/Kolajen (%50) nanofiberleri için ağırlık kayıpları 14 günün sonunda sırasıyla %30, %15 ve %50'dir. Ağırlık kaybı sonuçları karşılaştırıldığında, en yüksek ağırlık kaybı PHB/Kolajen (%50) numunesinde %50 olarak gözlenirken, en düşük ağırlık kaybı PHB/Kolajen (%25) numunesinde %15 olarak gözlemlendi.

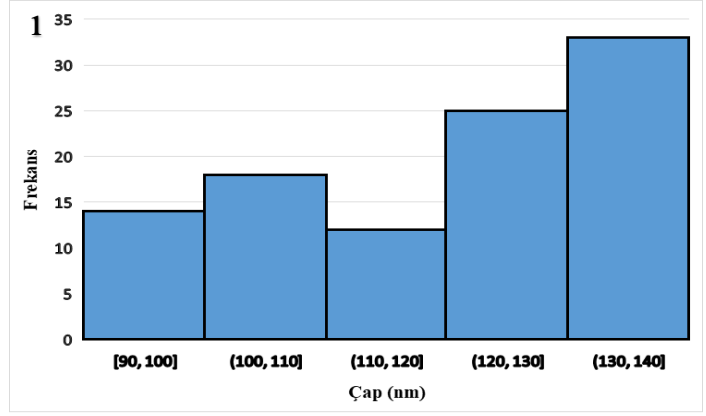
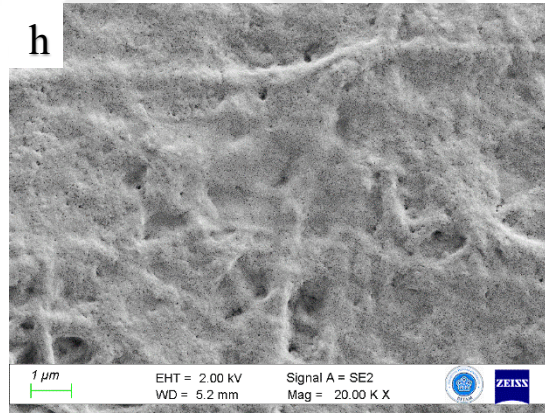
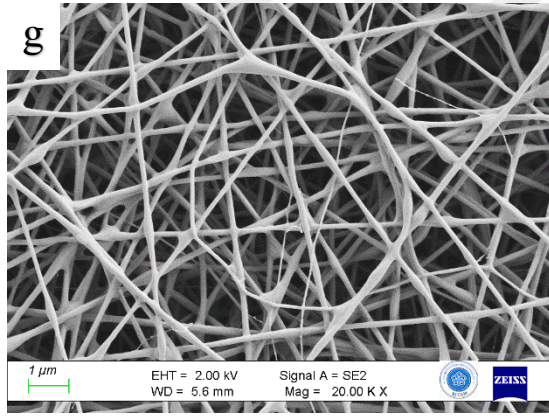
Mohammadalipour ve arkadaşları tarafından 2023'de yapılan çalışmada PHB, PCL polimerlerinin biyobozunurluk oranları test edilmiş ve iskelelerde lif çapının ve kristalliğin azalması, PBS'nin daha kolay nüfuz etmesine ve yüzey temasının artmasına yol açarak daha fazla biyolojik bozunabilirlikle sonuçlandığı gözlemlenmiştir (Mohammadalipour vd., 2023). Aynı doğrultuda bu çalışmada da %0, %25 ve %50 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberlerinde gittikçe azalan bir nanofiber çapı gözlemlendi. Sonuç olarak en ince fiber çapına sahip %50 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberi en fazla biyobozunulabilirliğe sahip nanofiber olduğu görüldü.

#### 4.4. Geliştirilen Nanofiberlerin Morfolojik Analizleri

Bakteriyel PHB/Ticari PHB ağırlık oranı (0/100, 25/75, 50/50) açısından farklılık gösteren çeşitli PHB/Kol (1:1) karışımlarının (HFIP içinde %2 w/v) elektroğirme işlemi, uygulanan voltaj ve/veya toplama mesafesi (yani iğnenin ucu ile dönen toplayıcının yüzeyi arasındaki mesafe) işlenen PHB/Kol karışımının bir fonksiyonu olarak ampirik olarak ayarlanarak başarıyla gerçekleştirildi. Mikroskopik olarak pürüzsüz bir morfoloji elde edildi. FESEM ile 20.00 KX büyütmede yapılan detaylı incelemeler, boncuklardan yoksun homojen bir ağ benzeri yapıyı ve nanofiberler üzerindeki LL-37 antimikrobiyal peptidi vurgulamıştır. ImageJ yazılımı kullanılarak mikrografların daha ileri analizi, her bir membran türü için ortalama fiber boyutunun ve fiber boyutu dağılımının tahmin edilmesine olanak sağlamıştır.

Viskozitenin, elektrostatik alan altında püskürtmeyi ve jet veya fiber incelmelerini etkileyen önemli bir parametre olduğu iyi bilinmektedir. Daha ince lifler, genellikle daha düşük viskoziteli polimer çözeltileri ile elde edilir. Bu nedenle, çözücünün özellikleri, polimerlerin moleküler ağırlığı, toplam polimer konsantrasyonu ve karışım bileşimi, belirli boyuttaki elektroğirilmiş fiberlerin sentezini etkileyen önemli faktörlerdir (Salvatore vd., 2018). Bu çalışmada bakteriyel PHB oranı arttıkça çözeltinin viskozitesi düşmüştür. Bu nedenle toplam PHB içerisinde bakteriyel PHB oranı arttıkça nanofiber kalınlıklarının daha homojen ve nanofiber çaplarının da daha ince olduğu gözlemlendi. Sırasıyla Şekil 4.17'de %0 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberlerinin çap ölçümlerinde yoğunluğun 250-300 nm, %25 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinde 200-250 nm ve %50 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinde 130-140 nm arasında çap dağılımı olduğu görüldü.

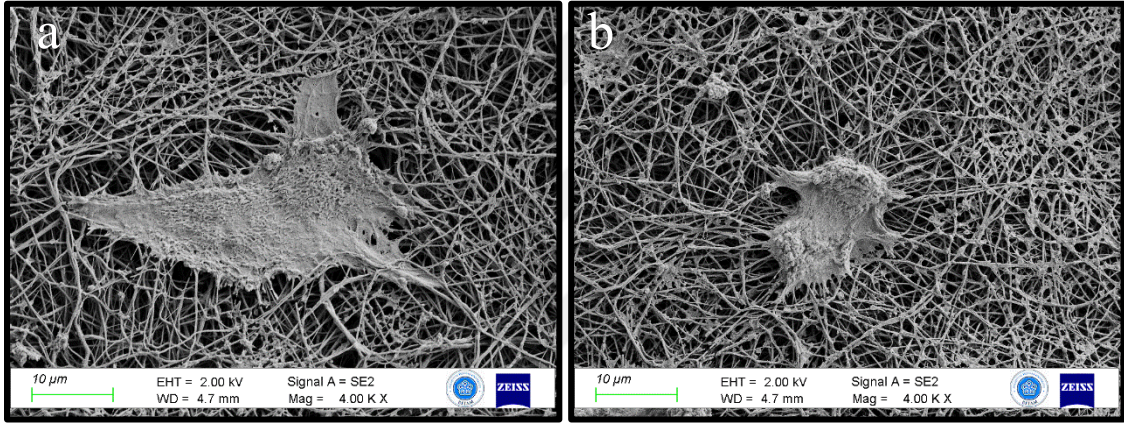




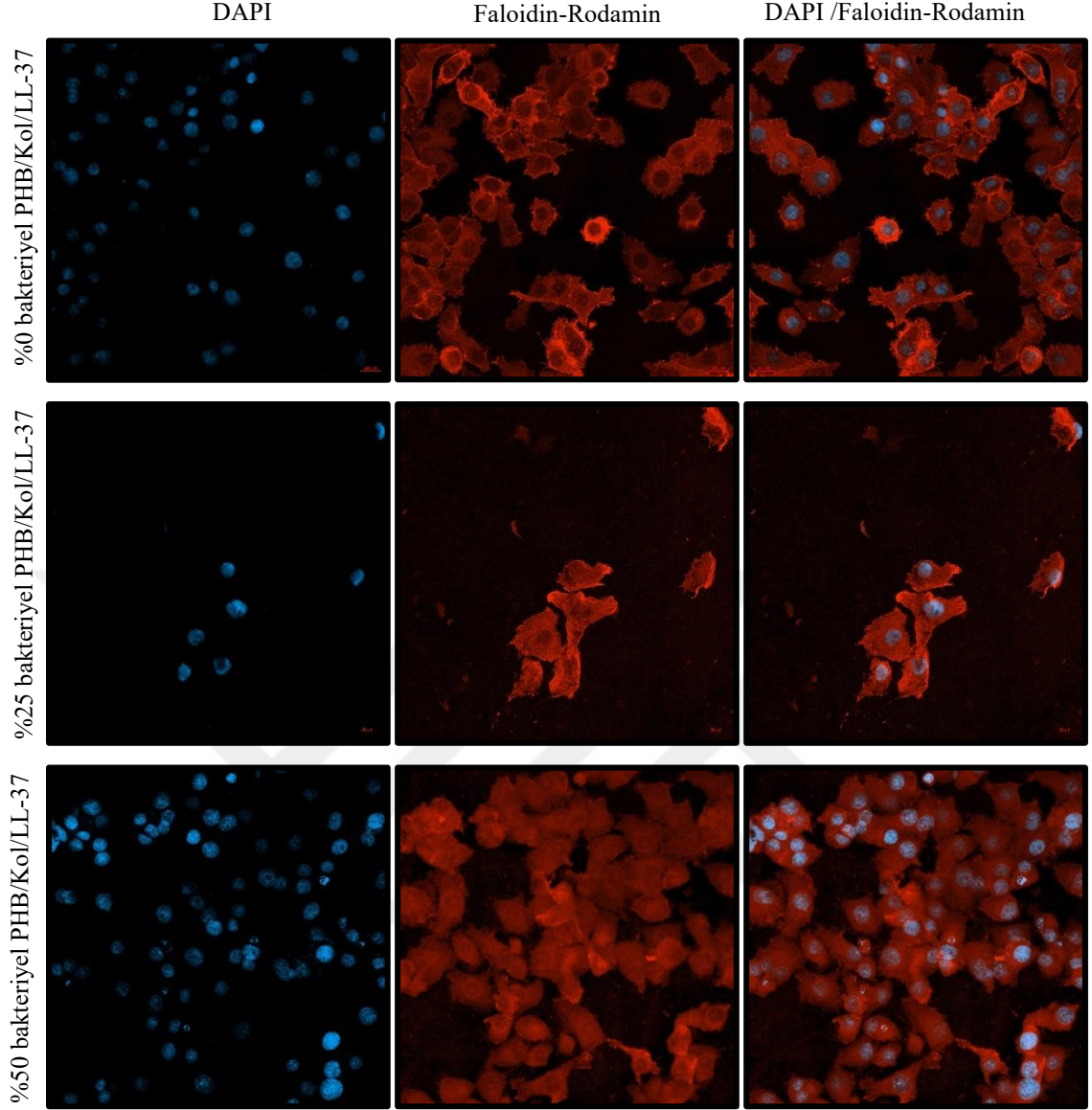
**Şekil 4.17.** a,b) %0 bakteriyel PHB/Kolajen, PHB/Kolajen/LL-37 d,e) %25 bakteriyel PHB/Kolajen, PHB/Kolajen/LL-37 g,h) %50 bakteriyel PHB/Kolajen, PHB/Kolajen/LL-37 nanofiber matlarının FESEM görüntüleri ve c) %0 bakteriyel PHB/Kolajen f) %25 bakteriyel PHB/Kolajen ı) %50 bakteriyel PHB/Kolajen çap dağılımı histogramları

#### 4.5. Nanofiber Yüzeyine Hücre Adezyonunun Değerlendirilmesi

Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da görülen PHB/Kolajen nanofiberlerinin FESEM ve konfokal mikroskop görüntülerinde olan nanofiberler üzerindeki hücre bağlanma profilleri, toksik aktivite göstermeyen PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberlerde hücre tutunmasının olduğunu gösterdi. Şekil 4.18'de L929 hücresi %50 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberine tutunmadı. Nanofiberin gözenek boyutları veya gözenek yapısından kaynaklanabileceği düşünüldü. Şekil 4.19'da bulunan konfokal görüntüsünde HS2 hücresinin %0, %25 ve %50 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberlerine tutunması gözlemlendi.



Şekil 4.18. L929 hücre hattının a) %0 bakteriyel PHB/Kolajen b) %25 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberlerine tutunmasının FESEM görüntüsü



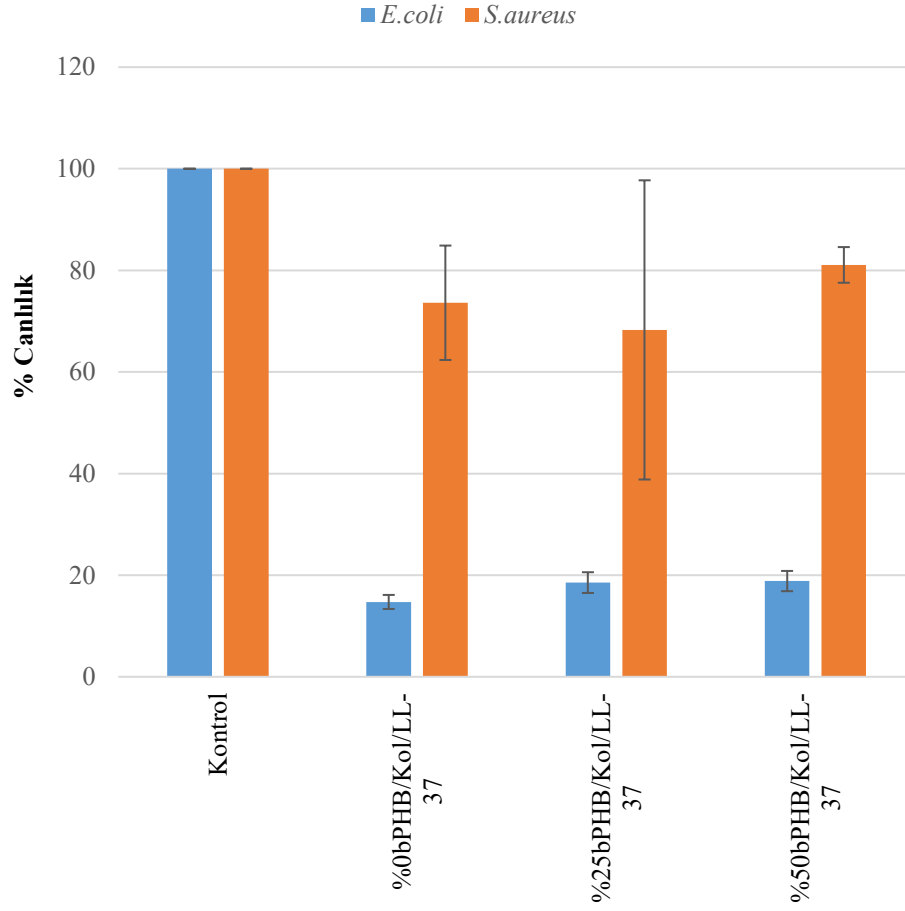
**Şekil 4.19.** Çeşitli PHB/Kolajen iskelelerine bağlı HS2 keratinosit hücrelerinin F-aktin boyaması. Çekirdek DAPI (mavi) ve F-aktin FITC-faloidin kullanılarak boyanmıştır. Tüm görüntüler için ölçek çubuğu 20 µm'dir.

#### 4.6. In Vitro Antibakteriyel Aktivite Değerlendirmesi

Antibakteriyel duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belirli bir bakteri türüne karşı in-vitro aktivitesini belirlemek için yapılır. Yaygın yara bakteriyel enfeksiyonunun temsili bakteri suşları *S. aureus* ve *E. coli* idi (Xu vd., 2024). Bu çalışmada, patojenik *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *E. coli* (ATCC 25922) bakteri suşlarına karşı LL-37 antimikrobiyal peptit ile işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen nanofiberleri ile muamele edilen bakterilerin canlılığı incelendi.

Bakteriyel enfeksiyonlar, inflamasyona yol açabilir, eksüda oluşumunu artırabilir ve yaraların onarım sürecini olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle, ideal bir yara örtüsünün antimikrobiyal özellikler taşıması oldukça önemlidir (Long vd., 2022). Önceki araştırmalar, LL-37'nin iyon kanalı oluşumu aracılığıyla bakteriyel biyofilmleri etkili bir şekilde inhibe ettiğini ve bozduğunu, ayrıca bakteriyel membran yüzeyinde yer alan LPS'ye karşı hızlı bağlanma afinitesi gösterdiğini, böylece bakterileri nötralize ederek güçlü antibakteriyel özellikler sergilediğini ortaya koymuştur (Bechinger, 2017). LL-37'nin antimikrobiyal mekanizmasıyla benzerlik taşıyarak PL/LL-37'nin mikrobiyal hücre membranlarında iyon kanalları oluşturarak ve bakteriyel membran endotoksinlerine bağlanarak hızlı bir bakterisidal aktivite gösterme potansiyeline sahip olduğunu tespit etmiştir (C. Li vd., 2025).

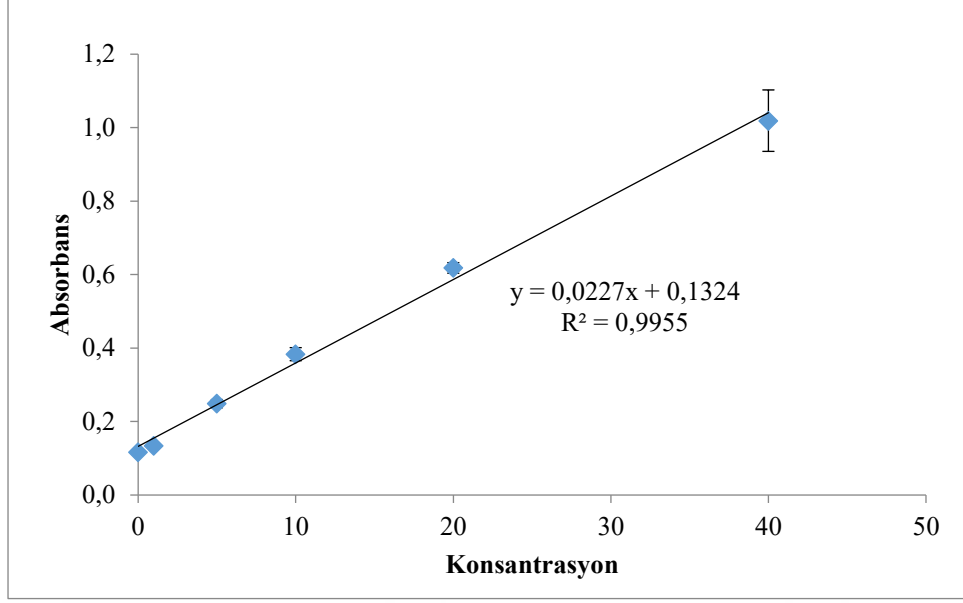
Bu çalışmada nanofiber diskler 25 µL LL-37 çözeltisi damlatıldığında disklerde 0,025 mg LL-37 eklenmiş olmaktadır. 100 µL hacimdeki kuyucuklara bu diskler yerleştirildiğinde ise salınımın tamamen gerçekleştiği var sayıldığında LL-37 derişiminin 55,6 µM olduğu hesaplandı. PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberleri muamelesi sonucu *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) ve *E. coli* (ATCC 25922) bakteri suşlarının canlılıkları % olarak hesaplandığında *Staphylococcus aureus* suşunun canlılığının %20-25, *E. coli* suşunun ise %80-85 azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.20.). Sonuç olarak *E. coli* suşunun LL-37 antimikrobiyal peptidine karşı daha dirençli olduğu görüldü. Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada LL-37, *E. coli*'ye kıyasla *S. aureus*'a karşı daha yüksek bir inhibitör etki göstermiştir. *S. aureus*'u inhibe etmek için gereken minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) 4 µmol/L iken, LL37'nin 32 µmol/L'lik bir MBC'si *E.coli*'ye karşı bakterisidal aktivite sağlamıştır (Z. Wang vd., 2025). Bu doğrultuda LL-37 antimikrobiyal peptit ile işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen nanofiberlerinin antibakteriyel aktivite gösterdiği kanıtlandı.



4.20. PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberlerinin antibakteriyel aktivite grafiği

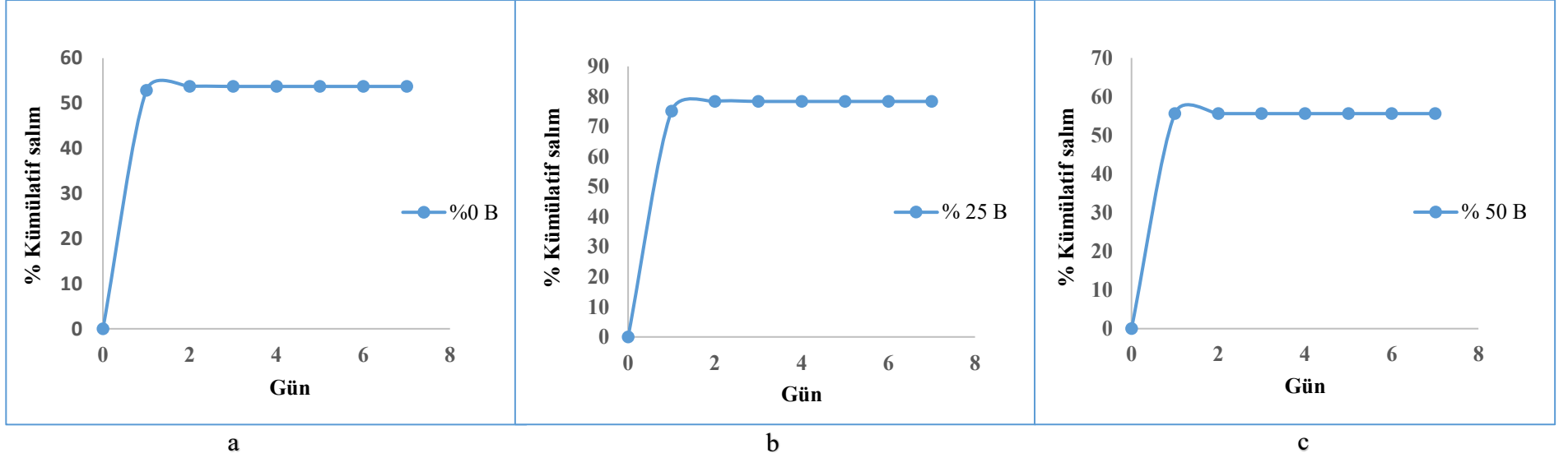
#### 4.7. Mikro BCA Salım Testi

%0, %25 ve %50 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberlerinin LL-37 varlığını kanıtlamak için Mikro BCA salım testi yapıldı. Farklı oranlarda bakteriyel PHB oranlara sahip nanofiberlerin salım kapasitesi karşılaştırıldı. Salım testi, albumin standardından çizdirilen absorbans-konsantrasyon eğrisine göre LL-37'nin konsantrasyon değeri 134,77 µg/mL olarak hesaplandı (Şekil 4.21.). %0 bakteriyel PHB içeren PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberden yedi gün sonunda kümülatif salım değeri  $53,73 \pm 23,44$  , %25 bakteriyel PHB içeren PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberden  $78,34 \pm 1,49$  iken %50 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberde  $55,61 \pm 8,55$  olarak gözlemlendi (Şekil 4.22.).



Şekil 4.21. Albumin standardına göre absorbans-konsantrasyon eğrisi

%(0-25-50) bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberleri yedi günlük kümülatif salım değerleri incelendiğinde ikinci güne kadar salımın bittiği gözlemlendi. Nanofiberlere yüklenen LL-37'nin hızlı bir şekilde salınarak ortama verildiği ifade edilebilir. Fiberlere yüklenen LL-37'nin eksik kalan salım değeri LL-37'nin degrade olması veya polimer/LL-37 etkileşiminden kaynaklanabilir (Felgueiras, 2017). PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberlerdeki LL-37 varlığı Mikro BCA yöntemiyle kanıtlandı.



Şekil 4.22. a) %0 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 b) %25 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 c) %50 bakteriyel PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberlerinin % kümülatif salım grafikleri

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Bakteriyel / ticari PHB (0/100, 25/100, 50/50) ağırlıkça farklı oranlarda kullanılarak %2 (w/v)'lik PHB/Kolajen (1:1 (w/w)) polimer çözeltisi hazırlandı. Polimer çözeltilerinde bakteriyel PHB oranı arttıkça çözeltinin viskozitesinin azaldığı gözlemlendi. Bu durum ise kullanılan PHB'lerin molekül ağırlığından kaynaklı olduğu düşünüldü (Salvatore vd., 2018). Polimer çözeltileri, elektroegirme yöntemi ile nanofiberlere dönüştürüldü ve LL-37 antimikrobiyal peptit ile işlevselleştirildi.

Nanofiberlerin karakterizasyonu FESEM, FTIR, XRD, TGA-DSC ve WCA analizleri ile gerçekleştirildi. Nanofiber çaplarına bakıldığında %0 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiber çap dağılımının 250-300 nm, %25 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinin çap dağılımının 200-250 nm ve %50 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinin ise 130-140 nm arasında çap dağılımı olduğu görüldü. Bakteriyel PHB oranı arttıkça çap dağılımının azaldığı gözlemlendi. Bu ince nanofiberler, yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonuna yönelik biyomedikal uygulamalar için avantajlı olabilecek özellikler sergilemektedir.

Bakteriden elde edilen PHB'nin karakterizasyonu, FTIR tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol ve standart referans olarak ticari PHB kullanıldı. Elde edilen PHB ile standart arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak, biyoplastik üretiminde bakteri kullanımı, sürdürülebilir bir dünya için yeni bir alternatif sunmaktadır. Ayrıca, biyopolimerlerin tıp alanında üretimi ve kullanımı, petrol bazlı plastikler yerine umut verici bir çözüm olarak ön plana çıkmaktadır.

Nanofiberlerin XRD analizi sonucunda bakteriyel PHB oranındaki artış ve LL-37 ilavesi, kristallik derecesini azaltarak polimer zincirlerinin hareketliliğini artırmakta; bu durum, liflerin daha kolay çekilmesine olanak tanıyarak daha ince çaplı nanofiberlerin elde edilmesini sağlamaktadır. TGA-DSC analiz sonucunda ise bakteriyel PHB katkısının işlenebilirliği artırdığı, ancak buna karşın kristallik ve ısıl dayanım özelliklerinde belirgin bir azalma meydana getirdiği görülmektedir.

Nanofiberlerin ıslanabilirlik testinde (WCA) ise bakteriyel PHB oranı arttıkça hidrofilik özelliğinin arttığını nanofiberlerin üzerinde damlacıkların temas açısı ölçülerek karar verildi. %0, %25 ve %50 PHB/Kolajen nanofiberleri su temas açısı

sırasıyla 116.6°, 47.1° ve 46.1° ölçüldü. Bu nedenle, elde edilen sonuçlar, PHB/Kolajen/LL-37 nanofibröz iskelelerin geliştirilmiş hidrofilik özelliklerinin, yara örtüleri gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda potansiyel kullanımını desteklediğini göstermektedir. Öte yandan yara sargısı malzemelerinin, yara ile temas eden yüzeyinin hidrofilik özellik taşıması, hücrelerin sargı yüzeyine yapışmasını kolaylaştırmakta ve böylece yara kapanma ve iyileşme sürecini hızlandırmaktadır.

Hücre kültürü analizlerinde %0, %25 ve %50 bakteriyel PHB/Kolajen ve LL-37 ile işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen nanofiberleri L929 fibroblast hücre hattı üzerinde sitotoksikite analizi yapıldı. Her iki türdeki nanofiberlerde hiçbir toksik etki görülmedi. Hücre proliferasyonları %70 üzerinde analiz edildi. HS2 hücre hattında ise çizik testi uygulandı. Çizik testi sonucunda ise LL-37 ile işlevselleştirilmiş PHB/Kolajen nanofiberlerin hücre üzerindeki çizik boyunu %15-30 daha hızlı kapattığı görüldü. In vitro biyobozunurluk sonucunda fiber çapının en ince olduğu %50 bakteriyel PHB/Kolajen nanofiberinin %50 oranında daha fazla biyobozunur olduğu görüldü.

%0, %25 ve %50 PHB/Kolajen/LL-37 nanofiberlerinin FESEM görüntülerinde bakteriyel PHB oranı arttıkça nanofiberlerin fiber çaplarının azaldığı gözlemlendi. Bu ince nanofiberler, yara iyileşmesi ve doku yenilenmesi gibi biyomedikal uygulamalar için avantaj sağlayabilecek özellikler sergilemektedir. FESEM görüntülerinde LL-37 antimikrobiyal peptit bulunmayan nanofiberlerle LL-37 antimikrobiyal peptit bulunan nanofiberler karşılaştırıldığında LL-37 peptid immobilizasyonundan sonra PHB/Kolajen nanofiberlerinin yüzey morfolojisinin değiştiği gözlemlendi. PHB/Kolajen nanofiber yüzeyinde önemli farklılıklar görüldü ve LL-37 peptidinin biyobozunur nanofiber yüzeyine başarılı bir şekilde yerleştirildiği tespit edildi. LL-37 antimikrobiyal peptidin nanofiberdeki varlığı Mikro BCA salım testiyle de kanıtlandı.

FESEM ve konfokal mikroskopta L929 ve HS2 hücre hatlarının PHB/Kolajen nanofiber yüzeyine tutunması gözlemlendi. Nanofiber yüzeyinin toksik bir etkisinin olmadığı ve biyoyumlu olduğu anlaşıldı. In vitro antibakteriyel test sonucunda ise *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) ve *E. coli* (ATCC 25922) bakteri suşları kullanılarak LL-37 antimikrobiyal peptidin antibakteriyel etkinliği değerlendirildi. LL-37 antimikrobiyal peptit ile işlevselleştirilmiş nanofiberlerin bakteri suşlarının üzerinde etkili olduğu ve antibakteriyel etkinlik gösterdiği tespit edildi. Bu araştırma, biyopolimerlerin tıbbi uygulamalarda kullanımına ilişkin önemli bilgiler sağlamak ve bakteriyel kaynaklı PHB'nin üstün biyoyumluluğunu, yara iyileşmesindeki etkinliğini ve LL-37'nin antimikrobiyal aktivitesini vurgulamaktadır.

## 5.2. Öneriler

- LL-37 antimikrobiyal peptidin antibakteriyel etkinliği, daha geniş antimikrobiyal spektrumda denenebilir.
- In vitro olarak yapılan araştırmalar 3-boyutlu doku modellerinde veya in vivo çalışmalar ile desteklenebilir.
- PHB/Kolajen yara örtüsü prototipi ticari olarak değer kazandırılabilir.
- LL-37 antimikrobiyal peptidin nanofiberden daha uzun süreli salımı için katman katman birleştirme tekniği kullanılarak uzun süreli salımı sağlanabilir.



## 6. KAYNAKLAR

- Algur, D. Ö. F. (2018). Poli- $\beta$ -(3)hidroksibütirat (PHB) sentezleyen mikroorganizmaların izolasyonu, karakterizasyonu ve PHB üretiminin optimizasyonu. Nur Betül KARTAL. <https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500.12812/48118>
- Ambekar, R. S. (2019). Advancements in nanofibers for wound dressing: A review. *European Polymer Journal*, 117, 304-336. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.05.020>
- Amir, M., Rizvi, S. F., Asif, M., Ahmad, A., Alshammari, M. B., Gupta, A., Zaheer, M. R., & Roohi, R. (2024). Polyhydroxybutyrate (PHB) bioplastic characterization from the isolate *Pseudomonas stutzeri* PSB1 synthesized using potato peel feedstock to combat solid waste management. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 57, 103097. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103097>
- Arif, Z. U., Khalid, M. Y., Noroozi, R., Hossain, M., Shi, H. H., Tariq, A., Ramakrishna, S., & Umer, R. (2023). Additive manufacturing of sustainable biomaterials for biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(3), 100812. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2023.100812>
- Azimi, B., Maleki, H., Zavagna, L., De La Ossa, J. G., Linari, S., Lazzeri, A., & Danti, S. (2020). Bio-Based Electrospun Fibers for Wound Healing. *Journal of Functional Biomaterials*, 11(3), 67. <https://doi.org/10.3390/jfb11030067>
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(5), 585-601. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>
- Bayram Sariipek, F. (2024). Biopolymeric nanofibrous scaffolds of poly(3-hydroxybutyrate)/chitosan loaded with biogenic silver nanoparticle synthesized using curcumin and their antibacterial activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 256, 128330. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128330>
- Bechinger, B. (2017). Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of Dental Research*, 96(3), 254-260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>
- Borda, L. J., Macquhae, F. E., & Kirsner, R. S. (2016). Wound Dressings: A Comprehensive Review. *Current Dermatology Reports*, 5(4), 287-297. <https://doi.org/10.1007/s13671-016-0162-5>
- Conoscenti, G., Carrubba, V. L., & Brucato, V. (2017). A Versatile Technique to Produce Porous Polymeric Scaffolds: The Thermally Induced Phase Separation (TIPS) Method. *Archives in Chemical Research*, 01(02). <https://doi.org/10.21767/2572-4657.100012>

- Cucos, A. (t.y.). The Suitability of the DMA Method for the Characterization of Recent and Historical Parchments and Leathers.
- Davidenko, N., Campbell, J. J., Thian, E. S., Watson, C. J., & Cameron, R. E. (2010). Collagen–hyaluronic acid scaffolds for adipose tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 6(10), 3957-3968. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.05.005>
- Dut, E. (t.y.). Farklı Ortam Koşullarında *Bacillus thuringiensis* RSKK 381'İN Üreme ve Biyoplastik Üretiminin Araştırılması.
- Fahimirad, S., Khaki, M., Ghaznavi-Rad, E., & Abtahi, H. (2024). Investigation of a novel bilayered PCL/PVA electrospun nanofiber incorporated Chitosan-LL37 and Chitosan-VEGF nanoparticles as an advanced antibacterial cell growth-promoting wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 661, 124341. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124341>
- Felgueiras, H. P. (2017). Functionalization of electrospun polymeric wound dressings with antimicrobial peptides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 156, 133-148. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.001>
- Flaig, F., Hébraud, A., Lobry, E., Favier, D., Egele, A., Kékicheff, P., Joanne, P., Agbulut, O., & Schlatter, G. (2024). Biomimetic three-dimensional scaffolds with aligned electrospun nanofibers and enlarged pores for enhanced cardiac cell colonization. *Materials & Design*, 248, 113481. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2024.113481>
- Foroutan Koudehi, M., Imani Fooladi, A. A., Aghozbeni, E. A. H., & Nourani, M. R. (2019). Nano bioglass/gelatin scaffold enhanced by nanosilver as an antibacterial conduit for peripheral nerve regeneration. *Materials Technology*, 34(13), 776-784. <https://doi.org/10.1080/10667857.2019.1628332>
- Gobi, R., Ravichandiran, P., Babu, R. S., & Yoo, D. J. (2021). Biopolymer and Synthetic Polymer-Based Nanocomposites in Wound Dressing Applications: A Review. *Polymers*, 13(12), 1962. <https://doi.org/10.3390/polym13121962>
- Güneş Çimen, C., Dündar, M. A., Demirel Kars, M., & Avcı, A. (2022). Enhancement of PCL/PLA Electrospun Nanocomposite Fibers Comprising Silver Nanoparticles Encapsulated with *Thymus Vulgaris* L. Molecules for Antibacterial and Anticancer Activities. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 8(9), 3717-3732. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c00611>
- Hemmati, F., Bahrami, A., Esfanjani, A. F., Hosseini, H., McClements, D. J., & Williams, L. (2021). Electrospun antimicrobial materials: Advanced packaging materials for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 520-533. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.014>
- Jang, S. A., Park, J. H., Lim, H. J., Oh, J. Y., Ki, H. B., Lee, K. J., Song, J. K., & Kim, D.-M. (2021). Bio-specific immobilization of enzymes on electrospun PHB nanofibers. *Enzyme and Microbial Technology*, 145, 109749. <https://doi.org/10.1016/j.enzmitec.2021.109749>

- Jung, H. J., Kim, S. H., Shin, N., Oh, S.-J., Hwang, J. H., Kim, H. J., Kim, Y.-H., Bhatia, S. K., Jeon, J.-M., Yoon, J.-J., & Yang, Y.-H. (2023). Polyhydroxybutyrate (PHB) production from sugar cane molasses and tap water without sterilization using novel strain, *Priestia* sp. YH4. *International Journal of Biological Macromolecules*, 250, 126152. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126152>
- Karaca, S. (2018). Süt Endüstrisi Atıksuyu ve Organik Eysel Katı Atığın Hammadde Olarak Kullanılmasıyla Karışık Kültürden Polihidroksialkanoat (PHA) Eldesi.
- Li, C., Du, L., Xiao, Y., Fan, L., Li, Q., & Cao, C. Y. (2025). Multi-active phlorotannins boost antimicrobial peptide LL-37 to promote periodontal tissue regeneration in diabetic periodontitis. *Materials Today Bio*, 31, 101535. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2025.101535>
- Li, W., Yu, Q., Yao, H., Zhu, Y., Topham, P. D., Yue, K., Ren, L., & Wang, L. (2019). Superhydrophobic hierarchical fiber/bead composite membranes for efficient treatment of burns. *Acta Biomaterialia*, 92, 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.025>
- Liu, S.-J., Kau, Y.-C., Chou, C.-Y., Chen, J.-K., Wu, R.-C., & Yeh, W.-L. (2010). Electrospun PLGA/collagen nanofibrous membrane as early-stage wound dressing. *Journal of Membrane Science*, 355(1-2), 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.03.012>
- Liu, Z., Li, H., Huang, Y., Li, J., Dong, R., Yun, X., Ren, Y., Liu, X., Hui, H., Wu, L., Lu, Z., Cui, Y., & Hua, K. (2025). Thermal-responsive microgels incorporated PVA composite hydrogels: Integration of two-stage drug release and enhanced self-healing ability for chronic wound treatment. *Chemical Engineering Journal*, 506, 159813. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.159813>
- Long, L., Hu, C., Liu, W., Wu, C., Lu, L., Yang, L., & Wang, Y. (2022). Injectable multifunctional hyaluronic acid/methylcellulose hydrogels for chronic wounds repairing. *Carbohydrate Polymers*, 289, 119456. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119456>
- Lovera, D., Márquez, L., Balsamo, V., Taddei, A., Castelli, C., & Müller, A. J. (2007). Crystallization, Morphology, and Enzymatic Degradation of Polyhydroxybutyrate/Polycaprolactone (PHB/PCL) Blends. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 208(9), 924-937. <https://doi.org/10.1002/macp.200700011>
- Ma, X., Wang, Q., Ren, K., Xu, T., Zhang, Z., Xu, M., Rao, Z., & Zhang, X. (2024). A Review of Antimicrobial Peptides: Structure, Mechanism of Action, and Molecular Optimization Strategies. *Fermentation*, 10(11), 540. <https://doi.org/10.3390/fermentation10110540>
- Martínez, M. D. L. Á. M., Urzúa, L. S., Carrillo, Y. A., Ramírez, M. B., & Morales, L. J. M. (2023). Polyhydroxybutyrate Metabolism in *Azospirillum brasilense* and Its Applications, a Review. *Polymers*, 15(14), 3027. <https://doi.org/10.3390/polym15143027>

- Merve Ataman. (2016). Antimikrobiyal Peptidlerin Çeşitli Enfeksiyon Etkenlerine Karşı İn Vitro Antibakteriyel Aktivitelerinin Araştırılması. [Tez]. file:///C:/Users/MS%C4%B0/Downloads/431777%20(1).pdf
- Mohammadalipour, M., Behzad, T., Karbasi, S., Babaei Khorzoghi, M., & Mohammadalipour, Z. (2023). Osteogenic potential of PHB-lignin/cellulose nanofiber electrospun scaffold as a novel bone regeneration construct. *International Journal of Biological Macromolecules*, 250, 126076. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126076>
- Morais, A. R. D. V., Alencar, É. D. N., Xavier Júnior, F. H., Oliveira, C. M. D., Marcelino, H. R., Barratt, G., Fessi, H., Egito, E. S. T. D., & Elaissari, A. (2016). Freeze-drying of emulsified systems: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 503(1-2), 102-114. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.047>
- Morlino, M. S., Serna García, R., Savio, F., Zampieri, G., Morosinotto, T., Treu, L., & Campanaro, S. (2023). *Cupriavidus necator* as a platform for polyhydroxyalkanoate production: An overview of strains, metabolism, and modeling approaches. *Biotechnology Advances*, 69, 108264. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108264>
- Mottin, A. C., Ayres, E., Oréface, R. L., & Câmara, J. J. D. (2016). What Changes in Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) When Processed as Electrospun Nanofibers or Thermo-Compression Molded Film? *Materials Research*, 19(1), 57-66. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2015-0280>
- Mukai, K. (2024). Comparison of different modern wound dressings on full-thickness murine cutaneous wound healing with wild-type and type-2 diabetes db/db mice. *Journal of Tissue Viability*, 33(4), 616-624. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2024.09.011>
- Mutlu, G., Calamak, S., Ulubayram, K., & Guven, E. (2018). Curcumin-loaded electrospun PHBV nanofibers as potential wound-dressing material. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 43, 185-193. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.09.017>
- Naderi Gharahgheshlagh, S., Ghadimi, T., Latifi, N., Farokh Forghani, S., B. Milan, P., Hivechi, A., Hosseinpour Sarmadi, V., Arabsorkhi-Mishabi, A., Amini, N., Saboury, M., Larijani, G., Ghasemian, M., Ghadimi, F., & Faghihebad, G. (2024). Fabricating modified cotton wound dressing via exopolysaccharide-incorporated marine collagen nanofibers. *Materials Today Communications*, 39, 108706. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2024.108706>
- Özgören, T., Pinar, O., Bozdağ, G., Denizci, A. A., Gündüz, O., Çakır Hatır, P., & Kazan, D. (2018). Assessment of poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from a novel obligate alkaliphilic *Bacillus marmarensis* and generation of its composite scaffold via electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 982-991. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.014>

- Park, S.-B., Lih, E., Park, K.-S., Joung, Y. K., & Han, D. K. (2017). Biopolymer-based functional composites for medical applications. *Progress in Polymer Science*, 68, 77-105. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.12.003>
- Prabhakaran, M. P., Vatankhah, E., & Ramakrishna, S. (2013). Electrospun aligned PHBV/collagen nanofibers as substrates for nerve tissue engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(10), 2775-2784. <https://doi.org/10.1002/bit.24937>
- Pradhan, P., Mahajani, S. M., & Arora, A. (2018). Production and utilization of fuel pellets from biomass: A review. *Fuel Processing Technology*, 181, 215-232. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2018.09.021>
- Qing, C. (2017). The molecular biology in wound healing & non-healing wound. *Chinese Journal of Traumatology*, 20(4), 189-193. <https://doi.org/10.1016/j.cjtee.2017.06.001>
- Ramos, R., Silva, J. P., Rodrigues, A. C., Costa, R., Guardão, L., Schmitt, F., Soares, R., Vilanova, M., Domingues, L., & Gama, M. (2011). Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37. *Peptides*, 32(7), 1469-1476. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.06.005>
- Roohi, Zaheer, M. R., & Kuddus, M. (2018). PHB (poly- $\beta$ -hydroxybutyrate) and its enzymatic degradation. *Polymers for Advanced Technologies*, 29(1), 30-40. <https://doi.org/10.1002/pat.4126>
- Salvatore, L., Carofiglio, V. E., Stufano, P., Bonfrate, V., Calò, E., Scarlino, S., Nitti, P., Centrone, D., Cascione, M., Leporatti, S., Sannino, A., Demitri, C., & Madaghiele, M. (2018). Potential of Electrospun Poly(3-hydroxybutyrate)/Collagen Blends for Tissue Engineering Applications. *Journal of Healthcare Engineering*, 2018, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2018/6573947>
- Sangeetha, K., Albeshr, M. F., Shoba, K., Lavanya, G., Prasad, P. S., & Sudha, P. N. (2024). Evaluation of cytocompatibility and cell proliferation of electrospun chitosan/polyvinyl alcohol/montmorillonite clay scaffold with 1929 cell lines in skin regeneration activity and in silico molecular docking studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 268, 131762. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131762>
- Sanhueza, C., Hermosilla, J., Bugallo-Casal, A., Da Silva-Candal, A., Taboada, C., Millán, R., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., & Acevedo, F. (2021). One-step electrospun scaffold of dual-sized gelatin/poly-3-hydroxybutyrate nano/microfibers for skin regeneration in diabetic wound. *Materials Science and Engineering: C*, 119, 111602. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111602>
- Schmidt, N. W. (2013). Antimicrobial peptides and induced membrane curvature: Geometry, coordination chemistry, and molecular engineering. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 17(4), 151-163. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2013.09.004>

- Sharma, B., Malik, P., & Jain, P. (2018). Biopolymer reinforced nanocomposites: A comprehensive review. *Materials Today Communications*, 16, 353-363. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2018.07.004>
- Shishatskaya, E. I., Khlusov, I. A., & Volova, T. G. (2006). A hybrid PHB–hydroxyapatite composite for biomedical application: Production, in vitro and in vivo investigation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17(5), 481-498. <https://doi.org/10.1163/156856206776986242>
- Siva, S. (2025). Fabrication of tolmetin/cyclodextrin nanofibers for potential wound healing applications: Physicochemical, in vitro characterization, and scratch assay. *International Journal of Pharmaceutics*, 125644. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2025.125644>
- Sola, A., Bertacchini, J., D'Avella, D., Anselmi, L., Maraldi, T., Marmiroli, S., & Messori, M. (2019). Development of solvent-casting particulate leaching (SCPL) polymer scaffolds as improved three-dimensional supports to mimic the bone marrow niche. *Materials Science and Engineering: C*, 96, 153-165. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.086>
- Sun, N., Zhu, J., Li, Y., Hu, F., Dong, J., Shen, S., Xu, X., Cao, X., Zhou, Z., Wong, H. M., Wu, L., & Li, Q.-L. (2025). A multifunctional semi-interpenetrating polymer network hydrogel dressing for wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 251, 114616. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2025.114616>
- Sundar, G., Joseph, J., C, P., John, A., & Abraham, A. (2021). Natural collagen bioscaffolds for skin tissue engineering strategies in burns: A critical review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 70(9), 593-604. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1740991>
- Sznajder, A. (2011). Biochemical characterization of a new type of intracellular PHB depolymerase from *Rhodospirillum rubrum* with high hydrolytic activity on native PHB granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1487-1495. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3096-7>
- Tamayol, A., Hassani Najafabadi, A., Mostafalu, P., Yetisen, A. K., Commotto, M., Aldahri, M., Abdel-wahab, M. S., Najafabadi, Z. I., Latifi, S., Akbari, M., Annabi, N., Yun, S. H., Memic, A., Dokmeci, M. R., & Khademhosseini, A. (2017). Biodegradable elastic nanofibrous platforms with integrated flexible heaters for on-demand drug delivery. *Scientific Reports*, 7(1), 9220. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04749-8>
- Tan, G.-Y., Chen, C.-L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y., & Wang, J.-Y. (2014). Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*, 6(3), 706-754. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>
- Uchino, K., Saito, T., Gebauer, B., & Jendrossek, D. (2007). Isolated Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Granules Are Complex Bacterial Organelles Catalyzing Formation of PHB from Acetyl Coenzyme A (CoA) and Degradation of PHB to

- Acetyl-CoA. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8250-8256. <https://doi.org/10.1128/JB.00752-07>
- Uppal, R., Ramaswamy, G. N., Arnold, C., Goodband, R., & Wang, Y. (2011). Hyaluronic acid nanofiber wound dressing—Production, characterization, and in vivo behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 97B(1), 20-29. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31776>
- Van Der Schueren, L., De Meyer, T., Steyaert, I., Ceylan, Ö., Hemelsoet, K., Van Speybroeck, V., & De Clerck, K. (2013). Polycaprolactone and polycaprolactone/chitosan nanofibres functionalised with the pH-sensitive dye Nitrazine Yellow. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 284-293. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.003>
- Venugopal, J., Low, S., Choon, A. T., & Ramakrishna, S. (2008). Interaction of cells and nanofiber scaffolds in tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 84B(1), 34-48. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30841>
- Vigneswari, S., Murugaiyah, V., Kaur, G., Abdul Khalil, H. P. S., & Amirul, A. A. (2016). Simultaneous dual syringe electrospinning system using benign solvent to fabricate nanofibrous P(3HB-co-4HB)/collagen peptides construct as potential leave-on wound dressing. *Materials Science and Engineering: C*, 66, 147-155. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.102>
- Volova, T., Shishatskaya, E., Sevastianov, V., Efremov, S., & Mogilnaya, O. (2003). Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. *Biochemical Engineering Journal*, 16(2), 125-133. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00038-X](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00038-X)
- Wang, R., Li, X., Wang, C., Shi, Y., Xiong, D., Huang, D., Wang, Z., & Ye, L. (2025). Tight orchestration of wound healing phase through metal-organic compounds. *Biomaterials*, 318, 123160. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2025.123160>
- Wang, Z., Sun, Y., Dong, P., Wang, J., Wang, L., Zhao, A., Qu, G., Li, H., Maheshika Gunarathne, K. D., Zhang, W., Chen, Y., & Meng, X. (2025). Thermosensitive-based synergistic antibacterial effects of novel LL37@ZPF-2 loaded poloxamer hydrogel for infected skin wound healing. *International Journal of Pharmaceutics*, 670, 125210. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2025.125210>
- Wei, Y.-H., Chen, W.-C., Wu, H.-S., & Janarthanan, O.-M. (2011). Biodegradable and Biocompatible Biomaterial, Polyhydroxybutyrate, Produced by an Indigenous *Vibrio* sp. BM-1 Isolated from Marine Environment. *Marine Drugs*, 9(4), 615-624. <https://doi.org/10.3390/md9040615>
- Xu, Z., Yu, X., Gao, F., Zang, M., Huang, L., Liu, W., Xu, J., Yu, S., Wang, T., Sun, H., & Liu, J. (2024). Fighting bacteria with bacteria: A biocompatible living hydrogel patch for combating bacterial infections and promoting wound healing. *Acta Biomaterialia*, 181, 176-187. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2024.04.047>

- Yeo, J. C. C., Muiruri, J. K., Thitsartarn, W., Li, Z., & He, C. (2018). Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: Approaches, advantages and applications. *Materials Science and Engineering: C*, 92, 1092-1116. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.11.006>
- Zaja-Milatovic, S. (2011). CXC chemokines and their receptors: A case for a significant biological role in cutaneous wound healing.
- Zarrintaj, P., Seidi, F., Youssefi Azarfam, M., Khodadadi Yazdi, M., Erfani, A., Barani, M., Chauhan, N. P. S., Rabiee, N., Kuang, T., Kucinska-Lipka, J., Saeb, M. R., & Mozafari, M. (2023). Biopolymer-based composites for tissue engineering applications: A basis for future opportunities. *Composites Part B: Engineering*, 258, 110701. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2023.110701>
- Zhang, L., Jiang, Z., Tsui, T.-H., Loh, K.-C., Dai, Y., & Tong, Y. W. (2022). A Review on Enhancing *Cupriavidus necator* Fermentation for Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Production From Low-Cost Carbon Sources. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 946085. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.946085>
- Zhang, Q.-Y., Yan, Z.-B., Meng, Y.-M., Hong, X.-Y., Shao, G., Ma, J.-J., Cheng, X.-R., Liu, J., Kang, J., & Fu, C.-Y. (2021). Antimicrobial peptides: Mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*, 8(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>
- Zhang, S.-Q., Yuan, H.-Z., Ma, X., & Wei, D.-X. (2025). Carbon Cycle of Polyhydroxyalkanoates (CCP): Biosynthesis and Biodegradation. *Environmental Research*, 120904. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.120904>
- Zhou, W., Bergsma, S., Colpa, D. I., Euverink, G.-J. W., & Krooneman, J. (2023). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy. *Journal of Environmental Management*, 341, 118033. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118033>
- Zhou, Z., Feng, W., Moghadas, B. K., Baneshi, N., Noshadi, B., Baghaei, Sh., & Dehkordi, D. A. (2024). Review of recent advances in bone scaffold fabrication methods for tissue engineering for treating bone diseases and sport injuries. *Tissue and Cell*, 88, 102390. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2024.102390>