

**TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DERİ KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK PİROL KATKILI  
AMİLOİD TABANLI NANOFİBRÖZ DOKU İSKELESİNİN  
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ahmet Ersin MEYDAN**

**Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN**

**ARALIK 2021**









## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Ahmet Ersin Meydan



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DERİ KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK PİROL KATKILI  
AMILOİD TABANLI NANOFİBRÖZ DOKU İSKELESİNİN  
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Ahmet Ersin MEYDAN

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN

Tarih: Aralık 2021

2020 yılında dünya genelinde, 19.3 milyon yeni kanser vakası meydana gelmiş ve 9.9 milyon kanser bağıntılı ölüm gerçekleşmiştir. Bu yeni vakaların 324,635'i ve ölümlerin 57,043'ü melanom kanseridir. Önceki yıllara kıyasla dünya çapında melanom görülme sıklığı gitgide artmış ve deri kanseri kökenli ölümlerin %75'ini oluşturmuştur. Günümüzde melanom kanseri tedavisinde hastalığın evresine bağlı olarak kullanılan yöntemler: cerrahi müdahale, immünoterapi, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ilaçları ve radyasyon tedavisidir.

İdeal bir kanser tedavisinde, kanser hücreleri yok edilirken sağlıklı dokunun bütünlüğünün korunması en temel amaçtır. Tedavi sürecinde ve sonrasında sağlıklı hücrelerin zarar görmeden kanser hücrelerinin tamamen ortadan kaldırılması ve dokunun yenilenmesi tam olarak sağlanamamaktadır. Bu amaç doğrultusunda tez kapsamında; *i*) sıgır serum albüminin (BSA) amiloid forma dönüştürülmesine (AL-BSA), *ii*) kütlece farklı oranlarda pirol katkılanmış AL-BSA'dan elektro-eğirme yöntemi kullanılarak doğal polimerik yapıda nanofibröz doku iskelelerinin üretilmesine (Pd-AL-BSA), *iii*) AL-BSA ve Pd-AL-BSA doku iskelelerinin fiziksel

ve kimyasal karakterizasyonlarına, *iv*) in-vitro hücre kültürü çalışmalarında doku iskelelerinin, sağlıklı deri hücrelerinin ve melanom kanseri hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin incelenmesine ve *v*) doku iskelelerinin antimikrobiyal özelliklerinin in-vitro mikrobiyoloji çalışmaları ile analiz edilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Üretilen AL-BSA, %5, %10, %20 ve %50 Pd-AL-BSA doku iskelelerinin taramalı elektron mikroskobu, temas açısı ölçümü, FTIR analizi, çekme testi ve in-vitro hidrolitik ve enzimatik degradasyon karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Hücre ve bakteri canlılıkları, kolorimetrik bir metot olan 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile takip edilmiştir. AL-BSA, BJ normal insan deri hücresi ve A375 insan melanom hücresi üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir. %50 Pd-AL-BSA doku iskelesi AL-BSA ile kıyaslandığında, BJ hücre canlılığını  $37.38 \pm 2.39$  oranında arttırırken A375 hücre canlılığını  $64.27 \pm 1.30$  oranında azaltmıştır. Böylelikle kanser hücrelerinin canlılığı inhibe edilirken sağlıklı hücrelerin canlılığı arttırılmıştır. AL-BSA'ya kıyasla %50 Pd-AL-BSA, *E. coli* canlılığı  $54.45 \pm 2.85$  oranında inhibe ederken *S. aureus*'un canlılığında  $51.28 \pm 2.52$  oranında inhibisyona sebep olmuştur. AL-BSA, TCPS'ye kıyasla *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı yapışma önleyici özellik gösterirken, %50 Pd-AL-BSA antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Sonuç olarak, %50 Pd-AL-BSA doku iskelesinin kanser hücrelerini öldürürken sağlıklı hücrelerin çoğalmasını arttırdığı ve antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Bu tez kapsamında üretilen pirol katkılı amiloid tabanlı doku iskelesinin ileriye yönelik yeni biyomalzemelerin tasarımlarına ışık tutacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Doğal polimer, Amiloid benzeri sığır serum albümin, Elektro-eğirme, Pirol, Doku mühendisliği, Biyomalzeme, Anti-kanser, Antimikrobiyal, Yapışma önleyici.

## ABSTRACT

Master of Science

### INVESTIGATION OF THE USE OF PYRROLE DOPED AMYLOID BASED NANOFIBROUS SCAFFOLD FOR SKIN CANCER THERAPY

Ahmet Ersin MEYDAN

TOBB University of Economics and Technology  
Institute of Natural and Applied Sciences  
Biomedical Engineering Science Programme

Supervisor: Prof. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN

Date: December 2021

Worldwide, 19.3 million new cancer cases and 9.9 million cancer-related deaths were reported in 2020. Among these, 324,635 of these new cases and 57,043 of the deaths were melanoma cancer. Compared to previous years, the worldwide incidence of melanoma has increased gradually, and accounted for 75% of skin cancer-related deaths. Today, the methods used in the treatment of melanoma cancer depending on the stage of the disease are surgery, immunotherapy, chemotherapy, targeted therapy drugs, and radiation therapy.

In an ideal cancer treatment, the primary goal is to preserve the integrity of the healthy tissue while the cancer cells are destroyed. During and after the treatment, it is not possible to eliminate cancer cells without damaging the healthy cells and regenerate the tissue. In accordance with this purpose, within the scope of the thesis, *i*) conversion of bovine serum albumin (BSA) to amyloid form (AL-BSA), *ii*) production of nanofibrous scaffolds in natural polymeric structure from AL-BSA doped with pyrrole in different mass ratios by using electrospinning method (Pd-AL-BSA), *iii*) physical and chemical characterization of AL-BSA and Pd-AL-BSA scaffolds, *iv*) in-vitro evaluation the effect of scaffolds on the healthy skin cells and

melanoma cancer cells viability, and v) in-vitro antimicrobial property examination of scaffolds, studies have been carried out.

Scanning electron microscopy, contact angle measurement, FTIR analysis, tensile test, and in-vitro hydrolytic and enzymatic degradation characterizations of AL-BSA, 5% 10%, 20%, and 50% Pd-AL-BSA scaffolds were performed. Cell and bacteria viability were followed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, which is a colorimetric method. AL-BSA did not show any cytotoxic effect on BJ normal human skin cell and A375 human melanoma cell. Compared with AL-BSA, 50% Pd-AL-BSA scaffold increased BJ increased cell viability by  $37.38 \pm 2.39\%$ , while A375 cell viability decreased by  $64.27 \pm 1.30\%$ . Thus, whereas the viability of cancer cells is inhibited, the viability of healthy cells is increased. Compared to AL-BSA, 50% Pd-AL-BSA inhibited *E. coli* viability by  $54.45 \pm 2.85\%$ , while it caused  $51.28 \pm 2.52\%$  inhibition in *S. aureus* viability. AL-BSA showed anti-adhesive properties against *E. coli* and *S. aureus* compared to TCPS, while 50% Pd-AL-BSA showed antimicrobial activity. Consequently, it has been shown that 50% Pd-AL-BSA scaffold kills cancer cells while increasing the proliferation of healthy cells and has antimicrobial properties. It is thought that the pyrrole doped amyloid based scaffold produced within the scope of this thesis will shed light on the designs of new biomaterials for the future.

**Keywords:** Natural polymer, Amyloid like bovine serum albumin, Electrospinning, Pyrrole, Tissue engineering, Biomaterials, Anti-cancer, Antimicrobial, Anti-adhesive.

## TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimlerim boyunca sağlamış olduğu burs ve donanımlı laboratuvar ortamında akademik çalışmalarımı sürdürebilmeme fırsat sunduğu için TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi ve Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'ne, TÜBİTAK 2210/C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı'na,

Deneyimleri ve birikimleriyle kurtarıcım olan, bilimsel aydınlatmalar yaşatan ve hiçbir desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN'e,

Akademik hayatıma kapı açan, vizyon kazandıran, fırsatları değerlendirmemi öğreten ve vefa borcum bulunan Prof. Dr. Mehmet MUTLU'ya,

Bir anne gibi her zaman yanımda olan, bir Profesör ile deney yapma şansı sunan, sonsuz destek gösteren ve anında iş bitiriciliğin nasıl bir şey olduğunu öğreten Prof. Dr. Julide Sedef GÖÇMEN'e

Kıymetli önerilerinden ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Hilal GÖKTAŞ'a,

Her zaman gülen yüzüyle desteklerini sakınmayan Prof. Dr. Osman EROĞUL'a

Hücre temininde desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Ayşe ERCAN'a,

Mekanik test çalışmalarında değerli bilgilerini ve vakitlerini paylaştan Dr. Öğretim Üyesi Ersin Emre ÖREN'e ve Yunus USLAN'a,

Araya zaman ve mesafeler girse de hiçbir zaman yokluklarını hissettirmeyen, hissettirmeyecek, anıların ne kadar kıymetli olduğunu öğreten, Gözde KABAY'a, Hatice Ferda ÖZGÜZAR'a, Kenza AKŞAR'a, Ali Töre BALABAN'a, Berfu GEDİKOĞLU'na, Burak CENİK'e, Çağrı YILMAZER'e ve Ahsen SEYREK'e,

Beni her zaman motive edebilen, konuşurken zaman kavramını ortadan kaldıran, her ihtiyacında yanıma koşan Ömer Refet ÇAYLAN'a, Nazrin ABDULLAYEVA KARAAHMETOĞLU'na, İbrahim Emre GÜLTAKTI'ya, Çağlanaz AKIN GÜLTAKTI'ya, Ata Ayhan YILMAZ'a, Betül Merve Aybüke CÜCELER'e, Arda ÜÇOK'a, Osman Oğuzhan KILIÇ'a,

Her zaman koşulsuz yanımda olan, motivasyonumu sağlayan, attığım her adımı ve tüm kararlarımı istisnasız destekleyen canım ailem; Mehmet Soner MEYDAN'a, Akife MEYDAN'a, Halime MEYDAN CAN'a, Erdal CAN'a, Alin Ada CAN'a ve Ayşe Ayten ÖNAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu yüksek lisans tezi biricik yeğenim Alin Ada CAN'a ithaf edilmiştir.





## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
İÇİNDEKİLER .....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xvii
KISALTMALAR.....	xix
SEMBOL LİSTESİ .....	xxi
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>5</b>
2.1 Melanom Deri Kanseri.....	5
2.2 Biyomalzemeler .....	7
2.3 Protein ve Yapısı.....	8
2.4 Sığır Serum Albümin ve Yapısı.....	9
2.5 Proteinlerin Denatürasyon Mekanizması ve Amiloid Dönüşümü .....	10
2.6 Prolin Yapısı ve Özellikleri .....	11
2.7 Elektro-eğirme Yöntemi .....	13
2.7.1 Elektro-eğirme yönteminin çalışma prensibi .....	14
2.7.2 Elektro-eğirme yöntemi sistem parametreleri.....	16
2.7.2.1 Uygulanan voltaj.....	16
2.7.2.2 Çözelti akış hızı .....	16
2.7.2.3 Toplayıcının etkisi .....	16
2.7.2.4 İğne ucu.....	17
2.7.2.5 Toplayıcı ile iğne ucu arası mesafe.....	17
2.7.3 Elektro-eğirme yönteminde kullanılan polimer çözeltilerine ait parametreler .....	17
2.7.3.1 Moleküler ağırlık ve çözelti viskozitesi.....	17
2.7.3.2 Yüzey gerilimi .....	18
2.7.3.1 Çözelti iletkenliği.....	18
2.7.4 Elektro-eğirme yöntemini etkileyen çevresel parametreler .....	18
2.7.4.1 Nem.....	18
2.7.4.2 Sıcaklık .....	18
2.7.4.3 Basınç.....	19
2.7.4.4 Atmosfer türü .....	19
2.8 Karakterizasyon Teknikleri.....	19
2.8.1 Işık mikroskobu .....	19
2.8.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	20
2.8.3 Temas açısı ölçümü .....	20
2.8.4 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR).....	20
2.8.5 Çekme testi .....	21
2.8.6 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi .....	21

<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>23</b>
3.1 Materyal .....	23
3.2 Metot .....	24
3.2.1 Amiloid benzeri sığır serum albümin (AL-BSA) çözeltisinin hazırlanması ve pirol katkılanması .....	24
3.2.2 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin elektro-eğirme yöntemi ile üretilmesi .....	24
3.2.3 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin karakterizasyonu .....	24
3.2.3.1 Işık mikroskobu.....	25
3.2.3.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) .....	25
3.2.3.3 Temas açısı ölçümü.....	25
3.2.3.4 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR).....	25
3.2.3.5 Çekme testi.....	26
3.2.3.6 İn-vitro hidrolitik ve enzimatik degradasyon testi .....	26
3.2.4 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin antimikrobiyal özelliklerinin incelenmesi.....	27
3.2.5 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin BJ normal insan deri fibroblast hücre hattı ile etkileşiminin in-vitro olarak incelenmesi .....	28
3.2.6 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin insan melanom hücre hattı ile etkileşiminin in-vitro olarak incelenmesi .....	29
3.2.7 İstatistiksel analizler.....	30
<b>4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>31</b>
4.1 Pirol Katkılanmış Amiloid Benzeri Sığır Serum Albümin Nanofibröz Doku İskelelerinin Karakterizasyonu.....	31
4.1.1 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin morfolojik karakterizasyonu .....	31
4.1.2 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin temas açısı ölçümleri.....	35
4.1.3 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR) ile kimyasal karakterizasyonu.....	36
4.1.4 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin çekme testi ile mekanik özelliklerinin karakterizasyonu ...	37
4.1.5 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin in-vitro hidrolitik ve enzimatik degradasyon özelliklerinin incelenmesi .....	39
4.1.6 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin antimikrobiyal özelliklerinin incelenmesi.....	48
4.1.7 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin BJ normal insan deri fibroblast hücre hattı ile etkileşiminin in-vitro olarak incelenmesi .....	52
4.1.8 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin insan melanom hücre hattı ile etkileşiminin in-vitro olarak incelenmesi .....	53
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>55</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>59</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>67</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 : Derinin katmanları ve derinin üst tabakasındaki üç ana hücre tipi.....	6
Şekil 2.2 : Proteinlerin birincil (primary), ikincil (secondary), üçüncül (tertiary) ve dördüncül (quaternary) yapı organizasyonlarının gösterimi.....	9
Şekil 2.3 : Sığır serum albümin yapısı, PDB-3v03 .....	10
Şekil 2.4 : Pirelün kimyasal yapısı.....	12
Şekil 2.5 : Pirel içeren doğal ürün örnekleri: tetrapireller (A) ve pirel içeren küçük moleküller (B).....	13
Şekil 2.6 : Geleneksel dikey elektro-eğirme düzeneği.....	15
Şekil 2.7 : Artan voltaj ile yüklerin polimerik damlacıklar üzerindeki etki mekanizması ve Taylor Konisi oluşumu .....	16
Şekil 3.1 : BJ normal insan deri fibroblast hücre hattının düşük (A, low density) ve yüksek (B, high density) yoğunlukta ışık mikroskobu görüntüsü .....	28
Şekil 3.2 : A375 insan melanom hücre hattının düşük (A, low density) ve yüksek (B, high density) yoğunlukta ışık mikroskobu görüntüsü.....	30
Şekil 4.1 : Alüminyum folyo üzerinde 3 saat biriktirme süresi sonrası AL-BSA doku iskelesinin görüntüsü .....	32
Şekil 4.2 : Elektro-eğrilmiş AL-BSA (A, B), %5 Pd-AL-BSA (C, D), %10 Pd-AL-BSA (E, F), %20 Pd-AL-BSA (G, H), %50 Pd-AL-BSA (I, J) nanofiberlerin ışık mikroskobu görüntüleri (50 (A, C, E, G, I) ve 100 (ve B, D, F, J) kat büyütme).....	33
Şekil 4.3 : Elektro-eğrilmiş AL-BSA (A, B), %5 Pd-AL-BSA (C, D), %10 Pd-AL-BSA (E, F), %20 Pd-AL-BSA (G, H), %50 Pd-AL-BSA (I, J) nanofiberlerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (40,000 (A, C, E, G, I) ve 80,000 (B, D, F, H, J) kat büyütme) .....	34
Şekil 4.4 : AL-BSA ve pirel katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin temas açısı değerleri .....	35
Şekil 4.5 : Pirel (A), AL-BSA (B) ve %5 (C), %10 (D), %20 (E) ve %50 (F) oranlarında pirel katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin FTIR spektrumları .....	36
Şekil 4.6 : AL-BSA (A), %5 Pd-AL-BSA (B), %10 Pd-AL-BSA (C), %20 Pd-AL-BSA (D) ve %50 Pd-AL-BSA (E) doku iskelelerine ait gerinim-gerilim grafiği.....	38
Şekil 4.7 : AL-BSA doku iskelesinin 30 (A) ve 600 (B) gün hidrolitik degradasyon sonucundaki yüzdece kütle değişimleri .....	41
Şekil 4.8 : %5 Pd-AL-BSA doku iskelesinin 30 (A) ve 600 (B) gün hidrolitik degradasyon sonucundaki yüzdece kütle değişimleri.....	42
Şekil 4.9 : %10 Pd-AL-BSA doku iskelesinin 30 (A) ve 600 (B) gün hidrolitik degradasyon sonucundaki yüzdece kütle değişimleri.....	43
Şekil 4.10 : %20 Pd-AL-BSA doku iskelesinin 30 (A) ve 600 (B) gün hidrolitik degradasyon sonucundaki yüzdece kütle değişimleri.....	44

Şekil 4.11 : %50 Pd-AL-BSA doku iskelesinin 30 (A) ve 600 (B) gün hidrolitik degradasyon sonucundaki yüzde kütle değişimleri .....	45
Şekil 4.12 : AL-BSA (A), %5 Pd-AL-BSA (B), %10 Pd-AL-BSA (C), %20 Pd-AL-BSA (D) ve %50 Pd-AL-BSA (E) doku iskelelerinin 20 haftalık enzimatik degradasyon sonucundaki yüzde kütle değişimleri. ....	46
Şekil 4.13 : AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin 24, 48 ve 72 saat sonunda <i>E. coli</i> ' ye karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite (*p<0.05, **p<0.01) .....	50
Şekil 4.14 : AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin 24, 48 ve 72 saat sonunda <i>S. aureus</i> ' a karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite (*p<0.05, **p<0.01) .....	51
Şekil 4.15 : AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin BJ fibroblast hücre hattı üzerindeki hücre canlılığı grafiği (*p<0.05, **p<0.01).....	52
Şekil 4.16 : AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin A375 hücre hattı üzerindeki hücre canlılığı grafiği (*p<0.05, **p<0.01).....	54



## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

- Çizelge 4.1 : AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA nanofiberlerin optimize edilmiş elektro-eğirme parametreleri..... 32
- Çizelge 4.2 : AL-BSA ve farklı oranlarda pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerine ait nanofiber çap değerleri..... 32
- Çizelge 4.3 : AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerine ait elastisite modülü, akma dayanımı ve maksimum çekme dayanımı değerleri..... 40



## KISALTMALAR

<b>BSA</b>	: Sığır Serum Albümin (Bovine Serum Albumin)
<b>AL-BSA</b>	: Amiloid Benzeri Sığır Serum Albümin (Amyloid Like - Bovine Serum Albumin)
<b>Pd-AL-BSA</b>	: Pirel katkılanmış (Pyrrole doped) AL-BSA
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
<b>FTIR</b>	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (Fourier Transform Infrared)
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
<b>TCPS</b>	: Hücre Kültürü Plaka Yüzeyi (Tissue Culture Plate Surface)
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
<b>NIH</b>	: Ulusal Sağlık Enstitüleri (National Institutions of Health)
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b><math>\beta</math>-ME</b>	: 2-merkaptoetanol
<b>TFE</b>	: 2,2,2-trifloroetanol
<b>HFIP</b>	: Heksafloroizopropanol
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>ATCC</b>	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
<b>EMEM</b>	: Eagle's minimal essential medium
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's modified Eagle's medium
<b>DBPS</b>	: Dulbecco'nun fosfatlı tampon çözeltisi (Dulbecco's phosphate-buffered saline)
<b>FBS</b>	: Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum)
<b>TSB</b>	: Triptikaz Soya Suyu (Tryptic Soy Broth)
<b>TSA</b>	: Triptikaz Soya Agarı (Tryptic Soy Agar)
<b>VEGF</b>	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)
<b>Da</b>	: Dalton
<b>L</b>	: Litre
<b>sa</b>	: saat
<b>s</b>	: saniye
<b>dk</b>	: dakika
<b>g</b>	: gram
<b>V</b>	: Volt





## SEMBOL LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
~	Yaklaşık
$\mu$	Mikro
$p$	Anlamlılık (significance)
$^{\circ}$	Derece
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
$t$	Zaman
$A_0$	Başlangıç kuru ağırlığı
$A_t$	$t$ anındaki kuru ağırlık



## 1. GİRİŞ

Hücrelerin anormal ya da kontrolsüz olarak büyümesi ve çoğalması olarak adlandırılan kanser, dünyanın her yerinde önde gelen ölüm nedenlerindedir [1–4]. Dünya genelinde 2020 yılında 19.3 milyon yeni kanser vakası görülmüş ve 9.9 milyon kanser bağıntılı ölüm meydana gelmiştir. Bu yeni vakaların 324,635'i ve ölümlerin 57,043'ü melanom kanseridir [5]. Dünya çapında önceki yıllara kıyasla melanom görülme yaygınlığı gitgide artmış ve deri kanseri temelli ölümlerin %75'ini oluşturmaktadır [1,6,7]. Günümüzde melanom kanseri tedavisinde hastalığın evresine bağılı olarak cerrahi müdahale, immünoterapi, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ilaçları ve radyasyon tedavisi olmak üzere 5 temel tedavi yöntemi kullanılmaktadır.

İdeal bir kanser tedavisinde, kanser hücreleri yok edilirken sağlıklı dokunun bütünlüğünün korunması temel amaçtır. Özellikle cerrahi müdahale uygulandığı tedavi sürecinde ve sonrasında kanser hücreleri tamamen ortadan kaldırılamamakta ve doku yenilenmesi tam olarak sağlanamamaktadır. Söz konusu bu problemlerin önüne geçilmesi adına literatürde yer alan ve kanser hücrelerini apoptoz sürecine indüklerken aynı süreçte sağlıklı hücrelerin canlılığını arttıracak biyomalzeme araştırmalarının yetersiz olduğu anlaşılmaktadır. Bugüne kadar tasarlanmış olan nano/mikro ilaç taşınım sistemlerinin çoğu (hidrojeller, mikrokapsüller, mikropartiküller, miseller, lipozomlar, mikroküreler vb.) tümör hücrelerinin apoptoza uğramasını indükleyebilirken doku lezyonlarının tamirine katkı sağlayamamaktadırlar [8–11].

Günümüz araştırmaları, doğanın yapısal işleyişini ve organizasyonunu anlamaya yönelik olarak “mimicking the nature” prensibi ile ilerlemektedir. Bu doğrultuda malzeme tasarımı yapılırken yeni ve fonksiyonel özelliklere sahip doğal yapılar tercih edilmektedir. Bahsedilen fonksiyonel yapıları koruyucu ve destekleyici doğal alttaş malzemesi olarak hemoglobin, miyogloblin, albümin, insülin gibi farklı proteinler kullanılmaktadır [12–18].

Doğal yapıdaki polimerler, hücre tutunumunu destekleyen tanıyıcı dizileri bulundurmakta ve bu da onları doku mühendisliği uygulamalarında yapı iskelesi olarak kullanımı için öne çıkan adaylar haline getirmektedir. İn vivo doku topografilerini taklit etmeye yönelik 3 boyutlu doku iskelelerini oluşturmak için kullanılan köklü yöntemlerden biri elektro-eğirmedir [19–23]. Bu teknik esasen yüksek voltajlarda çalışmakta, bu da elektrik alanının polimer çözeltilerinin yüzey gerilimini aşmasına izin vermekte ve böylece nanofiber üretmektedir. Bu yöntemle üretilen doğal polimerik yapıdaki nanofiberlerin boyutlarının, mukavemetinin, yüksek yüzey alanı/hacim oranlarının ve biyouyumluluğunun hücre dışı matris ortamına benzemesinden dolayı yaygınlıkla kullanılmaktadır. Bu yapıların, canlı dokuların hücre dışı matris ortamlarını biyotaklit edecek şekilde tasarlanması; hücre tutunumunu, göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını artırıcı yönde tetikleyebilmektedir [13,23,24].

Elektro-eğrilmiş polimerik fiberlerin son derece yüksek yüzey alanına ve mükemmel gözenek bağlantısına sahip olması, biyoaktif molekül taşıyıcısı tasarlanmasında önemli bir yere sahiptir. Daha da önemlisi, elektro-eğrilmiş fiberler, yaraların, ameliyatla alakalı yaralanmaların ya da doku kayıplarının tedavisinin yanında hasarlı bölgeye özgü tedavi edici biyoaktif molekül taşınımı için implant malzemesi olarak kullanılmaktadır [25]. Elektro-eğrilmiş nanofiberlerin tümör yatağına implante edilmesi, anti-tümör moleküllerin tümör hücrelerine hedeflenmesi için umut verici bir yaklaşımdır. Bu yöntemin, sadece az miktarda anti-kanser moleküller kullanarak yüksek lokal konsantrasyon elde edilmesinin yanında ciddi yan etkilerin en aza indirilmesi gibi önemli avantajları bulunmaktadır [26].

Pirol, elektronca zengin ve doğada en çok miktarda bulunan doymamış aromatik bir bileşiktir. Klorofil  $\alpha$ , vitamin B12, Hem B, bilirubin gibi birçok önemli madde içeriğinde yer almakta ve çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir [27]. Anti-viral, antimalaryal, antihipertansif, anti-inflamatuar, anti-mikrobiyal ve anti-kanser gibi önemli farmakolojik özellikler göstermektedir [28–34]. Dihidrofolat redüktaz inhibitörleri [35], tirozin kinaz inhibitörleri [29], sikline bağımlı kinaz inhibitörleri [36] veya adenozin reseptör antagonisti [37] olmak üzere sitotoksik aktivitelerinde çeşitli mekanizmalarda yer almaktadır. Ayrıca kanser hücrelerinin canlılığını inhibe ederken sağlıklı hücrelerin çoğalmasını tetiklemektedir [27,32,38].

Bu tez çalışması kapsamında elektro-eğirme yöntemi kullanılarak hücre dışı matriks ortamını biyotaklit edecek farklı oranlarda pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskeleleri üretilmiştir. Fiziksel, kimyasal karakterizasyonlar yapılmış, hücre kültürü ve mikrobiyoloji çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Amiloid benzeri sığır serum albümin'e farklı oranlarda pirol katkılanmasıyla BJ normal insan deri hücrelerinin canlılığını arttırırken A375 insan melanom hücrelerinin çoğalmasını inhibe eden, *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösteren nano ölçekli fibröz doku iskeleleri üretilmesi amaçlanmıştır. Deneysel çalışmalar ve elde edilen bulgular sonraki bölümlerde açıklanmıştır.





## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Melanom Deri Kanseri

Kanser, vücuttaki herhangi bir organdaki hücrelerin kontrolsüz ya da anormal olarak büyümesi ve çoğalması olarak adlandırılmaktadır [1–3]. Kanser dünyanın her yerinde önde gelen ölüm nedeni ve artan yaşam beklentisinin önünde önemli bir engel olarak yer almaktadır [4]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 2019 yılındaki öngörülerine göre 70 yaş altı ölümlerin birincil ya da ikincil sebebi kanserdir [39]. 2020 yılında dünya genelinde 19,292,789 yeni kanser vakası görülmüş ve 9,894,133 kanser bağıntılı ölüm gerçekleşmiştir. Bu yeni vakaların 324,635'i ve ölümlerin 57,043'ü melanom kanseridir [5]. Geçmiş yıllara kıyasla dünya çapında melanom görülme yaygınlığı gitgide artmakta ve deri kanseri temelli ölümlerin %75'ini oluşturmaktadır [1,6,7].

Melanom, melanositlerin (cilde ten rengini veya kahverengi rengini veren hücreler) kontrolden çıkmaya başladığında gelişen bir cilt kanseri türüdür. Melanom diğer deri kanseri tiplerine kıyasla daha az yaygın görülmesine rağmen melanom diğer deri kanseri tiplerinden daha çok tehlikelidir. Çünkü erken teşhis edilip tedavi edilmezse vücudun diğer bölgelerine yayılma olasılığı çok daha yüksektir.

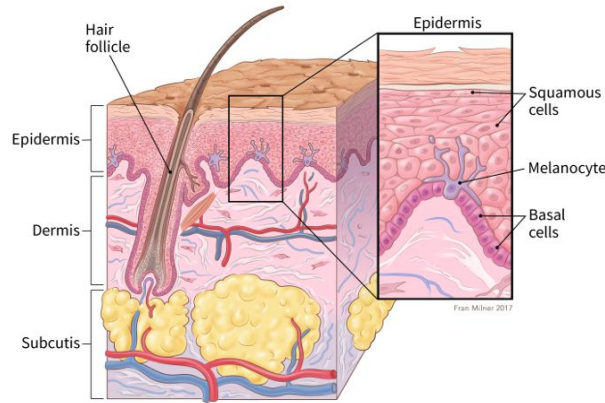
Çoğu deri kanseri, epidermis olarak adlandırılan derinin en üst tabakasında başlamaktadır. Şekil 2.1'de gösterilen bu tabakada 3 tipte hücre bulunmaktadır:

**Yassı hücreler:** Epiderminin dış (üst) kısmında bulunan ve yenileri oluştuğça sürekli dökülen düz hücrelerdir.

**Bazal hücreler:** Bazal hücre tabakası olarak adlandırılan epiderminin alt kısmında bulunmaktadır. Bu hücreler, cildin yüzeyinde yıpranan yassı hücrelerin yerini alacak yeni hücreleri oluşturmak amacıyla sürekli bölünmektedirler. Bu hücreler yukarıya doğru hareket ettikçe düzleşmekte ve sonunda yassı hücrelere dönüşmektedir.

**Melanositler:** Melanom olabilen hücrelerdir. Normalde cilde bronz veya kahverengi rengini veren melanin olarak adlandırılan kahverengi bir pigment yapmaktadırlar. Melanin, cildin daha derin katmanlarını güneşin bazı zararlı etkilerinden korumaktadır.

Epidermis, bazal membran ile derinin derin katmanlarından ayrılmaktadır. Bir cilt kanseri daha da ilerlediğinde, genellikle bu bariyeri geçerek daha derin katmanlara doğru büyümektedir [41].



Şekil 2.1 : Derinin katmanları ve derinin üst tabakasındaki üç ana hücre tipi [41].

### **Melanom Deri Kanserinin Tedavisinde Kullanılan Yöntemler**

Cilt kanseri tedavisi her insan için farklıdır. Cilt kanseri teşhisi konulduysa; tedavi, sahip olunan cilt kanseri türüne, ne kadar büyük ve derin olduğuna ve vücudun diğer bölgelerine yayılıp yayılmadığına bağlı olacaktır. Bazı hastalar bir tür tedavi alırken diğer insanlar birden fazla tedaviye ihtiyaç duyabilmektedir. Kanserin evresine ve diğer faktörlere bağlı olarak tedavi seçenekleri bulunmaktadır. En yaygın 5 temel tedavi yöntemi aşağıdaki gibi sıralanmaktadır [42].

**Cerrahi müdahale:** Çoğu melanom için ana tedavi seçeneğidir ve genellikle erken evre melanomları tedavi etmektedir.

**İmmünoterapi:** Bir kişinin kendi bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini daha etkili bir şekilde tanıması ve yok etmesi için uyarıcı ilaçlar kullanılmaktadır.

**Kemoterapi:** Kanser hücrelerini öldüren ilaçlar kullanılmaktadır. İlaçlar genellikle damar içine enjekte edilmekte veya ağızdan hap olarak



alınmaktadır. Kan dolaşımı yoluyla vücudun tüm bölgelerine gitmekte ve derinin ötesine yayılmış kanser hücrelerine saldırmaktadır.

**Hedefe Yönelik Tedavi İlaçları:** Bu ilaçlar, melanom hücrelerinin normal hücrelerden farklı kılan kısımlarını hedeflemektedir. Hedefe yönelik ilaçlar, temelde hızla bölünen hücrelere saldıran standart kemoterapi ilaçlarından farklı çalışmaktadır. Bu ilaçlar, belirli gen değişikliklerine sahip melanomların tedavisinde oldukça yardımcı olmaktadır.

**Radyasyon Tedavisi:** Kanser hücrelerini öldürmek için yüksek enerjili ışınlar (x-ışınları gibi) veya parçacıklar kullanılmaktadır. Radyasyon, sadece ciltte olan veya vücudun diğer bölgelerine yayılmış kanseri tedavi etmek için kullanılmaktadır.

## 2.2 Biyomalzemeler

Ulusal Sağlık Örgütleri (NIH), biyomalzemeleri “bireyin yaşam kalitesini sürdürmek veya iyileştirmek amacıyla vücudun herhangi bir dokusunu, organını veya işlevini arttıran veya tamamen değiştiren, herhangi bir süre boyunca kullanılacak sentetik veya doğal kaynaklı, ilaçlar dışındaki herhangi bir madde veya madde kombinasyonu” olarak tanımlamaktadır [43,44]. Bir materyalin biyomalzeme olarak sunulabilmesi için bazı özellikleri barındırması gerekmektedir.

Bunlardan bazıları;

- konak canlı ile biyoyumlu olması [43],
- dokuların doğal fizikokimyasal ortamını (topografik özellikler, sertlik, fonksiyonel gruplar ve arayüzey serbest enerjisi gibi) taklit edebilmesi [44,45],
- kolaylıkla ve ucuz maliyetle işlenebilmesi,
- sterilize edilmesi ve
- konak canlı ile temas süresi boyunca sahip olduğu özellikleri korumasıdır.

Günümüzde yaygın olan olarak kullanılan biyomalzemeler; metaller ve alaşımları, seramik, polimer, kompozit ve biyolojik malzemelerden oluşmaktadır. Geçmiş yıllarda, biyomalzeme tasarımında fiziksel ve mekanik özellikler belirleyici olarak

yer alırken; günümüzde biyomalzemelerin göstermiş olduğu biyolojik özellikler de önem kazanmıştır. Bu durum biyomalzeme araştırmalarında fonksiyonelleştirilmiş doğal yapıların (polisakkaritler, proteinler, biyokompozitler vb.) biyomedikal uygulamalarda kullanımını ortaya koymuştur [46–48].

### 2.3 Protein ve Yapısı

Doğada birbirinden farklı özellik gösteren ve biyolojik fonksiyonlara sahip birçok malzeme bulunmaktadır. Malzemelerin yapısal sıralanmaları farklıdır ve bu farklılıklardan kaynaklı olarak malzemelerin özellikleri etkilenerek malzemeler farklı fonksiyonel işlevler kazanmaktadırlar. Bundan dolayı, malzemenin bileşenlerinin türüne kıyasla, bu bileşenler arasındaki hiyerarşik yapıların açığa çıkarılması biyolojik sistemlerinde anlaşılması adına kritiktir. Proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar ve lipitler, canlılığı oluşturan dört ana molekül grubudur. Proteinler, belirli bir türde, sayıda ve diziliş sırasıyla aminoasitlerin kovalent-peptit bağları yapmasıyla oluşmuş düz bir zincir yapısındaki polipeptitlerdir.

Proteinlerin yapılarındaki peptit bağları ve disülfid bağları kovalent bağları oluştururken; apolar bağlar, iyon bağları ve hidrojen bağları kovalent olmayan bağları oluşturmaktadır. Sülfidril (tiyol, -SH) gruplarındaki hidrojenin kaybedilmesi sonucu iki sistein kalıntısı arasında disülfid bağları (S-S) oluşmaktadır. Bir proteinin moleküler şeklinin oluşmasında ve korunmasında disülfid bağları oldukça kritik bir yere sahiptir [49].

Proteinler; birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül (kuaterner) olmak üzere dört ana yapı düzeyi ile sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.2).

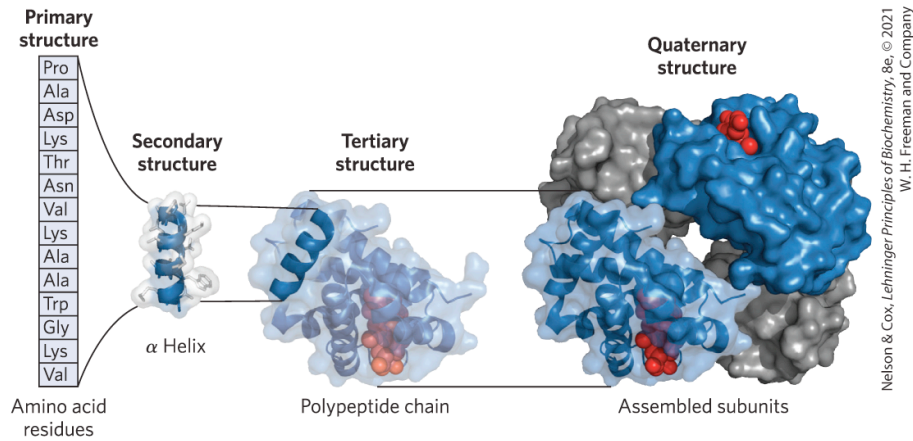
Proteinin “birincil yapısı”, o proteini meydana getiren aminoasit dizisinden oluşan polipeptit zinciri olarak gösterilmektedir. Primer yapıda temel olarak 20 aminoasitten oluşan özel dizilime sahip peptit artıkları bulunmaktadır. Genellikle her peptit artığında -NH-C<sub>x</sub>HR-CO- zinciri bulunmaktadır. Bu zincirde yer alan R grupları (yan zincir, -R) protein yapısına karakteristik fonksiyonel özellik kazandırılmasında etki etmektedir.

Bir polipeptit zincirinin kendisine komşu aminoasitler ile aralarında kurdukları hidrojen köprüleri sonucunda oluşan yapı düzeni ikincil yapı olarak adlandırılmaktadır. Sekonder yapı, amino (pozitif yük taşıyan) ve keto (negatif yük

taşıyan) grupları arasındaki hidrojen bağları ile kararlı hale gelmektedir. Bu sebeple  $\alpha$ -sarmal proteinler en yüksek stabil yapılardır. Sarmal bir şekilde sağa doğru dönerek bükülen polipeptit omurgası olan  $\alpha$ -sarmal, hidrojen bağlarının oluşmasına olanak sağlamaktadır. Buna karşın, plaka yapıda da protein katlanmaları oluşmaktadır. Plaka yapılarda farklı polipeptit zincirleri arasında hidrojen köprüleri kurulmaktadır. Birbirine paralel iki polipeptit zinciri sekonder yapıyı oluşturduğu zaman zincirlerin birbirlerine yaklaştığı bölgelerde kükürtlü aminoasitler vasıtasıyla disülfid bağları oluşmaktadır.

Tersiyer yapı, polipeptit zincirlerinin uzak kısımlarında bulunan grupların aralarında yaptıkları (Van der Waals, S-S, hidrojen vb.) bağlar sonucunda oluşan küresel yapılardır. Proteinlerin üç boyutlu şekillerini genellikle küresel proteinlerde görülen bu yapılar vermektedir.

Dördüncül yapı, birden fazla polipeptit zincirinin bir araya gelmesiyle oluşan proteinlerde (immüoglobulin, hemoglobin vb.) görülmektedir. Alt birim olarak adlandırılan polipeptit zincirlerinin, zayıf bağlar ya da S-S köprüleri oluşturarak bir araya gelmesi sonucu oluşmaktadır. Alt birimlerin birbirlerini tamamlayan kısımları ve moleküllerin asimetric yapıları, dördüncül yapının oluşumunda belirleyici olmaktadır. Çok yüzeyli yapılar bu etkileşimlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır [50].

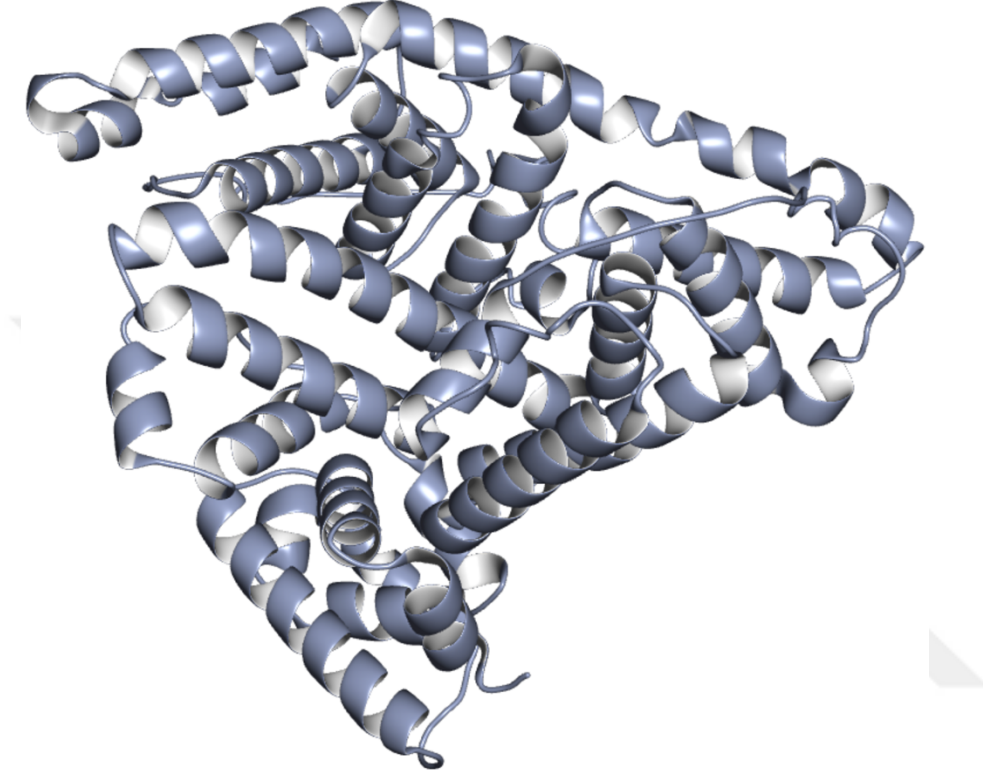


Şekil 2.2 : Proteinlerin birincil (primary), ikincil (secondary), üçüncül (tertiary) ve dördüncül (quaternary) yapı organizasyonlarının gösterimi [51].

## 2.4 Sığır Serum Albümin ve Yapısı

Sığır serum albümin (BSA), ~ 66.5 kDa moleküler ağırlığında, sisteince zengin, molekül içi 17 tane disülfid bağı bulunan küresel bir proteindir (Şekil 2.3). Çapraz

bağlanmaya olanak tanimasından ve su içerisindeki çözünürlüğünün yüksek olmasından (>100 mg/mL) dolayı model protein olarak biyoteknolojik uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, biyolojik molekülleri korumasından ve stabiliteğini arttırmasından dolayı biyomalzeme, kontrollü ilaç salımı, doku mühendisliği gibi uygulamalarda da tercih edilmektedir [52–55].



Şekil 2.3 : Sığır serum albümin yapısı, PDB-3v03 [56].

Yukarıda bahsedilen uygulamalarda BSA'nın kullanımı, genellikle sahip olduğu üçüncül yapısının uygun kimyasallar ile açılarak amiloid formunun oluşturulmasıyla ve yeni yapının sabitlenmesiyle mümkündür. Böylelikle doğal yapıda, suda çözünmeyen ve mekanik özellikleri iyileştirilmiş kararlı bir biyomalzeme üretimi mümkün kılınmaktadır [14,15,52,53,57,58].

## 2.5 Proteinlerin Denatürasyon Mekanizması ve Amiloid Dönüşümü

Bir protein molekülündeki yan bağların kırılması ile polipeptit zincirlerindeki katlanmaların açılmasının sonrasında farklı bir şekilde tekrar katlanmasıyla bir proteinin denatürasyonu gerçekleşmektedir. Bir proteinin tersiyer (üçüncül) yapısının bozulması yani denatürasyonu, birincil ve ikincil yapılarının korunması şeklinde olursa tersinirdir. Aksine proteinin ikincil ve üçüncül yapıları bozulurken sadece

birincil yapısı korunur şeklinde olursa tersinmezdir. Protein denatürasyonu çoğunlukla hidrojen bağlarını kıran faktörlerden (ısı, alkali ve asit etkisi, organik çözücüler, X-ışınları ve UV ışınları gibi) kaynaklanmaktadır [50]. Literatürde yapılan araştırmalar incelendiğinde,  $\beta$ -ME kullanılarak proteinin yapısı açılmakta ve sonrasında flor grubu içeren alkoller (TFE, HFIP vb.) kullanılarak açılmış olan alt form sabitlenmektedir [58]. Böylelikle suda çözünmeyen, “amiloid” olarak adlandırılan protein agregatları oluşturulmaktadır. Dış ortamda çevre koşulları değiştirilerek çoğu proteinler amiloid forma dönüştürülebilirken, hücre içi ortamda proteinin amiloid yapıya dönüşmesi kolay gerçekleşmemektedir.

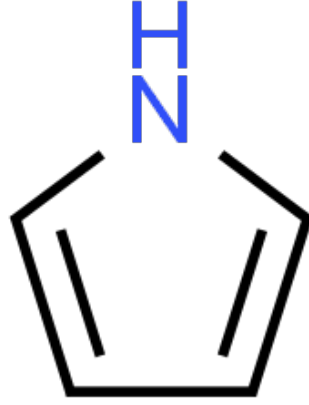
Amiloid oluşumunu başlatan ilk basamak öncül protein birikimidir. Amiloid türleri yapısal olarak birbirlerine benzemelerine rağmen öncül proteinleri birbirlerinden farklıdır. Amiloid fibriller, aynı amiloid öncül proteinlerinin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Bundan dolayı amiloid öncülü proteinler fibrillerin kütlece fazla kısmını oluşturmakta ve bunun sonucu olarak farklı amiloid tipleri içeren proteinler birbirlerinden farklıdır [59].

Amiloid öncülü proteinlerin derişimlerinin arttırısının ya da bu proteini kodlayan genlerde oluşan değişikliklerin (mutasyon, polimorfizm vb.) ardından üretilen öncül proteinler proteazlar tarafından yeterli miktarda yıkılamamasının sonucunda amiloid proteinler meydana gelerek amiloid yapıyı oluşturmaktadır. Bu proteinler kararsız bir yapıya sahip olmalarından dolayı çevresel faktörlerin (metal iyonları, sıcaklık, pH ve okside edici ajanlar gibi) etkileriyle beta tabakası kazanmaktadır [59].

Alzheimer, diyabet, Parkinson gibi birçok kritik hastalığın açığa çıkma nedeni öncül proteinlerin birikimi olarak düşünölmektedir. Fakat bu açığa çıkma mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir. Bu proteinler hücre dışı ortamda hem bu mekanizmanın araştırılması için hem de biyoteknoloji uygulamalarının birçok bölümünde yapay olarak üretilmektedir [60].

## 2.6 Pirolün Yapısı ve Özellikleri

Pirol ( $C_4H_5N$ ), bir azot ve dört karbon atomlarının bir araya gelmesiyle oluşan, beş üyeli bir halkaya sahip heterosiklik bileşiklerin en basit üç üyesinden birisidir. Diğer iki üye tiyofen ve furandır [61]. Pirol, elektronca zengin ve doğada en çok miktarda bulunan doymamış aromatik bir bileşiktir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 : Pirolün kimyasal yapısı [62].

Pirol, hidrojen bağları oluşturan, istiflenme etkileşimlerini sağlayan, metalleri koordine eden birçok önemli maddenin (Hem B, klorofil  $\alpha$ , vitamin B12, bilirubin vb.) temel parçasıdır (Şekil 2.5) ve çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir [27].

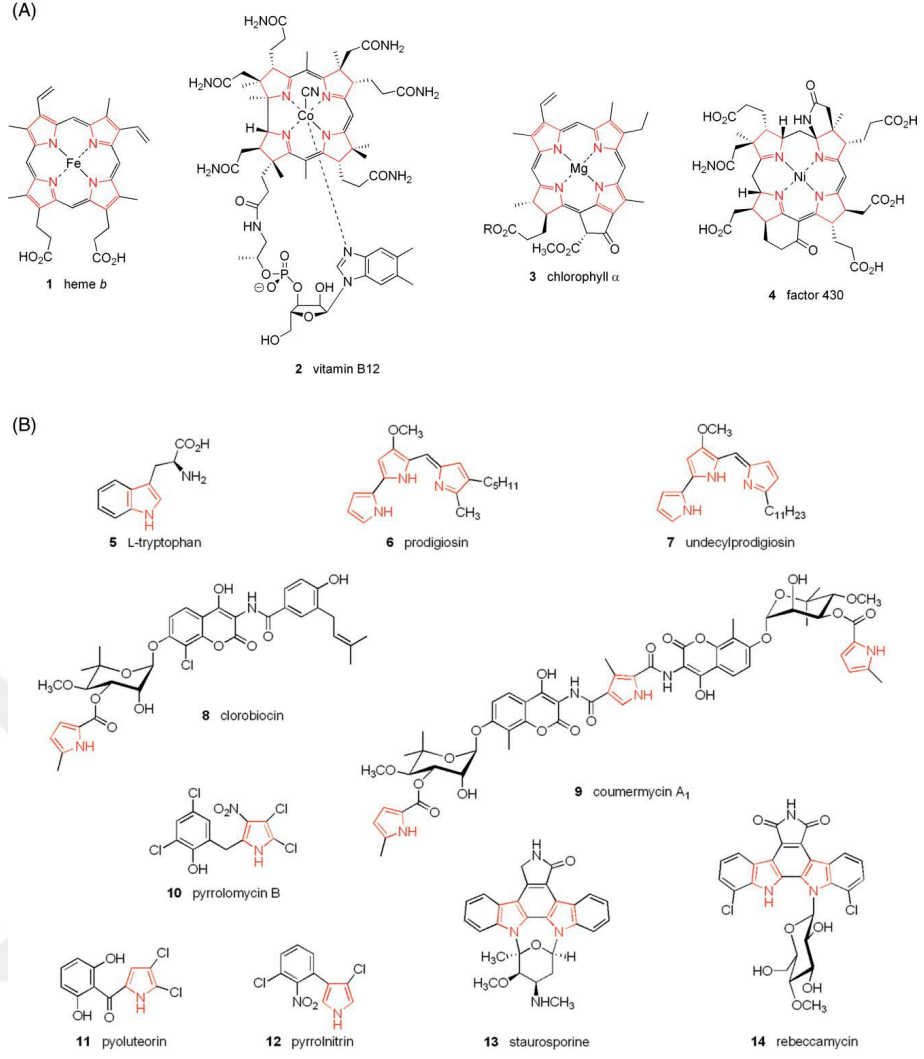
Pirol, sağlıklı hücrelerin biyomalzeme üzerindeki tutunumunu, yayılmasını ve çoğalmasını arttırmaktadır. Ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörü ifade seviyesini ve kan damarlarının oluşum miktarını arttırmaktadır [27,32,38].

Pirolün sahip olduğu; moleküllerin lipofilikliğini, polaritesini ve hidrojen bağlanma kapasitesini ayarlayabilme özelliği, aday ilaçların farmakolojik, farmakokinetik, toksikolojik ve fizikokimyasal özelliklerinin iyileştirilmesini sağlamaktadır [32,33].

Pirol ve türevleri, çeşitli biyoaktif ilaçların yapısında bulunmakta ve anti-kanser, anti-viral, anti-inflamatuar, anti-mikrobiyal, antimalaryal, antikonvülsan, antihipertansif ve antipsikotik gibi kritik farmakolojik özellikler gösteren heterosiklik bileşiklerdir [28–33].

Dihidrofolat redüktaz inhibitörleri, tirozin kinaz inhibitörleri, sikline bağımlı kinaz inhibitörleri veya adenosin reseptör antagonisti olmak üzere sitotoksik aktivitelerinde çeşitli mekanizmalarda yer almaktadır [35–37,63].

Pirol türevi ilaçlar, güçlü anti-kanser ajanlar olarak hedefe yönelik tedavide kullanılan popüler ilaç türlerinden birisidir. Bununla birlikte Bölüm 2.1’de belirtilen hedefe yönelik tedavi ilaçlarının yan etkileri nedeniyle minimal yan etkiye sahip yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktadır.



Şekil 2.5 : Pirol içeren doğal ürün örnekleri: tetrapirooller (A) ve pirol içeren küçük moleküller (B) [27].

## 2.7 Elektro-eğirme Yöntemi

Günümüzde nano ölçekte lif üretimi için kullanılan yöntemler; şablon oluşturma, ekstraksiyon, kendi kendine birleştirme, faz ayırma, polimerizasyon ve elektro-eğirme teknikleridir [64–70]. Elektro-eğirme yöntemi ile nano boyuttan mikro boyuta kadar lif üretimine olanak sağlayan yöntemdir. Geleneksel polimer lif üretimi; çözeltiden çekim, jel halinden lif üretimi ve çözeltiden çekim süreçlerini kapsamaktadır. Bu tekniklerin ortak özelliği, eriyik polimeri ya da çözeltiyi mekanik olarak düzelerden geçirip sonrasında çekme işlemi uygulayarak lif elde etmektir [68].

Geleneksel eğirme süreçlerinden farklı olarak, elektro-eğirme tekniğinde polimer çözeltileri uygulanan elektriksel alan kuvvetleri altında jet oluşturma prensibine dayanmaktadır. Bu teknikte temel olarak, polimer çözeltisi yüksek voltaja maruz

birakılarak benzer yükler ile yüklenerek elektriksel alanda ayrışma ve incelme göstererek lif yapılar oluşturulmaktadır.

Elektro-eğirme, elektro-püskürtme ve elektro-eğirme yöntemlerinin birleşiminden oluşan bir üretim tekniği olarak düşünülmektedir. Elektro-eğirme, tek boyutlu nano yapıların (tüp, çubuk, lif vb.) üretimi için “yukarıdan aşağıya (top-down)” yaklaşımına sahip olan metotlar arasında en etkili tekniktir. Nanoboyut, yüksek mukavemet, mekanik dayanım, yüzey enerjisi, termal ve elektriksel iletkenlik olarak etki göstermektedir. Fiber çağlarının 100 nm'nin altına inmesiyle birlikte nano boyuttaki fiberlerin elastik modülü ve mekanik güçleri artmaktadır [71].

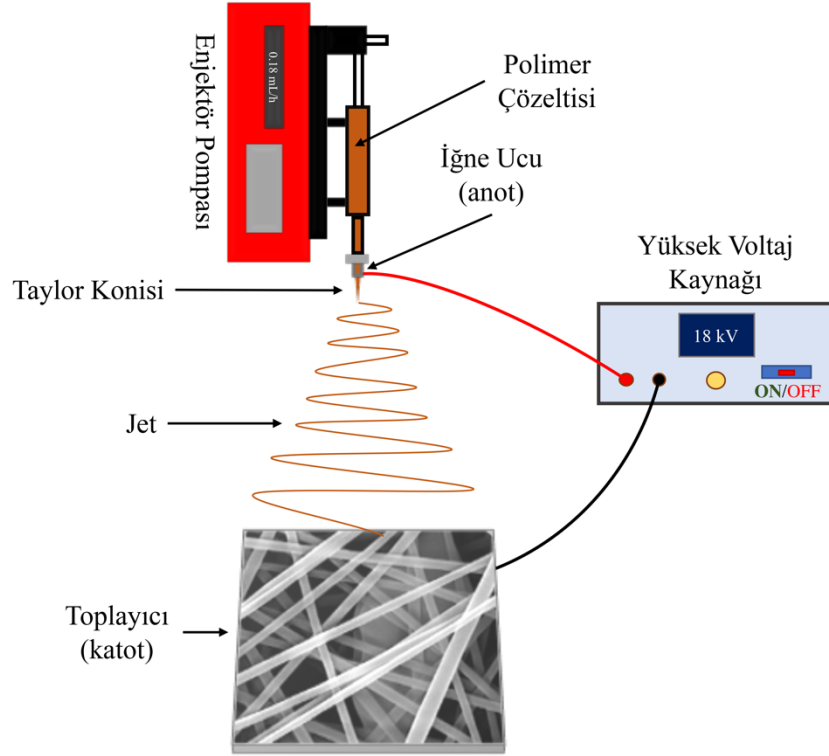
Nano ölçekli biyomalzeme yapılandırmasının kullanılması, hücre davranışını kontrol edebilmesinden dolayı doku mühendisliğinde yeni biyomalzemeler tasarlanırken önemli etkilere sahiptir. Geleneksel yapı iskeleleri, hücre-matris etkileşimi düzeyinde gerçek organlarda gözlenen karmaşıklık ve nano ölçekli ayrıntı olmaksızın doğal dokuya benzer mekanik özelliklere sahip makroskopik olarak tasarlanmıştır. Bu ayrıntı düzeyinin dahil edilmesine doğru ilerleyen yaklaşımlar gerçek faydalar sağlamaktadır. İskele gözenek duvarlarının nano ölçekli pürüzlülüğünün artırılması hücre bağlanmasını, çoğalmasını ve matris bileşenlerinin ifadesini arttırdığı bulunmuştur. Nano ölçekli mimarilere sahip yapı iskeleleri, protein adsorbe etmek için daha geniş yüzey alanlarına sahip ve hücre zarı reseptörlerine çok daha fazla bağlanma bölgesi sunmaktadır [72,73].

### **2.7.1 Elektro-eğirme yönteminin çalışma prensibi**

Elektro-eğirme deney düzeneği ekonomik ve basit bir kurulumuna sahiptir (Şekil 2.6). Enjektör içerisine eğrilecek olan polimer çözeltisi doldurulup enjektör pompasına yerleştirilmekte ve enjektör ucundaki iğne ucu ile belirli bir uzaklıkta iletken toplayıcı plaka yerleştirilmektedir. Yüksek gerilim sağlayacak doğru akım güç kaynağının pozitif kutbu enjektörün ucundaki iğne ucuna bağlanırken toplayıcı plakaya negatif kutup bağlanmakta ya da topraklanmaktadır. Güç kaynağının çalıştırılmasıyla iğne ucu ile toplayıcı plaka arasına yüksek gerilim uygulanarak elektriksel alan yaratılmaktadır.

Kritik voltaj değerine ulaşıldığında, sisteme uygulanan akış hızı ve voltaj etkisiyle elektriksel olarak yüklenmiş polimer çözeltisi jet oluşturarak iğne ucundan toplayıcıya doğru hareket etmektedir.





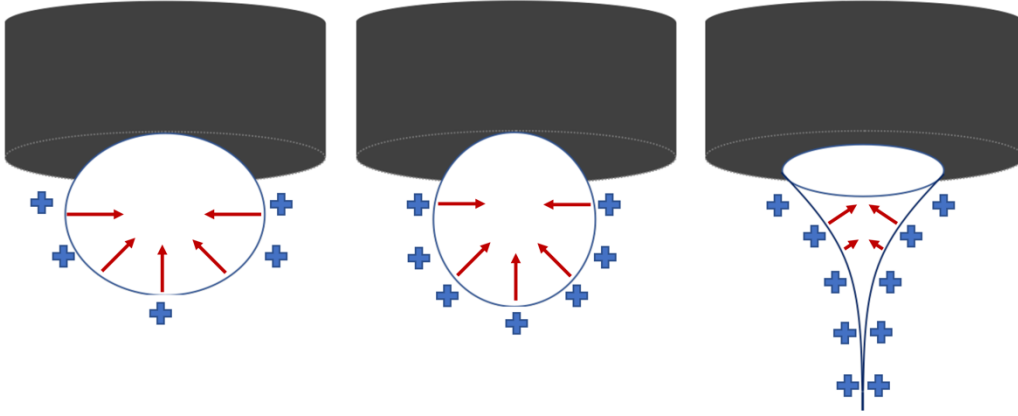
Şekil 2.6 : Geleneksel dikey elektro-eğirme düzeneği [74].

Elektriksel itme kuvvetleri polimer çözeltisinin yüzey gerilimini yenmeden önce iğne ucundaki polimer çözeltisi damlacığının en uç kısmında oluşan konik şeklindeki yapıya “Taylor Konisi” denmektedir (Şekil 2.7). Bu yapının oluşmasının ardından elektriksel alanın kritik seviyede artırılmasıyla elektriksel itme kuvvetleri çözeltinin yüzey gerilimini yenmekte ve polimer jeti oluşmaktadır. Taylor Konisi’nin ucundan itibaren oluşan jet toplayıcı plakaya kadar halkalı bir spiral yol izlemektedir. Bu yol boyunca polimer çözeltisindeki çözücüler buharlaşmakta ve toplayıcı plaka üzerinde fiberlerin birikimi gözlemlenmektedir [68,71,75].

Elektro-eğirme sürecinin doğru bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için;

- polimeri çözecek uygun çözücü seçimine,
- polimer çözeltisinin uygun viskoziteye ve yüzey gerilimine sahip olmasına,
- polimer çözeltisinin yüzey gerilimini ve viskozitesini yenebilecek düzeyde voltaj uygulanmasına ve
- çözücünün buharlaşması için uygun mesafenin ayarlanmasına

dikkat edilmelidir.



Şekil 2.7 : Artan voltaj ile yüklerin polimerik damlacıklar üzerindeki etki mekanizması ve Taylor Konisi oluşumu [76].

## 2.7.2 Elektro-eğirme yöntemi sistem parametreleri

### 2.7.2.1 Uygulanan voltaj

Genel olarak, yüksek voltajlı bir güç kaynağından metalik bir iğne aracılığıyla bir çözeltiliye akım akışının uygulanması iğne ucundaki küresel bir çözelti damlacığının Taylor Konisi'ne deforme olmasına ve kritik bir voltajda ultra incelikte nanofiberlerin oluşturulması sağlanacağı bilinmektedir [76,77]. Uygulanan voltajın bu kritik değeri polimerden polimere değişmektedir. Uygulanan voltajdaki bir artışla polimer jeti içindeki yük itme ile bağıntılı olarak daha küçük çapta nanofiberler oluşmaktadır [76,78]. Uygulanan kritik voltaj değerinin değişmesi boncukların veya boncuklu fiberlerin oluşmasına neden olabilmektedir [79,80].

### 2.7.2.2 Çözelti akış hızı

Çözeltinin enjektörden akış (besleme) hızı, malzeme transfer hızını ve jet hızını etkilemektedir. Akış hızının artmasıyla gözenek çapı ve lif çapı artmaktadır. Ayrıca akış hızının kritik değerin üzerine çıkmasıyla polimer jetin iğne ucu ile toplayıcı arasında tam olarak kuruyamadığı için boncuklu yapılar oluşmaktadır [76,80].

### 2.7.2.3 Toplayıcının etkisi

Elektro-eğirme işleminin gerçekleşebilmesi için iğne ucu ile toplayıcı arasında elektriksel alan oluşturulması gerekmektedir. Bu sebeple toplayıcı plaka alüminyum, bakır, silisyum nitrür gibi iletken malzemeler tercih edilmektedir. Ayrıca iletken plakanın topraklanmasıyla daha kararlı bir potansiyel fark meydana gelmektedir.

Toplayıcı plakanın iletkenliğinin yanında toplayıcının şekli ve hareket durumu da üretilen fiberlerin karakteristiğini etkilemektedir. Böylelikle birbirine paralel olan veya daha düzenli fiber elde edilebilmektedir. Ayrıca yardımcı manyetik alan veya elektriksel alan kaynakları kullanılarak düzenli lifler üretilmektedir [76,80].

#### **2.7.2.4 İğne ucu**

İç çapı daha küçük olan iğne uçları, tıkanmayı azaltmakta ve fiberlerdeki boncuklu yapı oluşum miktarını da düşürmektedir. Böylelikle iğne ucunda daha küçük hacimde polimer çözeltisi damlacığı oluşacağından yüzey gerilimi artmakta ve büyük iğne ucu iç çapına sahip sistem ile kıyaslandığında jet daha az hızlanmaktadır.

#### **2.7.2.5 Toplayıcı ile iğne ucu arası mesafe**

Toplayıcı ile iğne ucu arasındaki uzaklığın azaltılmasıyla jetin alacağı yol kısaltmakta ve çözücülerin buharlaşması için gereken uçuş süresi azalmaktadır. Birçok araştırmada bu mesafenin küçük tutulmasının sonucunda kusurlu ve kalın çapta fiberler oluşurken, mesafenin artmasıyla fiber çapında artış olduğunu sonucuna varmışlardır [81–83].

### **2.7.3 Elektro-eğirme yönteminde kullanılan polimer çözeltisine ait parametreler**

#### **2.7.3.1 Moleküler ağırlık ve çözelti viskozitesi**

Elektro-eğirmede kullanılan polimerin moleküler ağırlığı ve konsantrasyonu, elektro-eğirme çözeltisinin viskozitesini etkilemektedir. Polimer zincirinin uzamasıyla polimerin moleküler ağırlığı artmakta ve dolayısıyla polimer çözeltisinin viskozitesi artmaktadır. Elektro-eğirme sürecinde polimer çözeltisi gerilmesi ve incilmesi sonucunda fiber yapılar oluşmaktadır. Polimer zincirlerinin birbirine dolanmasıyla elektriksel alan sayesinde gerilen jet kırılmadan düzgün fiberler oluşmaktadır. Bu sebeple elektro-eğirme işleminde monomer çözeltilerinin kullanılması elverişli değil ve yüksek moleküler ağırlığa sahip polimer çözeltileri kullanılmaktadır. Viskozitesi düşük çözeltilerle fiber oluşturmak zor olduğu gibi viskozitesi çok yüksek olan çözeltilerden düzgün bir fiber üretimi oldukça güçtür. Çünkü elektro-eğirme süreci başlamadan polimer çözeltisi iğne ucunda kuruyabilmekte ve sürekli bir elektro-eğirme süreci gözlemlenmemektedir [84]. Çoklu-jet oluşmadığı sürece fiber kalınlığı en çok polimer çözeltisinin viskozitesine bağlıdır. Çözeltideki polimer

konsantrasyonunun artmasıyla çözeltinin viskozitesi artmaktadır. Yüksek viskozite değerlerine sahip çözeltiler eğrilme kararsızlıklarına daha fazla karşı koyabildikleri için fiberlerin toplayıcı üzerinde daha küçük bir alanda biriktikleri gözlemlenmiştir. Jetin fazla incelememesi ve fiber kalınlıklarının artmasını bu durumu açıklamaktadır. Ayrıca daha da artan viskozite kusurlu ya da boncuklu yapıda fiberlerin oluşumuna neden olabilmektedir [85,86].

### **2.7.3.2 Yüzey gerilimi**

Polimer çözeltisinin yüzey gerilimi, iğne ucunda oluşan çözelti damlacığının yüzey alanını düşürme eğilimindedir. Bu sebeple elektro-eğirme çözeltisine yüzey gerilimi düşük çözücüler eklenerek daha düzgün yapıda fiberler elde edilebilmektedir [87].

### **2.7.3.3 Çözelti iletkenliği**

Polimeri çözmek için seçilen çözücülerden en az birinin bir dereceye kadar iletkenliğe sahip olması gerekmektedir. İğne ucundaki polimer çözelti damlasının yüzeyinde toplanan itme kuvvetleri polimer çözeltisini germektedir. Eğer çözelti tamamen gerilmez ise kusurlu ya da boncuklu yapıda fiberler üretilmektedir. Ayrıca çözeltideki yükleri arttırmak için organik/inorganik tuzlar veya polielektrolit eklenerek kritik voltaj değeri düşürülebilmektedir. İletkenliğin artırılmasıyla birlikte boncuklu yapıdaki fiberler düz yapıya geçmektedir [88,89].

## **2.7.4 Elektro-eğirme yöntemini etkileyen çevresel parametreler**

### **2.7.4.1 Nem**

Elektro-eğirme ortamındaki nem, çözücülerinin buharlaşma oranını etkilemektedir. Nem oranı düşük ortamda, uçucu olan çözücüler hızlı buharlaşmakta ve hatta iğne ucunda iken bulaşarak iğne ucunda tıkanıklık oluşmasına neden olmaktadır. Yüksek nem oranlarında suyun fiberlerin üzerinde yoğunlaşması fiberlerin morfolojilerini etkilemektedir. Nem oranının artmasıyla fiberlerin yüzeyinde gözenekler oluşmaktadır [88,90].

### **2.7.4.2 Sıcaklık**

Ortam sıcaklığı polimer çözeltisindeki çözücülerin buharlaşma oranını artırırken bir yandan da çözelti viskozitesini düşürmektedir. Böylelikle daha düzenli küçük fiber kalınlığına sahip yapılar elde edilmektedir. Fakat çözeltiye enzim, protein, hücre gibi

biyomoleküller eklenildiğinde yüksek sıcaklıklara çıkılması bu yapıların bozularak fonksiyonlarının olumsuz etkilenmesine sebep olmaktadır [91].

#### **2.7.4.3 Basınç**

Elektro-eğirme ortam basıncının atmosfer basıncının altında olması çözeltinin akmaya karşı direncinin azalmasına sebep olmakta ve oluşan jette kararsızlıklara neden olmaktadır. Düşük basınçta ya da vakum altında viskozitesi düşük çözeltilerde elektro-eğirme gerçekleşemezken yüksek viskozite değerine sahip çözeltilerde elektro-eğirme tekniği uygulanabilmektedir [92].

#### **2.7.4.4 Atmosfer türü**

Elektro-eğirme ortamına hava yerine farklı gazların uygulandığı ortamda yüksek elektriksel alan altında farklı gazlar farklı davranış göstereceğinden dolayı elde edilen fiberlerin morfolojilerini ve fonksiyonlarını etkilemektedir.

### **2.8 Karakterizasyon Teknikleri**

#### **2.8.1 Işık mikroskobu**

Işık mikroskobu, çok küçük nesnelere algılayan, büyüten ve büyütme için görünür ışığı kullanan bir araçtır. Numune üzerine ışığın odaklanması için lensler kullanılmaktadır. Mikroskobik büyütme, mikroskobu oluşturan merceklerin türüne ve sayısına bağlı olarak değişmektedir. Mercekler, görüntünün verimli bir şekilde büyütülebilmesi için ışığı bükecek bir şekilde hizalanmıştır. Işık mikroskobunun işlevi, bir görüntü üretmek için çok küçük ve şeffaf bir numuneden bir ışık demetini odaklama yeteneğine dayanmaktadır. Görüntü daha sonra büyütme ve görüntüleme amacıyla bir veya iki mercekten geçirilmektedir. Numunenin şeffaflığı, ışığın kolay ve hızlı bir şekilde nüfuz etmesini sağlamaktadır.

Temel olarak biyolojik örneklerin (bakteriden hücreye ve diğer partiküllere) görüntülenmesinde kullanılan ışık mikroskobu, ileri nesil cihazlarla sağlanan bilgisayar sistemi ile örneklerinin görüntülenmesine ve yapıların analizlerinin yapılmasına da olanak sağlamaktadır.

### **2.8.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)**

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), malzemelerin yüzey özelliklerinin daha iyi analiz edilebilmesi adına morfolojik ve topografik bilgi veren yüzey analiz yöntemlerinden birisidir. SEM analizinde incelenecek örnek elektron demetleriyle bombardıman edilmektedir. Elektronların kısa dalga boylarında olması sebebiyle ışık mikroskobuna göre daha iyi bir çözünürlükte görüntüleme gerçekleştirilmektedir. SEM ile görüntülenecek örneğin iletken olması gerekmekte ve eğer örnek yalıtıksa analiz öncesi çeşitli yöntemlerle yüzey kaplanarak iletkenleştirilmesi sağlanmaktadır.

Ana SEM bileşenleri; elektron kaynağından, elektronların elektromanyetik lenslerle hareket ettiği sütundan, elektron detektöründen, örnek odasından ve görüntüleme (bilgisayar ve ekran) sisteminden oluşmaktadır. Elektronlar kolonun tepesinde üretilmekte, hızlandırılmakta ve örneğin yüzeyine çarpan odaklanmış bir elektron demeti üretmek için bir lens ve açıklık kombinasyonundan geçirilmektedir. Elektron ışınının numune üzerindeki konumu, objektif lensin üzerinde bulunan tarama bobinleri tarafından kontrol edilmektedir. Bu bobinler, ışının numune yüzeyinde taranmasına olanak sağlamaktadır. Elektron-örnek etkileşiminin bir sonucu olarak bir takım sinyal üretilmekte ve uygun detektörler tarafından tespit edilmektedir [93].

### **2.8.3 Temas açısı ölçümü**

Temas açısı ölçümü, analiz edilecek yüzeye saf su damlatılmasıyla yüzeyin hidrofilik ve hidrofobik karakteristik özelliklerinin belirlenmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca örnek yüzeyine farklı kimyasallar damlatılarak yüzey enerjilerinin hesaplanmasını da olanak sağlamaktadır.

### **2.8.4 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)**

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi, matematiksel Fourier dönüşümü metodu ile düşük enerjili kızılötesi bölgedeki ışınların yoğunluklarına karşı dalga sayısını ölçen analitik bir yöntemdir. Bu teknikte moleküllerdeki kimyasal bağların sallanma, eğilme, bükülme, titreme vb. tüm hareketleri için gerekli olan enerji, kızılötesi ışınların elektromanyetik enerjilerinden absorplanmaktadır. Geniş spektrum aralıklarında yüksek çözünürlüklü veri toplanabilmektedir. Tek seferde farklı frekanslarda ışık gönderilerek numune tarafından absorbe edilen ışık miktarı ölçülmektedir.

### **2.8.5 Çekme testi**

Çekme testi, bir malzemelerin mukavemeti hakkında temel tasarım bilgileri sağlamak ve malzemelerin özellikleri için kabul testi olarak yaygın kullanılmaktadır. Bu test prosedüründe, bir numune tek eksenli yüke (kuvvete) tabi tutulmakta ve o esnada numunenin uzamasına ilişkin eşzamanlı ölçümler yapılmaktadır. Uygulanan kuvvet sonucunda malzemedeki uzama miktarı ile gerinim-gerilim eğrisi elde edilmektedir [94].

### **2.8.6 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi**

Hücre canlılığının belirlenmesinde, kolorimetrik bir yöntem olan MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi yaygın olarak kullanılmaktadır. Canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış bir hücrede mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrojenaz enzimi, MTT bileşiğinin yapısındaki tetrazolyum halkasını formazana dönüştürmektedir. Canlı hücrelerde sarı renk veren MTT'deki tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüşmesi sonucunda koyu mor renk vermektedir. Böylelikle mitokondriyal aktivitesi bozulmamış canlı hücreler mor renkte boyanırken, mitokondriyal fonksiyonlarını kaybetmiş ölü hücreler boyanmamaktadır. Hücre içerisinde oluşan formazan kristalleri dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözdürülerek formazan çözeltisine ait rengin 540 nm'deki optik yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülmektedir [95].





### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1 Materyal

Pirol katkılı amiloid benzeri sığır serum albümin çözeltilisinin hazırlanması için sığır serum albümin (BSA, Sigma Aldrich, ABD), fosfat tamponlu tuz tableti (PBS, Sigma Aldrich, ABD), 2,2,2-trifloroetanol (TFE, Sigma Aldrich, ABD), 2-merkaptoetanol ( $\beta$ -ME, Merck, Almanya) ve pirol (Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Elektro-eğirme deney düzeneğinde doğru akım güç kaynağı (TT-Technic), enjektör pompası (New Era, ABD) ve 0.8 mm iç çapında paslanmaz çelik iğne ucu (İnovenso, Türkiye) kullanılmıştır.

Doku iskelelerinin antimikrobiyal özelliklerin incelenmesinde *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 25922, Almanya), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 25923, Almanya), tryptic soy agar (Sigma Aldrich, ABD) ve tryptic soy broth (Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında BJ normal insan derisi fibroblast hücre hattı (CRL-2522, ATCC, Almanya), A375 insan melanom hücre hattı (CRL-1619, ATCC, Almanya), Eagle's minimal essential medium (EMEM, Sigma Aldrich, ABD), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma Aldrich, ABD), fetal sığır serumu (FBS, Sigma Aldrich, USA), sodyum piruvat çözeltisi (Sigma Aldrich, ABD), Dulbecco'nun fosfatlı tampon çözeltisi (DPBS, Sigma Aldrich, ABD), penisilin-streptomisin çözeltisi (Biological Industries, İsrail) ve tripsin-EDTA çözeltisi (Biological Industries, İsrail) kullanılmıştır.

Hücre canlılığı analizinde MTT (Sigma Aldrich, ABD) ve DMSO (İnterlab, Almanya) kullanılmıştır. İn-vitro hidrolitik degradasyon çalışmalarında fosfat tamponlu tuz tableti (Sigma Aldrich, ABD) ve sodyum azit (Sigma Aldrich, ABD) ve enzimatik degradasyon çalışmalarında lizozim (Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır.

## 3.2 Metot

### 3.2.1 Amiloid benzeri sığır serum albümin (AL-BSA) çözeltisinin hazırlanması ve pirol katkılanması

Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (pH:7.4) içerisinde kütlece %30 olacak şekilde sığır serum albümin çözdürülmüştür. BSA tamamen çözüldükten sonra hacimce 2:3 (PBS:TFE, h:h) oranında olacak şekilde trifluoroetanol eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından 1:1.25 (BSA:β-ME, k:h) oranında 2-merkaptetanol karışıma eklenmiştir. Bu şekilde amiloid benzeri sığır serum albümin (AL-BSA) çözeltisi hazırlanmıştır. BSA'ya kütlece oranı %5, %10, %20 ve %50 olacak şekilde AL-BSA çözeltilerine pirol katkılanmıştır. Hazırlanan AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA (Pd-AL-BSA) çözeltileri 5 mL'lik enjektör içerisine transfer edilerek elektro-eğirme işlemine hazır duruma getirilmiştir.

### 3.2.2 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin elektro-eğirme yöntemi ile üretilmesi

Bölüm 3.2.1'de hazırlanma protokolleri yer alan AL-BSA ve Pd-AL-BSA çözeltileri kullanılarak, elektro-eğirme işleminde çözelti akış hızı veya sisteme uygulanan voltaj parametreleri değiştirilerek optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Dikey elektro-eğirme düzeneği kullanılmıştır.

Sistem parametrelerinin optimizasyonunda, iğne ucu ve toplayıcı arası uzaklık 11 cm olarak sabit tutularak, akış hızı 0.12 - 0.30 mL/sa ve uygulanan gerilim 12 - 21 kV aralığında değiştirilmiştir. Taylor Konisi oluşumu, şekli ve stabilitesi; sürekli, boncuksuz yapıda, homojen fiber çapına sahip olan elektro-eğirme parametreleri belirlendikten sonra karakterizasyon, mikrobiyoloji ve hücre kültürü çalışmaları için optimize parametrelerde 3 saat boyunca elektro-eğirme işlemi yapılmıştır.

### 3.2.3 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin karakterizasyonu

AL-BSA ve farklı oranlarda pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin morfolojik, fiziksel, kimyasal ve biyolojik karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Morfolojik karakterizasyonda ışık mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu; fiziksel karakterizasyonda temas açısı ölçümü, çekme testi, hidrolitik ve enzimatik

degradasyon testi; kimyasal karakterizasyonda FTIR ve biyolojik karakterizasyon bağlamında canlılık testi için MTT analizi gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.3.1 Işık mikroskobu**

Bölüm 3.2.2’de bahsedilen sistem parametrelerinde elektro-eğirme işlemi 30 saniye gerçekleştirilerek lamlar üzerine toplanmıştır. Elde edilen yapılar ışık mikroskobu (Nikon Eclipse, LV150N) kullanılarak incelenmiştir. Boncuksuz yapıda, homojen fiber çapına sahip, sürekli yapıların bulunduğu elektro-eğirme parametreleri tespit edilerek optimize parametreler seçilmiştir.

### **3.2.3.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)**

Optimize edilmiş parametrelerde AL-BSA ve Pd-AL-BSA nanofiberler 3 saat boyunca toplayıcı üzerindeki alüminyum folyo üzerinde biriktirilmiştir. Alüminyum folyodan ayrılan örnekler  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  boyutlarında kesilerek SEM tablasına çift taraflı bakır bant ile sabitlenmiştir. Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM) bünyesinde örnekler altın ile kaplanmış ve e-SEM (FEI-Quanta 200 FEI, ABD) ile çeşitli büyütme oranlarında fiberlerin görüntüleri alınmıştır. Her ayrı örnek grubunda yer alan nanofiberleri 20 farklı yerindeki nanofiberlerin çap ölçümleri ImageJ programı kullanılarak yapılmış, ortalamaları ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

### **3.2.3.3 Temas açısı ölçümü**

Optimize edilmiş parametrelerde 3 saat boyunca biriktirilmiş AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerin hidrofilitik karakteristiği statik temas açısı ölçümüyle gerçekleştirilmiştir. Her gruptan dokuzar tane seçilen doku iskelelerinin yüzeylerine yaklaşık  $12 \mu\text{L}$  hacminde ultra saf su damlası mikroenjektör ile damlatılmıştır. Temas açısı ölçüm cihazında (KSV Instruments Ltd., Finlandiya) yer alan kamera ile temas görüntüleri alınarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerin ortalaması alınmış ve her bir örnek grubu için standart sapmaları hesaplanmıştır.

### **3.2.3.4 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)**

Elektro-eğrilmiş AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin kimyasal bileşenlerinin incelenmesi ve karakterize edilmesi için FTIR (Thermo Scientific,

Nicolet 6700, ABD) analizi gerçekleştirilmiştir. Farklı oranlarda pirol katkılanmış AL-BSA doku iskeleleri analiz edilerek konsantrasyonun malzemenin kimyasal yapısına etkisi incelenmiştir. Analiz için örnekler  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  boyutunda kesilmiş ve vakumlu fırında kurutulmuştur.

### 3.2.3.5 Çekme testi

AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin mekanik dayanımlarının incelenmesi için her gruptan üçer örneğe çekme testi (Instron, ABD) yapılmıştır. Numune çekme hızı 1 mm/dk olarak ayarlanmış ve 10 ms'de bir veri alınmıştır. Doku iskeleleri analiz için  $4 \times 1 \text{ cm}^2$  boyutlarında kesilmiştir. Örneklerin üstten ve alttan  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  'lik kısımları cihazın aparat dişlerinin arasına yerleştirilmiş olup  $2 \times 1 \text{ cm}^2$  'lik kısımda çekme testi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda çekme dayanımları ve elastisite modülleri hesaplanmıştır.

### 3.2.3.6 İn-vitro hidrolitik ve enzimatik degradasyon testi

AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin kuru ağırlıkları tartıldıktan sonra degradasyon ortamına konulmuştur ( $n=3$ ). Hidrolitik degradasyon sıvı ortamı olarak %0.1'lik sodyum azit (k:h) içeren PBS (pH:7.4) çözeltisi; enzimatik degradasyon sıvı ortamı olarak ise içerisinde 1 mg/mL lizozim bulunan %0.1'lik sodyum azit (k:h) içeren PBS (pH:7.4) çözeltisi kullanılmıştır. Hidrolitik degradasyon sıvı ortamı haftada 1 kere ve enzimatik degradasyon sıvı ortamı 3 günde bir yenilenmiştir. Degradasyon testi 50 rpm çalkalama hızına, 37 °C ortam sıcaklığına sahip çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick, Innova 40R, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Belirli aralıklarla degradasyon örnekleri degradasyon sıvı ortamından alınıp 30 dakika boyunca ultra saf su içerisinde çalkalamalı inkübatörde yıkanmış ve vakumlu fırında (Binder, Almanya) kurutulmuştur. Kurutulmuş degradasyon örnekleri hassas terazide (RADWAG, AS 220.R2, Polonya) tartıldıktan sonra tekrar degradasyon sıvı ortamına konulmuştur. Kalan ağırlık yüzdeleri aşağıda yer alan Eşitlik 3.1'e göre hesaplanmıştır.

$$\text{Kalan ağırlık (\%)} = (A_t/A_0) \times 100 \quad (3.1)$$

$A_0$ , örneğin başlangıç kuru ağırlığını ve  $A_t$ , örneğin  $t$  anındaki kuru ağırlığını ifade etmektedir.

### 3.2.4 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin antimikrobiyal özelliklerinin incelenmesi

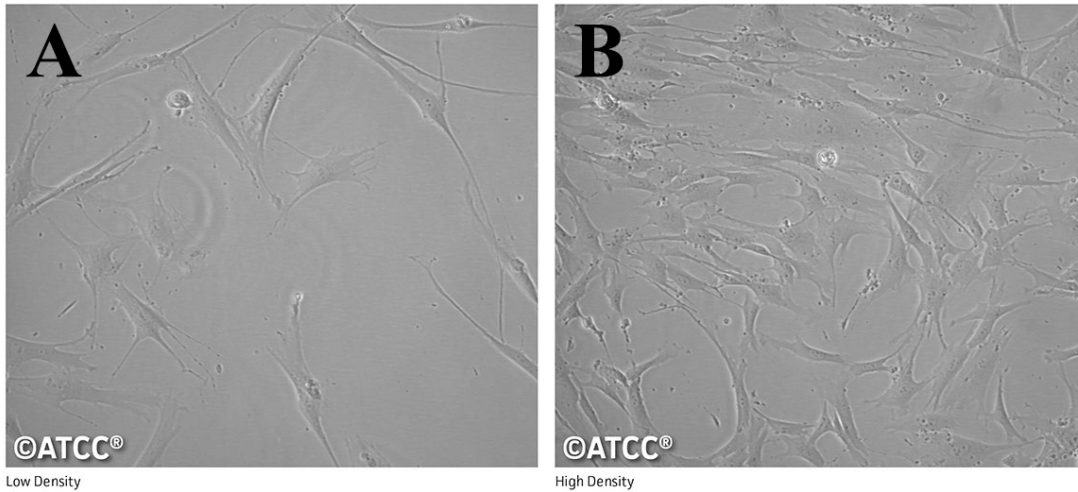
AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin antimikrobiyal özelliklerinin incelenmesi amacıyla in-vitro MTT testi yapılmıştır. Doku iskeleleri  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  boyutlarında hazırlanmış ve her bir yüzü 30 dakika boyunca UV (254 nm dalga boyunda) ile sterilize edilmiştir (n=3). 48 kuyucuklu plaka tabanlarına steril doku iskeleleri yerleştirilmiş ve klonlama silindirleri (Pyrex, İngiltere) ile sabitlenmiştir. Üretilen doku iskelelerinin antimikrobiyal aktivitelerinin ölçülmesi için *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri kullanılmıştır. Sıvı besiyeri olarak tryptic soy broth (TSB) kullanılmıştır. Liyofilize bakteri suşları TSB içerisinde 15 dakika 37 °C inkübatörde (Mettler, IN 110, Almanya) canlandırılmıştır. Tryptic soy agarda (TSA) bakteriler 2 kere pasajlandıktan sonra hücre densitometresi (Biosan, DEN-1) kullanılarak 0.5'er McFarland ( $1.5 \times 10^8$  koloni oluşturabilen birim (CFU)/mL) yoğunluğunda *E. coli* veya *S. aureus* çözeltileri hazırlanmıştır. *E. coli* veya *S. aureus* çözeltileri TSB ile 100 kat seyreltilerek 10'ar  $\mu\text{L}$  doku iskelelerinin üzerine ekilmiştir. Kontrol grubu olarak doku iskelesi içermeyen, klonlama silindiri içeren plakanın yüzeyine (TCPS) ekim yapılmıştır. Biyomalzemeler 3 saat boyunca bakterilerin yüzeylere tutunması için 37 °C inkübatörde bekletilmiş ve 750'şer  $\mu\text{L}$  TSB eklenmiştir.

24, 48 ve 72 saatlik inkübasyondan sonra canlılık analizlerinin gerçekleştirilmesi için DPBS içerisinde 5.5 mg/mL konsantrasyonu olan MTT çözeltisi hazırlanmıştır. İnkübasyon süreleri sonrasında sıvı besiyeri ortamdan uzaklaştırılıp DPBS ile yavaşça yıkanarak tutunmayan/ölü bakteriler doku iskelelerinden uzaklaştırılmıştır. Sonrasında kültür ortamına 500  $\mu\text{L}$  TSB ve 50  $\mu\text{L}$  MTT çözeltisi eklenip 37 °C inkübatörde 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası sıvı ortam uzaklaştırılıp yavaşça DPBS ile yavaşça yıkanmıştır. 400  $\mu\text{L}$  DMSO ile hücrelerdeki formazan yapılar çözülmüş ve 2 kopya olacak şekilde her örnekten 200'er  $\mu\text{L}$  formazan çözeltileri 96 kuyucuklu kültür kabına aktarılmıştır. 540 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda (Thermo Scientific, Multiskan Go, ABD) absorbans değerleri ölçülmüş ve 690 nm dalga boyu referans absorbans değeri olarak kabul edilmiştir.

### 3.2.5 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin BJ normal insan deri fibroblast hücre hattı ile etkileşiminin in-vitro olarak incelenmesi

AL-BSA ve farklı oranlarda pirol katkılanarak hazırlanan AL-BSA doku iskelelerinin sağlıklı insan hücrelerinin tutunmasına, büyümesine ve çoğalmasına olan etkilerinin incelenmesi amacıyla in-vitro MTT analizi gerçekleştirilmiştir.  $1 \times 1$  cm<sup>2</sup> boyutlarında hazırlanan doku iskelelerinin her bir yüzeyi 30 dakika boyunca UV ( $\lambda$ : 254 nm) ile sterilize edilmiştir (n=15). Steril doku iskeleleri 48 kuyucuklu plaka tabanları yerleştirildikten sonra klonlama silindirleri ile sabitlenmiştir. Üretilen doku iskelelerinin sağlıklı insan hücreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi için BJ normal insan deri fibroblast hücre hattı kullanılmıştır (Şekil 3.1). Besiyeri olarak EMEM ortamına %1 sodyum piruvat (h:h), %1 L-Glutamin (h:h), %1 penisilin-streptomisin (h:h) ve %10 fetal sığır serum (h:h) eklenmiştir. Her doku iskelesi üzerine  $20 \times 10^3$  BJ hücresi ekilmiştir. Kontrol grubu olarak doku iskelesi içermeyip klonlama silindiri içeren plakanın yüzeyine (TCPS) hücre ekimi yapılmıştır. Hücrelerin yüzeye tutunması için doku iskeleleri 4 saat boyunca 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> ortamına sahip inkübatörde (Thermo Scientific, 371, ABD) bekletilmiş ve daha sonra her bir kuyuya 1'er mL besiyeri eklenmiştir.

ATCC Number: CRL-2522  
Designation: BJ



Şekil 3.1 : BJ normal insan deri fibroblast hücre hattının düşük (A, low density) ve yüksek (B, high density) yoğunlukta ışık mikroskobu görüntüsü [96].

48 saatlik inkübasyondan sonra canlılık analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla DPBS içerisindeki konsantrasyonu 5.5 mg/mL olan MTT çözeltisi hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrası doku iskelelerinin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve

tutunmayan, ölmüş hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması için DPBS ile yavaşça yıkanmıştır. Ardından doku iskelelerinin üzerlerine 500 µL EMEM besiyeri (FBS içermeyen) ve 50 µL MTT çözeltisi eklenmiştir. 4 saat CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildikten sonra doku iskelelerinin üzerlerindeki çözelti uzaklaştırılmış ve DPBS ile yavaşça yıkanmıştır. Hücrelerde oluşan formazan kristalleri 400 µL DMSO eklenerek çözülmüştür. Her bir kuyudan 2 kopya olacak şekilde 200'er µL örnek alınarak 96 kuyucuklu kültür kabına aktarılmış ve 540 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda (Thermo Scientific, Multiskan Go, ABD) absorbans değerleri ölçülmüştür. 690 nm dalga boyu referans absorbans değeri olarak kabul edilmiştir.

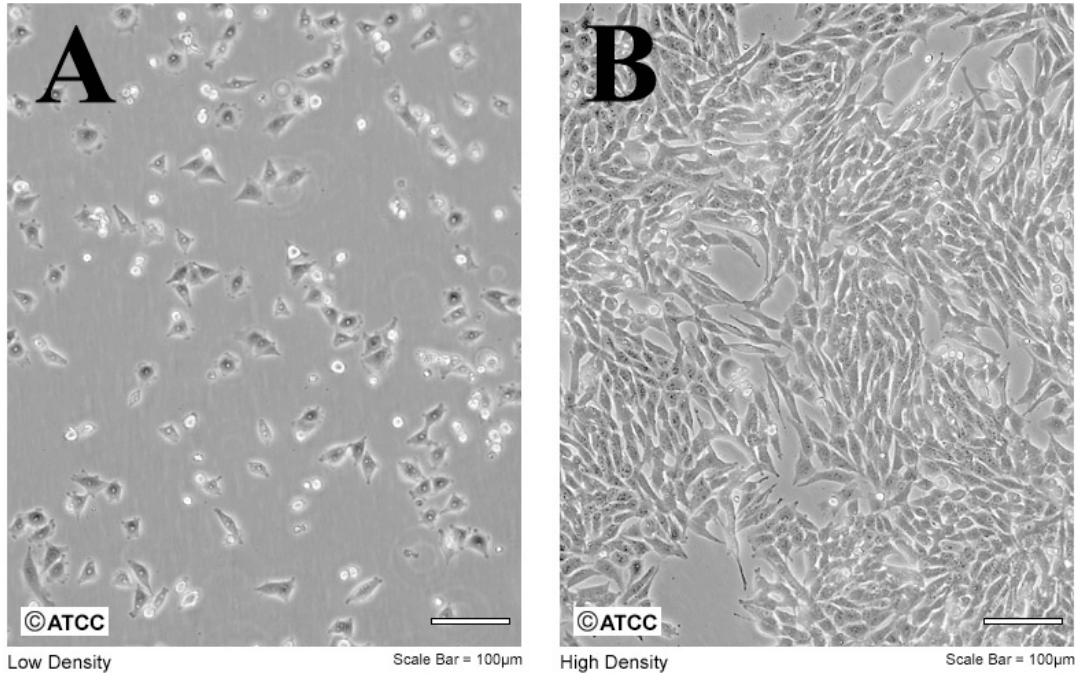
### **3.2.6 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin insan melanom hücre hattı ile etkileşiminin in-vitro olarak incelenmesi**

Farklı oranlarda pirol katkılanarak hazırlanan AL-BSA doku iskelelerinin insan melanom hücrelerinin tutunmasına, büyümesine ve çoğalmasına olan etkilerinin incelenmesi amacıyla in-vitro MTT testi gerçekleştirilmiştir. 1 × 1 cm<sup>2</sup> boyutlarında hazırlanan doku iskelelerinin her bir tarafı 30 dakika boyunca UV (254 nm dalga boyu) ile sterilize edilmiştir (n=9). Steril doku iskeleleri 48 kuyucuklu plaka tabanları yerleştirildikten sonra klonlama silindirleri (Pyrex, İngiltere) ile sabitlenmiştir. Üretilen doku iskelelerinin sağlıklı insan hücreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi için A375 hücre hattı kullanılmıştır (Şekil 3.2). Besiyeri olarak DMEM ortamına %2 L-Glutamin (h:h), %1 penisilin-streptomisin (h:h) ve %10 fetal sığır serum (h:h) eklenmiştir. Her doku iskelesi üzerine 20 × 10<sup>3</sup> A375 hücresi ekilmiştir. Kontrol grubu olarak doku iskelesi içermeyen, klonlama silindiri içeren plakanın yüzeyine (TCPS) hücre ekimi yapılmıştır. Hücrelerin yüzeye tutunması için doku iskeleleri 4 saat boyunca 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> ortamına sahip inkübatörde (Thermo Scientific, 371, ABD) bekletilmiş ve daha sonra her bir kuyuya 1'er mL besiyeri eklenmiştir.

24 saatlik inkübasyondan sonra canlılık analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla DPBS içerisindeki konsantrasyonu 5.5 mg/mL olan MTT çözeltisi hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrası doku iskelelerinin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve tutunmayan/ölmüş hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması için DPBS ile yavaşça yıkanmıştır. Ardından doku iskelelerinin üzerlerine 500 µL DMEM besiyeri (FBS

içermeyen) ve 50 µL MTT çözeltisi eklenmiştir. 4 saat CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildikten sonra doku iskelelerinin üzerlerindeki çözelti uzaklaştırılmış ve DPBS ile yavaşça yıkanmıştır. Hücrelerde oluşan formazan kristalleri 400 µL DMSO eklenerek çözülmüştür. Her bir kuyudan 2 suretli olacak şekilde 200'er µL örnek alınarak 96 kuyucuklu kültür kabına aktarılmış ve 540 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda (Thermo Scientific, Multiskan Go, ABD) absorbans değerleri ölçülmüştür. 690 nm dalga boyu referans absorbans değeri olarak kabul edilmiştir.

ATCC Number: **CRL-1619**  
Designation: **A-375**



Şekil 3.2 : A375 insan melanom hücre hattının düşük (A, low density) ve yüksek (B, high density) yoğunlukta ışık mikroskobu görüntüsü [97].

### 3.2.7 İstatistiksel analizler

Analizler sonucu elde edilen verilen ortalama ve standart sapma ( $\pm$ ) ile verilmiştir. İstatistiksel hesaplamalar için OriginPro v.9.65 programında tek yönlü ANOVA analiz metodu ve Tukey post hoc karşılaştırma yöntemi kullanılmış ve sonuçların anlamlı farklılık seviyeleri ile karşılaştırılmıştır. Anlamlı farklılık seviyesi %95 olarak kabul edilmiştir ( $p < 0.05$ ).



## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Pirol Katkılanmış Amiloid Benzeri Sığır Serum Albümin Nanofibröz Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

#### 4.1.1 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin morfolojik karakterizasyonu

Elektro-eğirme işlemi dikey doğrultuda kurulmuş ve sistem parametreleri (akış hızı 0.12 - 0.30 mL/sa ve uygulanan gerilim 12 - 21 kV aralığında değiştirilirken, iğne ucu ve toplayıcı arası uzaklık 11 cm olarak sabit tutulmuştur) değiştirilerek fiber oluşumu optimize edilmiştir. AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA yapılar 30 saniye boyunca lam yüzeyine toplanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir.

Taylor Konisi oluşumu, şekli ve stabilitesi takip edilirken, boncuksuz yapıda, homojen fiber çapına sahip ve sürekli olan elektro-eğrilmiş fiber morfolojileri bulunan parametreler optimize elektro-eğirme parametresi olarak kabul edilmiştir. AL-BSA, %5, %10, %20 ve %50 oranlarında pirol katkılanmış AL-BSA elektro-eğrilmiş nanofiberlerin optimum elektro-eğirme parametreleri Çizelge 4.1'de belirtilmiştir. Elektro-eğirme ortam sıcaklığı  $25 \pm 2$  °C ve ortam nemi  $40 \pm 5$  olarak ayarlanmıştır. Optimize edilmiş AL-BSA ve farklı oranlarda pirol katkılanmış AL-BSA nanofiber yapıları ışık mikroskop görüntüleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Elektro-eğrilmiş AL-BSA ve farklı oranlarda pirol katkılanmış AL-BSA nanofiberlerin çapları ImageJ uygulaması kullanılarak ölçülmüştür. Şekil 4.3'te taramalı elektron mikroskobu görüntüleri bulunan nanofiberlerin her birinin 20 farklı bölgesinden alınan uzunluklardan fiber çaplarının ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

3 saat boyunca toplayıcı üzerinde biriktirilen AL-BSA doku iskelesinin görüntüsü Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 : AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA nanofiberlerin optimize edilmiş elektro-eğirme parametreleri.

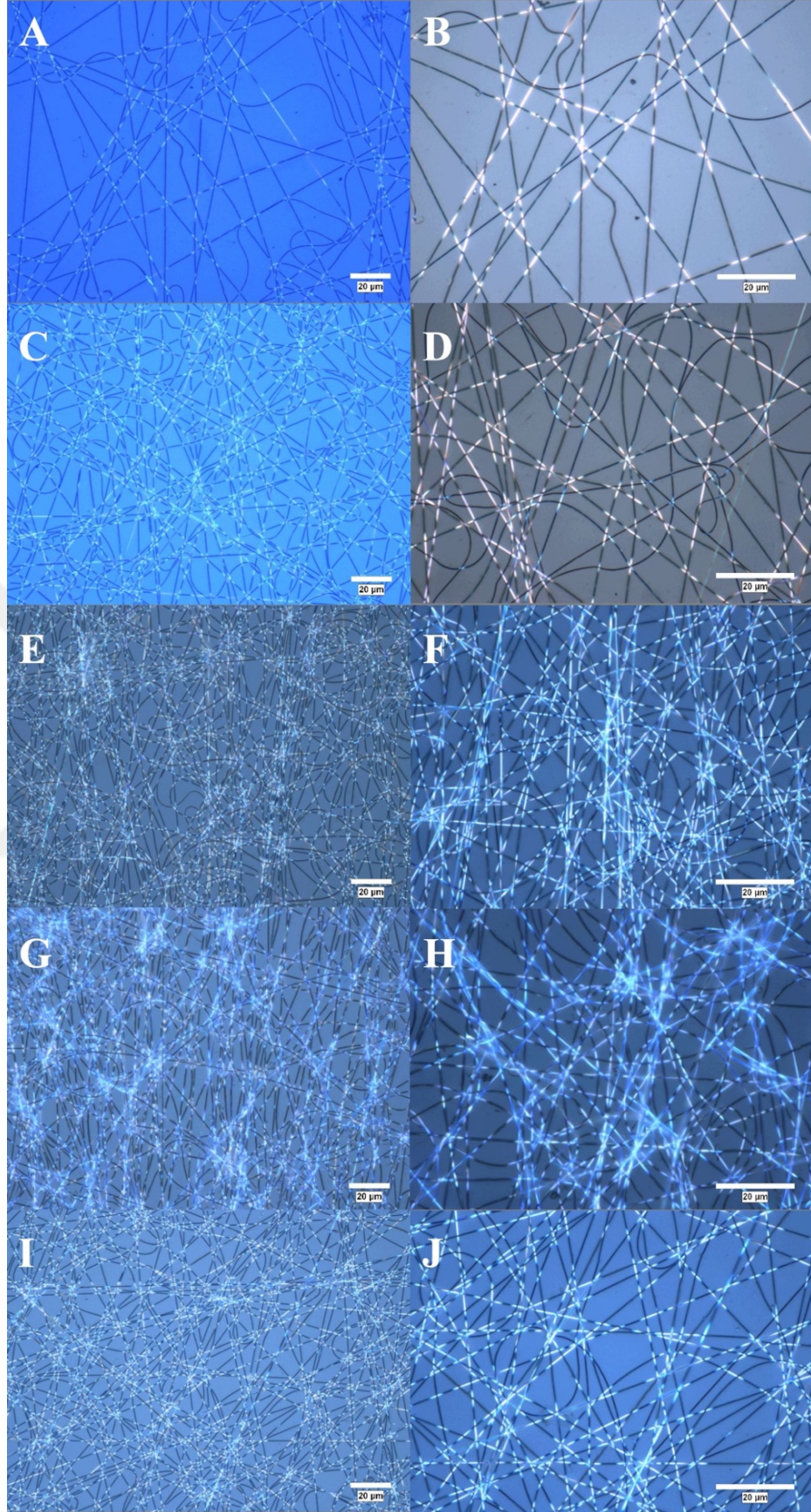
Doku iskeleleri	İğne ucu ve toplayıcı arası uzaklık (cm)	Akış hızı (mL/sa)	Uygulanan voltaj (kV)
AL-BSA	11	0.22	15
5% Pd-AL-BSA	11	0.18	15
10% Pd-AL-BSA	11	0.20	15
20% Pd-AL-BSA	11	0.22	18
50% Pd-AL-BSA	11	0.16	12

Çizelge 4.2 : AL-BSA ve farklı oranlarda pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerine ait nanofiber çap değerleri.

Doku iskeleleri	Elektro-eğrilmiş nanofiber çapları (nm)
AL-BSA	97.77 ± 18.69
%5 Pd-AL-BSA	147.97 ± 13.36
%10 Pd-AL-BSA	91.83 ± 15.15
%20 Pd-AL-BSA	114.77 ± 21.57
%50 Pd-AL-BSA	102.23 ± 20.86

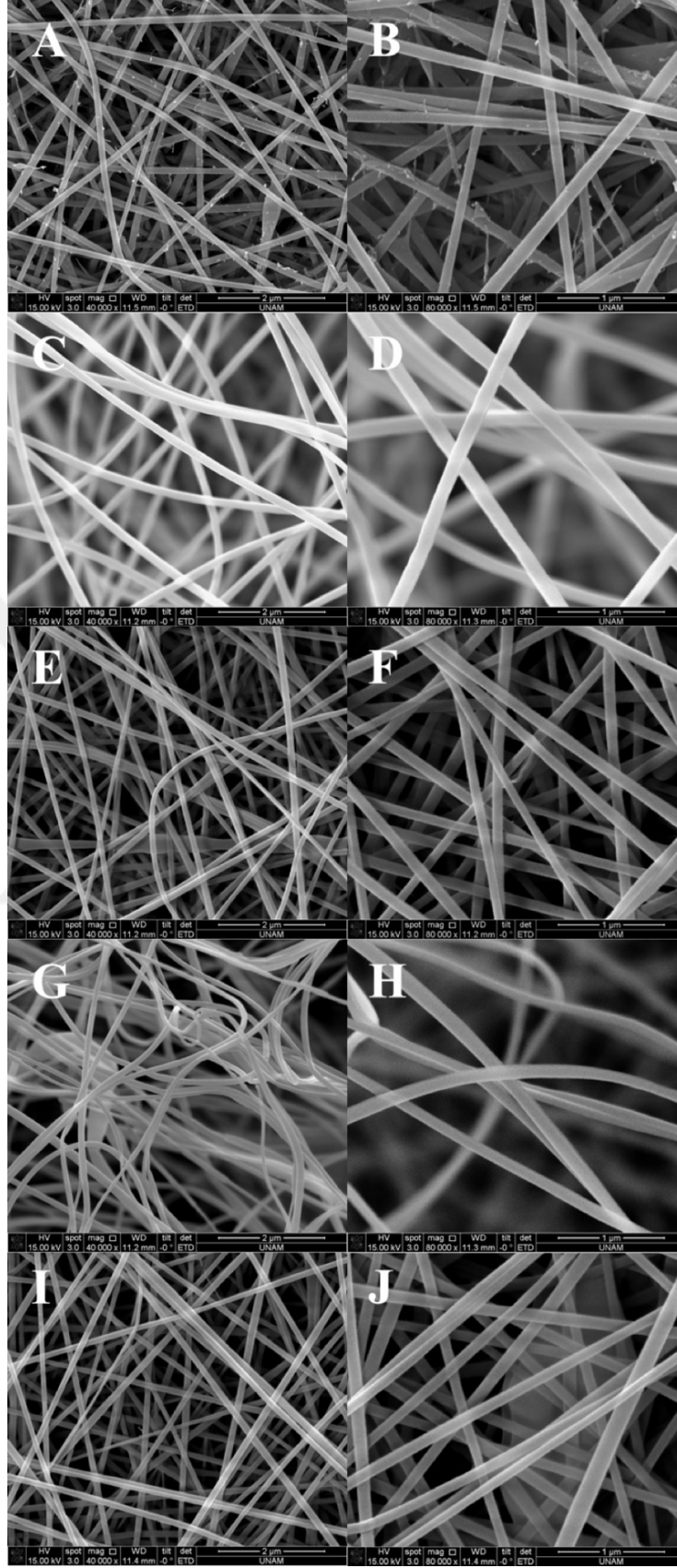


Şekil 4.1 : Alüminyum folyo üzerinde 3 saat biriktirme süresi sonrası AL-BSA doku iskelesinin görüntüsü.



Şekil 4.2 : Elektro-eğrilmiş AL-BSA (A, B), %5 Pd-AL-BSA (C, D), %10 Pd-AL-BSA (E, F), %20 Pd-AL-BSA (G, H), %50 Pd-AL-BSA (I, J) nanofiberlerin ışık mikroskobu görüntüleri (50 (A, C, E, G, I) ve 100 (ve B, D, F, J) kat büyütme).

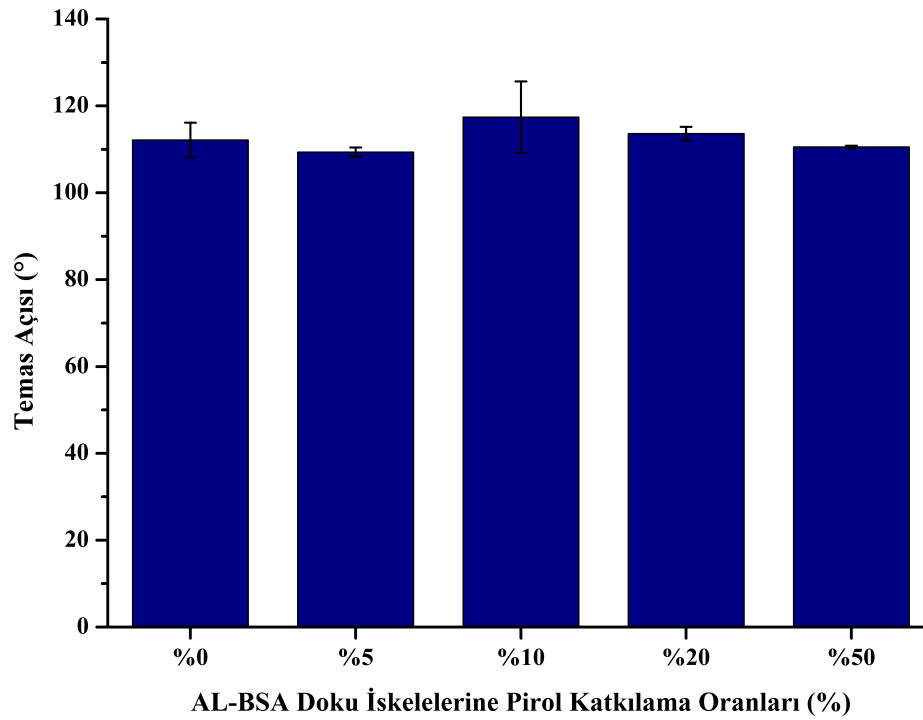




Şekil 4.3 : Elektro-eğrilmiş AL-BSA (A, B), %5 Pd-AL-BSA (C, D), %10 Pd-AL-BSA (E, F), %20 Pd-AL-BSA (G, H), %50 Pd-AL-BSA (I, J) nanofiberlerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (40,000 (A, C, E, G, I) ve 80,000 (B, D, F, H, J) kat büyütme).

#### 4.1.2 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin temas açısı ölçümleri

AL-BSA ve farklı oranlarda pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin ıslanabilirlik özellikleri temas açısı ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Doku iskelelerinin temas açıları Şekil 4.4'te gösterilmiştir. AL-BSA doku iskelesinin temas açısı  $112.15 \pm 3.98^\circ$  olarak ölçülürken %5 Pd-AL-BSA  $109.36 \pm 1.09^\circ$ , %10 Pd-AL-BSA  $117.42 \pm 8.22^\circ$ , %20 Pd-AL-BSA  $113.63 \pm 1.56^\circ$  ve %50 Pd-AL-BSA  $110.54 \pm 0.30^\circ$  temas açısı göstermiştir. Doku iskeleleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.



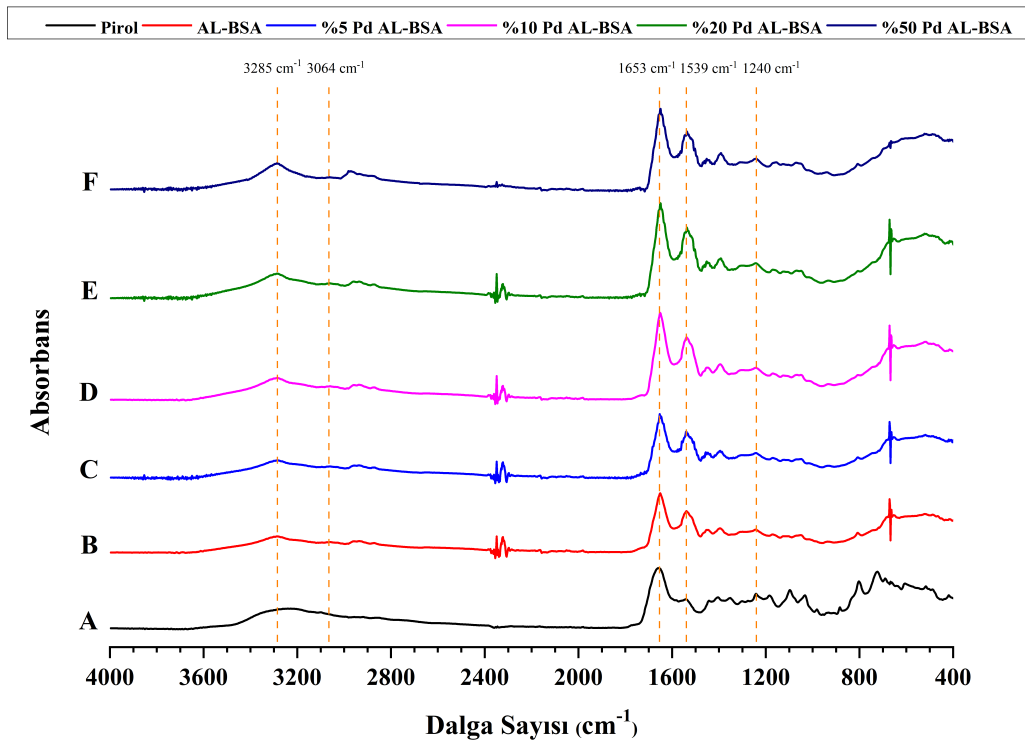
Şekil 4.4 : AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin temas açısı değerleri.

Doku iskelelerinin bileşiminden bağımsız olarak, tüm doku iskelelerinin temas açısı değerleri  $90^\circ$ 'den büyüktür ve bu doku iskelelerinin hidrofobik karakteristik gösterdiği anlamına gelmektedir [98]. AL-BSA doku iskelelerine pirol katkılanması ile temas açısında hafif değişiklikler meydana gelmektedir. Fakat artan pirol oranına karşılık temas açısı değerlerinde bir eğilim tespit edilememiştir. Her doku iskelesi türünün farklı ortalama fiber çapına, gözenek boyutuna, yüzey pürüzlülüğüne, yüzey alanına ve kimyasal bileşime sahip olmasından dolayı örnekler arasında karşılaştırma yapılamamaktadır. Fakat tüm doku iskelelerinin yüzeyine damlatılan  $\sim 12 \mu\text{L}$  ultra-

saf su yaklaşık 30 saniye içerisinde emilmiştir. Bu nedenle su temas açılarının ölçümü yalnızca testin başlangıcında anlamlıdır [98–101].

#### 4.1.3 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile kimyasal karakterizasyonu

AL-BSA, %5 Pd-AL-BSA, %10 Pd-AL-BSA, %20 Pd-AL-BSA ve %50 Pd-AL-BSA doku iskelelerinin FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Pirol, AL-BSA ve farklı oranlarda pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin FTIR spektrumları Şekil 4.5'te verilmiştir.



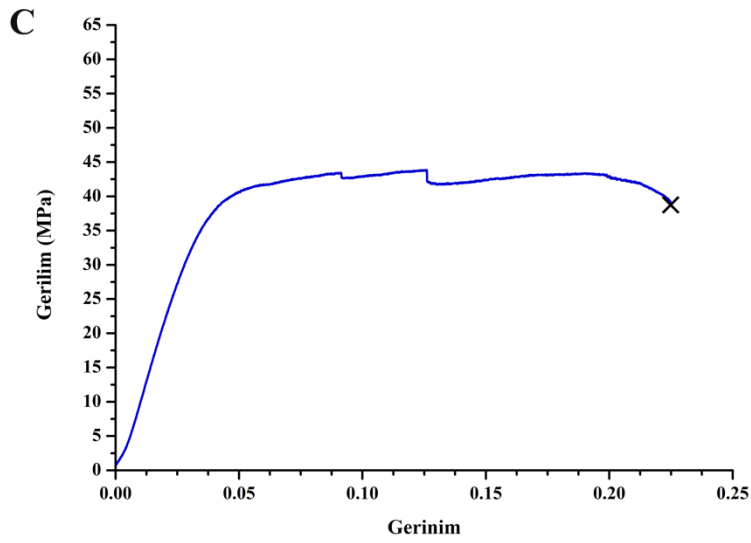
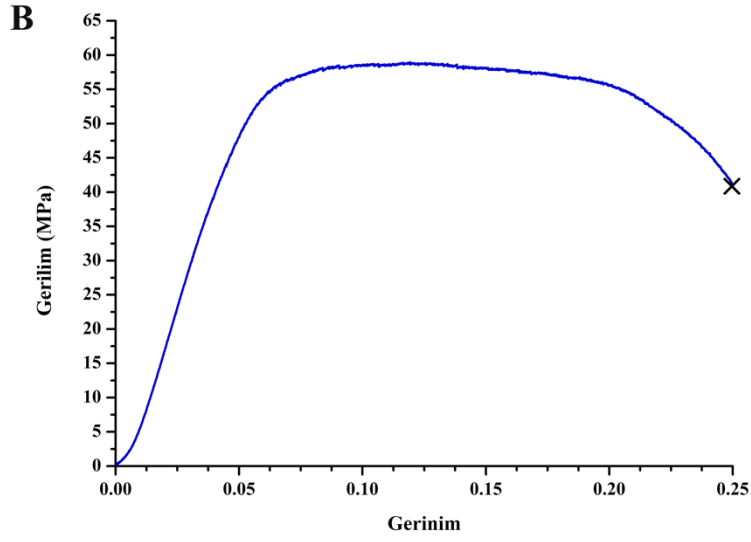
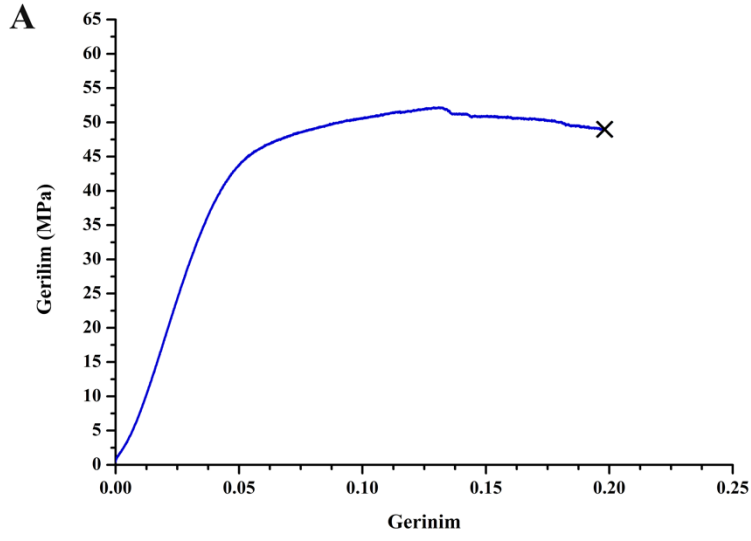
Şekil 4.5 : Pirol (A), AL-BSA (B), %5 Pd-AL-BSA (C), %10 Pd-AL-BSA (D), %20 Pd-AL-BSA (E) ve %50 Pd-AL-BSA (F) doku iskelelerinin FTIR spektrumları.

Şekil 4.5'teki FTIR grafiklerinde AL-BSA (Şekil 4.5.B) doku iskelesine ait pikler analiz edildiğinde; 3285 cm<sup>-1</sup>' de -OH ve -NH gerilme (amit A) gerilme görülmüştür. 3064, 1653, 1539 ve 1240 cm<sup>-1</sup>' de ki pikler sırasıyla amit B, amit I, amit II ve amit III'e aittir. Pirol'ün (Şekil 4.5.A) FTIR spektrumundaki piklere bakıldığında 3285 cm<sup>-1</sup> dalga sayısında N-H gerilme bağları, 1653 ve 1539 cm<sup>-1</sup>' de C=C veya N-H bükülme bağları, 1240, 1096 ve 1034 cm<sup>-1</sup>' de C-N bağları ve 800 ile 725 cm<sup>-1</sup>' de C-H bağları görülmektedir [52–55,74].

AL-BSA doku iskelelerine %5, %10, %20 ve %50 oranlarında pirol katkılanmasıyla Şekil 4.5'te gösterilen sırasıyla C, D, E, F'de FTIR spektrumları elde edilmiştir. AL-BSA doku iskelesine katkılanan pirol oranı arttıkça; 3285 cm<sup>-1</sup>' deki N-H gerilme, 1539 cm<sup>-1</sup>' deki C=C veya N-H bükülme, 1240 cm<sup>-1</sup>' deki C-N bağlarının pik absorbans değerleri artmıştır [102]. Böylelikle pirolün AL-BSA doku iskelelerine katkılı olduğu kimyasal olarak gösterilmiştir.

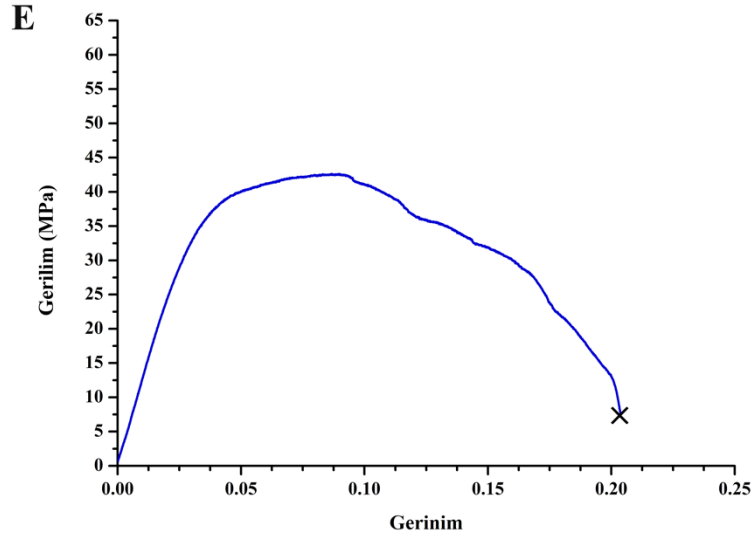
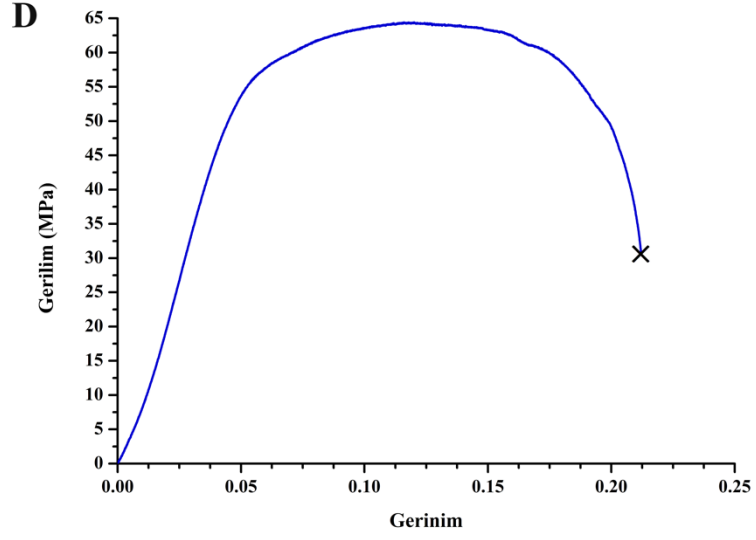
#### **4.1.4 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sıgır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin çekme testi ile mekanik özelliklerinin karakterizasyonu**

AL-BSA, %5 Pd-AL-BSA, %10 Pd-AL-BSA, %20 Pd-AL-BSA ve %50 Pd-AL-BSA doku iskeleleri mekanik dayanımlarının incelenmesi için çekme testine tabi tutulmuştur. Doku iskelelerine çekme testi uygulanması sonucunda gerinim-gerilim verileri elde edilmiş ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir. AL-BSA doku iskelelerinin elastisite modülleri, akma dayanımları ve maksimum çekme dayanımları Çizelge 4.3'te verilmiştir. AL-BSA, %5, %10, %20 ve %50 Pd-AL-BSA doku iskelelerinin elastisite modülleri sırasıyla 1021.7 ± 1.2, 1080.5 ± 0.9, 1139.0 ± 1.1, 1205.7 ± 2.3 ve 1215.1 ± 1.6 MPa olarak hesaplanmıştır. Pirol katkılanmış AL-BSA doku iskeleleri ile AL-BSA doku iskelesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür (p<0.05). AL-BSA doku iskelesine artan oranlarda pirol katkılanmasının kompozit doku iskelesinin elastisite modüllerini arttırmasının sebebinin, pirol birimlerinin polimerik matriks ile bütünleşmiş bir dolgu görevi görmesi olduğu düşünülmektedir [103]. AL-BSA ve Pd-AL-BSA doku iskelelerinin akma dayanımları veya maksimum çekme dayanımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Pirolün AL-BSA'ya artan oranlarda katkılanması akma dayanımı ve maksimum çekme dayanımını belirli bir eğilimde etkilememiştir. Doku iskelelerinin ortalama fiber çap değerleri, gözenek büyüklükleri ve geometrilerinin de akma dayanımı ve maksimum çekme dayanımı üzerinde etkiye sahip olmasından dolayı net bir karşılaştırma yapılamamaktadır [104].



Şekil 4.6 : AL-BSA (A), %5 Pd-AL-BSA (B), %10 Pd-AL-BSA (C), %20 Pd-AL-BSA (D) ve %50 Pd-AL-BSA (E) doku iskelelerine ait gerinim-gerilim grafiği.





Şekil 4.6 : (devam) AL-BSA (A), %5 Pd-AL-BSA (B), %10 Pd-AL-BSA (C), %20 Pd-AL-BSA (D) ve %50 Pd-AL-BSA (E) doku iskelelerine ait gerinim-gerilim grafiği.

Çizelge 4.3 : AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerine ait elastisite modülü, akma dayanımı ve maksimum çekme dayanımı değerleri.

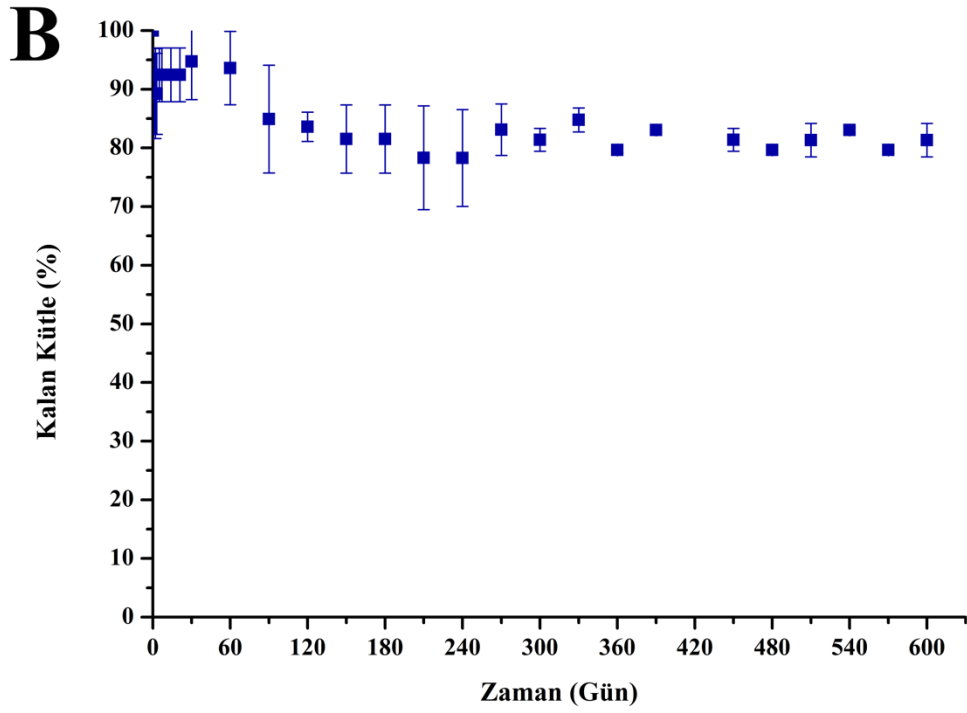
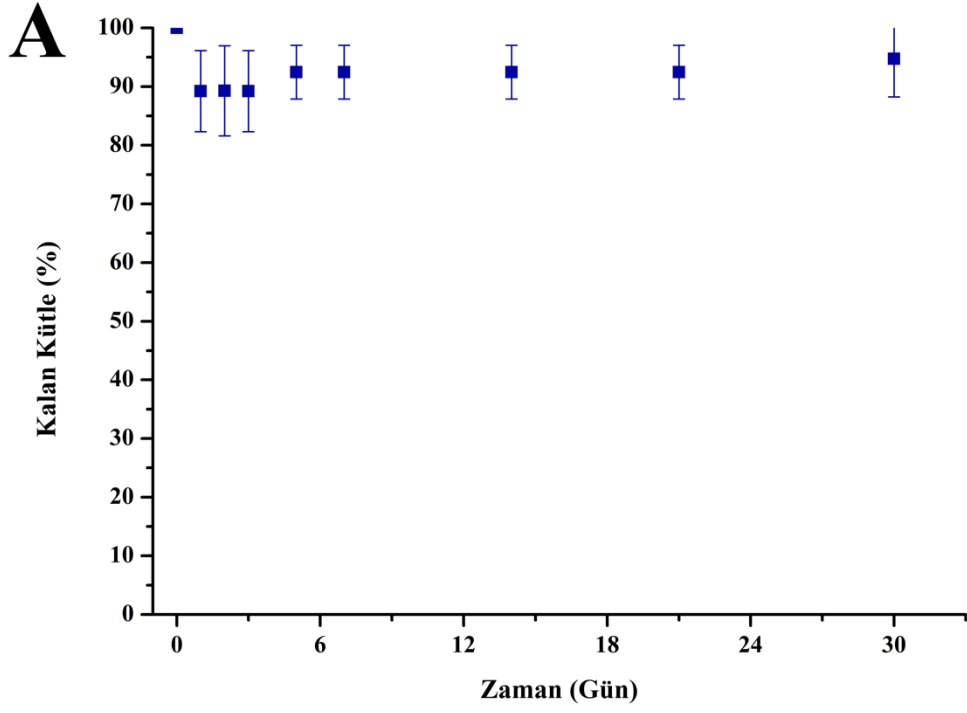
Doku iskeleleri	Elastisite Modülü (MPa)	Akma Dayanımı (MPa)	Maksimum Çekme Dayanımı (MPa)
AL-BSA	1021.7 ± 1.2	37.19 ± 1.79	52.21 ± 2.03
%5 Pd-AL-BSA	1080.5 ± 0.9	41.22 ± 0.98	58.96 ± 1.38
%10 Pd-AL-BSA	1139.0 ± 1.1	32.82 ± 1.92	43.87 ± 1.29
%20 Pd-AL-BSA	1205.7 ± 2.3	48.71 ± 2.49	64.42 ± 2.17
%50 Pd-AL-BSA	1215.1 ± 1.6	32.18 ± 3.01	42.63 ± 1.05

#### 4.1.5 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin in-vitro hidrolitik ve enzimatik degradasyon özelliklerinin incelenmesi

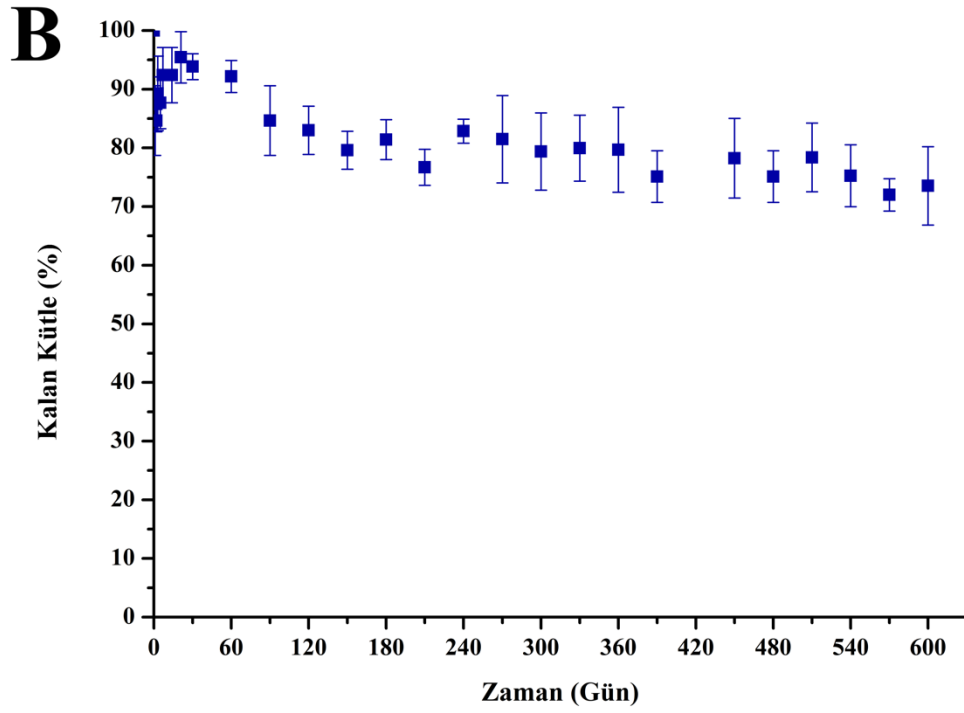
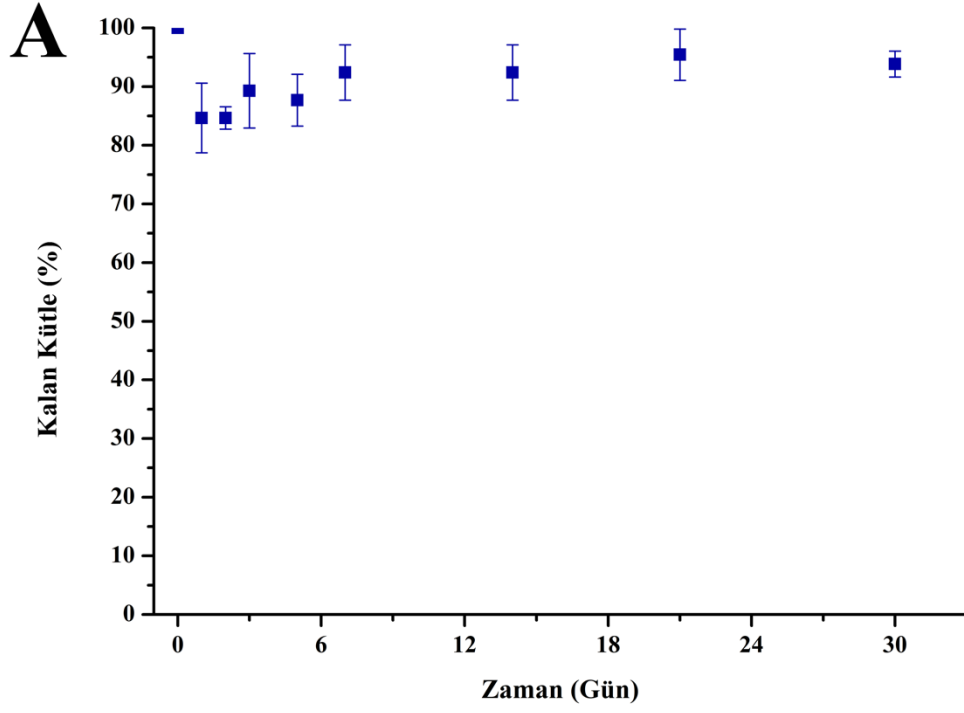
AL-BSA, %5 Pd-AL-BSA, %10 Pd-AL-BSA, %20 Pd-AL-BSA ve %50 Pd-AL-BSA doku iskelelerinin kütlece %0.1 sodyum azit içeren PBS (pH:7.4) içerisinde 600 gün boyunca hidrolitik degradasyona tabi tutulmuştur. Belirli aralıklarda doku iskelelerinin ilk ana göre kalan kütle yüzdeleri hesaplanmış ve sırasıyla Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de gösterilmiştir.

İlk 30 günün sonunda AL-BSA’da %5.28 ± 6.47, %5 Pd-AL-BSA’da %6.15 ± 2.21, %10 Pd-AL-BSA’da %16.86 ± 0.33, %20 Pd-AL-BSA’da %10.00 ± 0.91 ve %50 Pd-AL-BSA’da %14.45 ± 1.04 kütlece azalma görülmüştür.

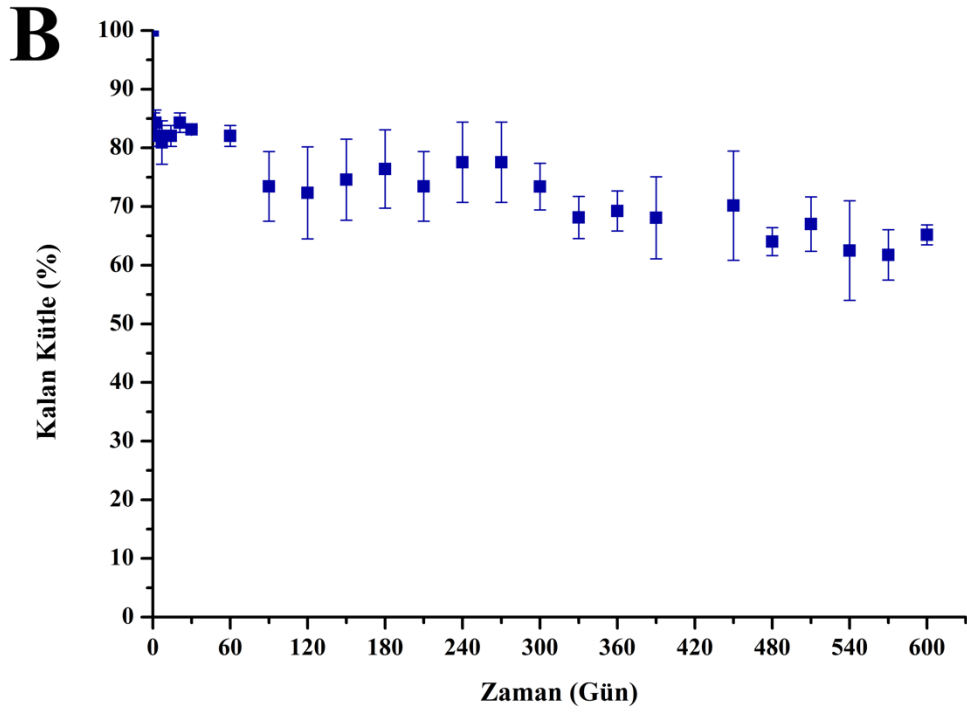
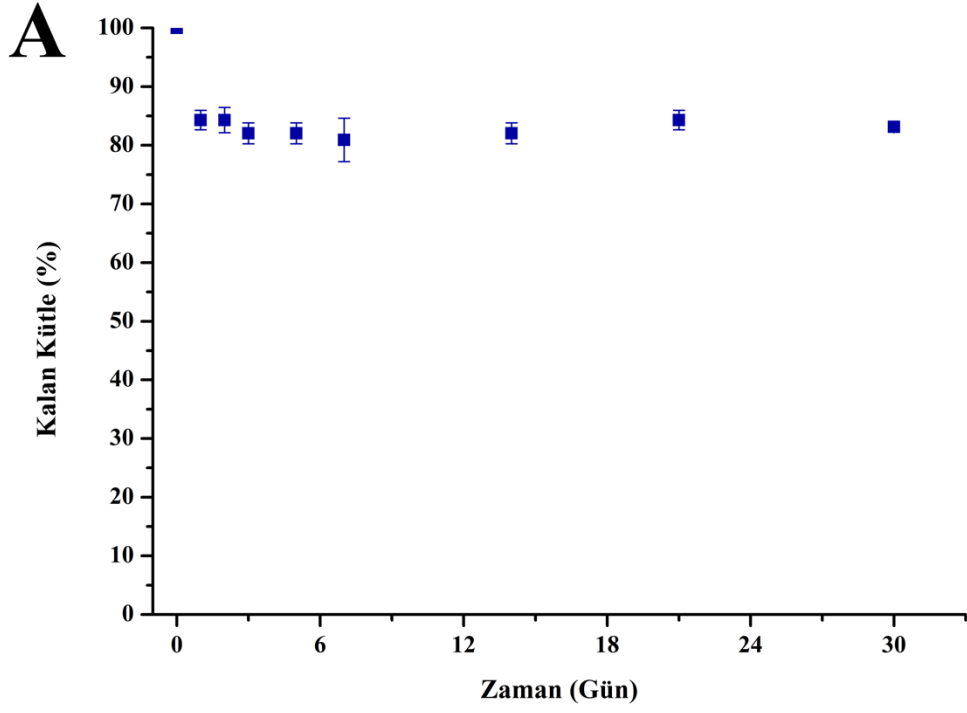
600 günün sonunda ise kütlece AL-BSA’da %18.68 ± 2.84, %5 Pd-AL-BSA’da %26.47 ± 6.68, %10 Pd-AL-BSA’da %34.83 ± 1.69, %20 Pd-AL-BSA’da %20.61 ± 1.05 ve %50 Pd-AL-BSA’da %27.13 ± 6.60 azalma görülmüştür.



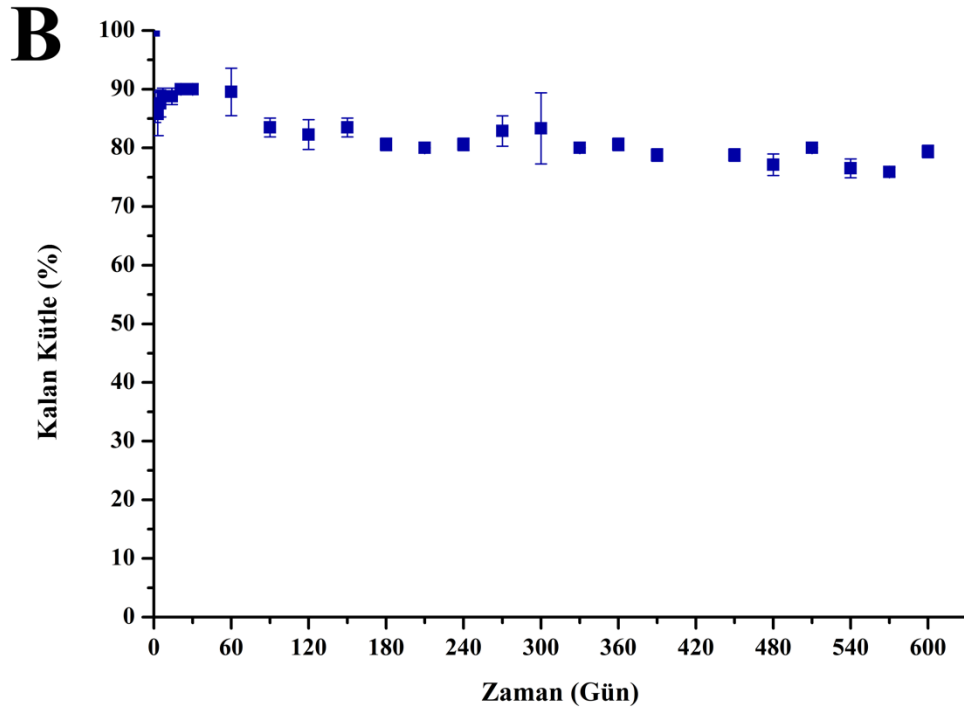
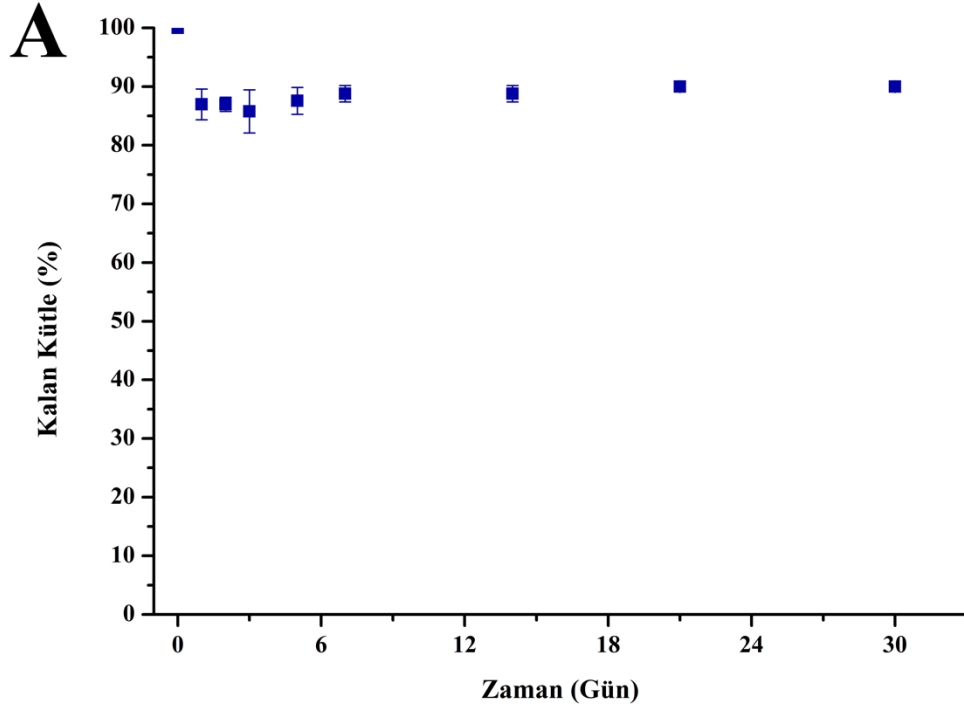
Şekil 4.7 : AL-BSA doku iskelesinin 30 (A) ve 600 (B) gün hidrolitik degradasyon sonucundaki yüzdece kütle değişimleri.



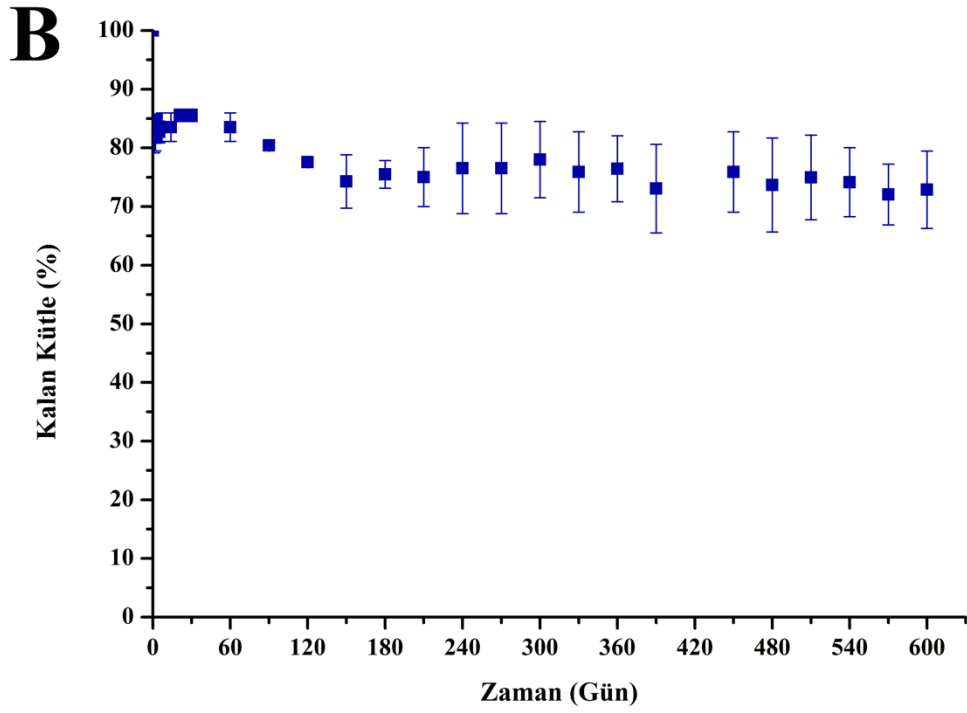
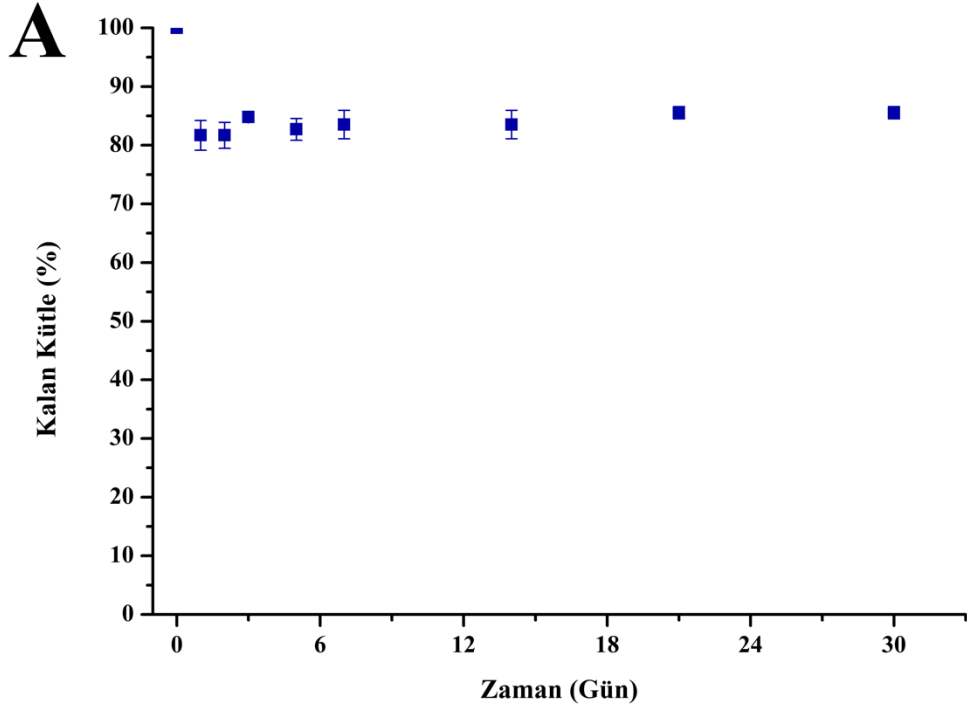
Şekil 4.8 : %5 Pd-AL-BSA doku iskelesinin 30 (A) ve 600 (B) gün hidrolitik degradasyon sonucundaki yüzde kütle değişimleri.



Şekil 4.9 : %10 Pd-AL-BSA doku iskelesinin 30 (A) ve 600 (B) gün hidrolitik degradasyon sonucundaki yüzde kütle değişimleri.



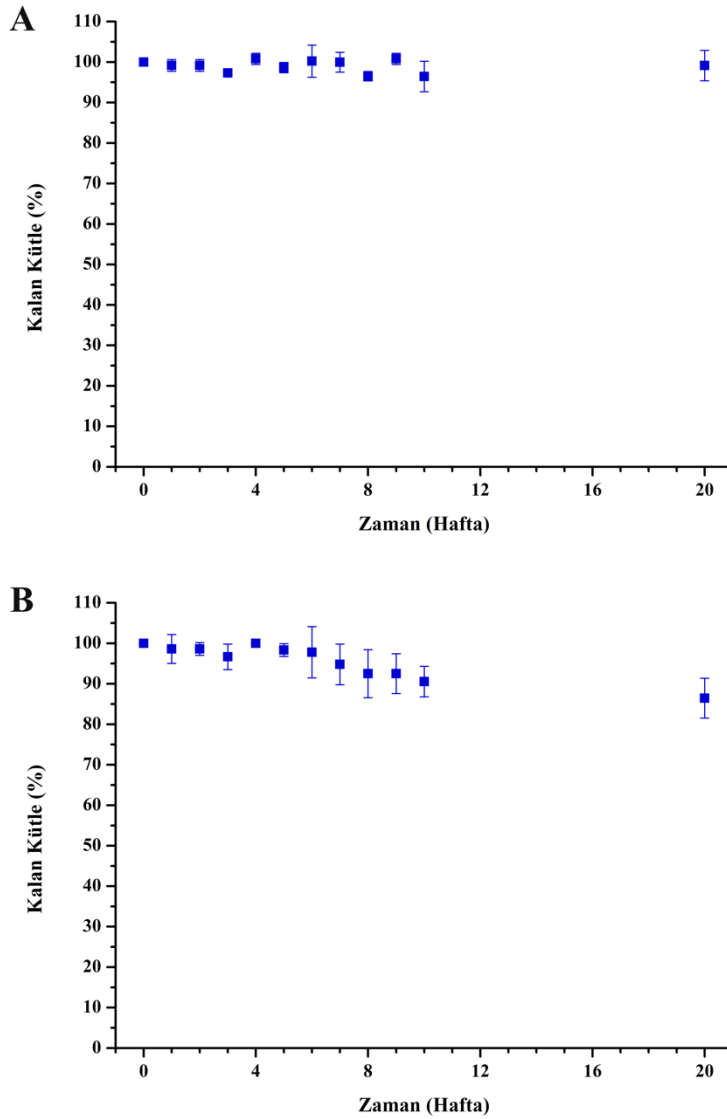
Şekil 4.10 : %20 Pd-AL-BSA doku iskelesinin 30 (A) ve 600 (B) gün hidrolitik degradasyon sonucundaki yüzdece kütle değişimleri.



Şekil 4.11 : %50 Pd-AL-BSA doku iskelesinin 30 (A) ve 600 (B) gün hidrolitik degradasyon sonucundaki yüzdece kütle değişimleri.

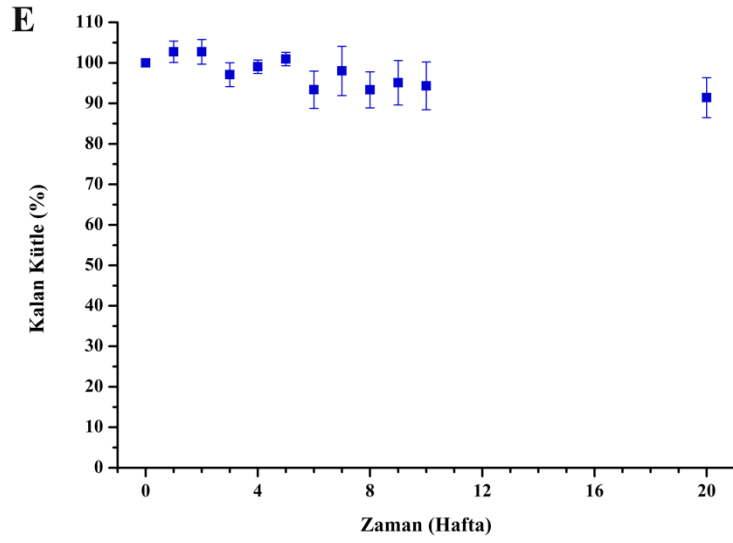
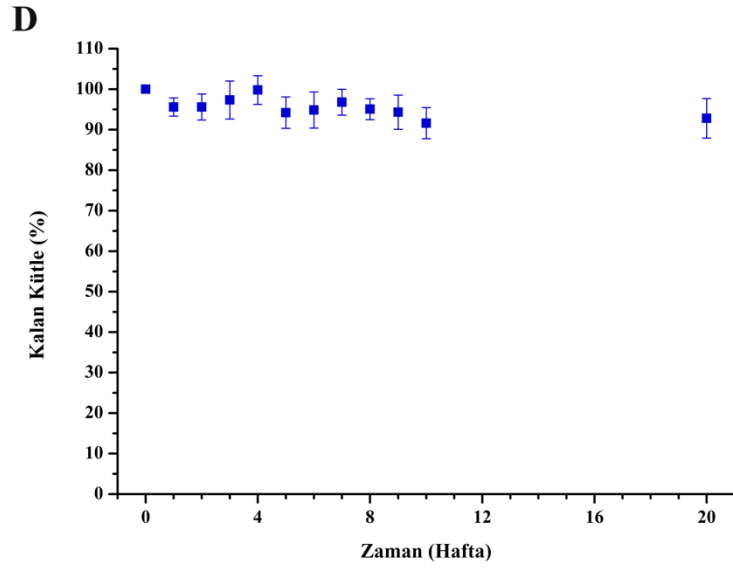
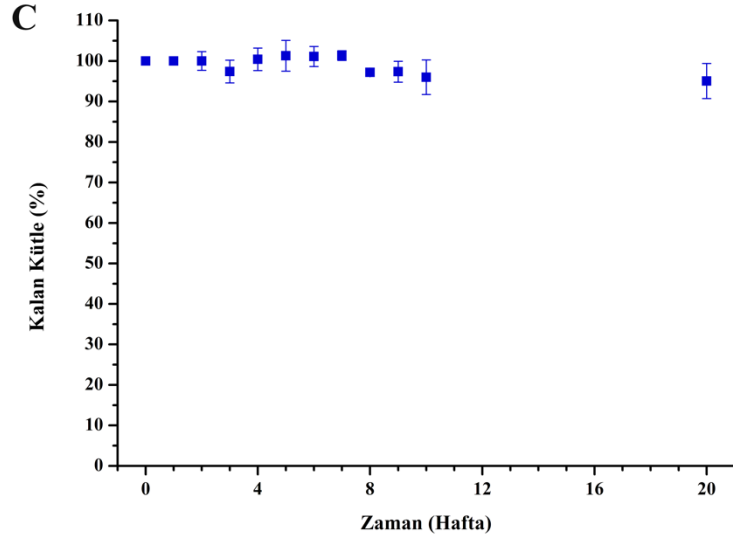
1 mg/mL lizozim ve kütlece %0.1 sodyum azit içeren PBS içerisinde AL-BSA ve farklı oranlarda pirol katkılanmış AL-BSA doku iskeleleri 20 hafta boyunca enzimatik degradasyona tabi tutulmuştur. Belirli aralıklarda doku iskelelerinin ilk ana göre kalan kütle yüzdeleri hesaplanmış ve Şekil 4.12’de gösterilmiştir.

20 hafta enzimatik degradasyon sonunda AL-BSA’da  $0.87 \pm 3.77$ , %5 Pd-AL-BSA’da  $13.55 \pm 4.92$ , %10 Pd-AL-BSA’da  $4.95 \pm 4.32$ , %20 Pd-AL-BSA’da  $7.19 \pm 4.89$  ve %50 Pd-AL-BSA’da  $8.59 \pm 4.94$  kütlece azalma görülmüştür.



Şekil 4.12 : AL-BSA (A), %5 Pd-AL-BSA (B), %10 Pd-AL-BSA (C), %20 Pd-AL-BSA (D) ve %50 Pd-AL-BSA (E) doku iskelelerinin 20 haftalık enzimatik degradasyon sonucundaki yüzde kütle değişimleri.





Şekil 4.12 : (devam) AL-BSA (A), %5 Pd-AL-BSA (B), %10 Pd-AL-BSA (C), %20 Pd-AL-BSA (D) ve %50 Pd-AL-BSA (E) doku iskelelerinin 20 haftalık enzimatik degradasyon sonucundaki yüzde kütle değişimleri.

#### 4.1.6 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin antimikrobiyal özelliklerinin incelenmesi

AL-BSA ve farklı oranlarda pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi için MTT testi yapılmıştır. Hücre kültürü plaka yüzeyi (TCPS) pozitif kontrol olarak seçilmiş ve %100 olarak kabul edilmiştir. Doku iskelelerindeki formazan absorpsiyon değerleri TCPS'ye göre yüzde olarak hesaplanmıştır. AL-BSA ve Pd-AL-BSA doku iskelelerinin *E. coli* ve *S. aureus* canlılığı üzerindeki etkileri sırasıyla Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te gösterilmiştir.

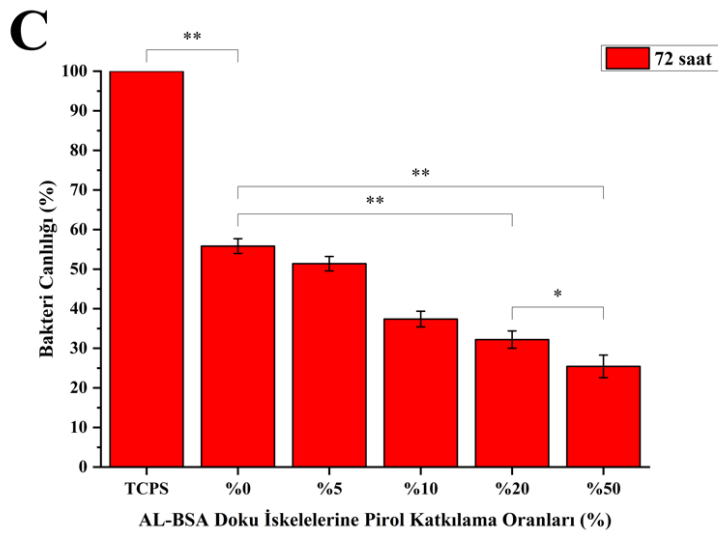
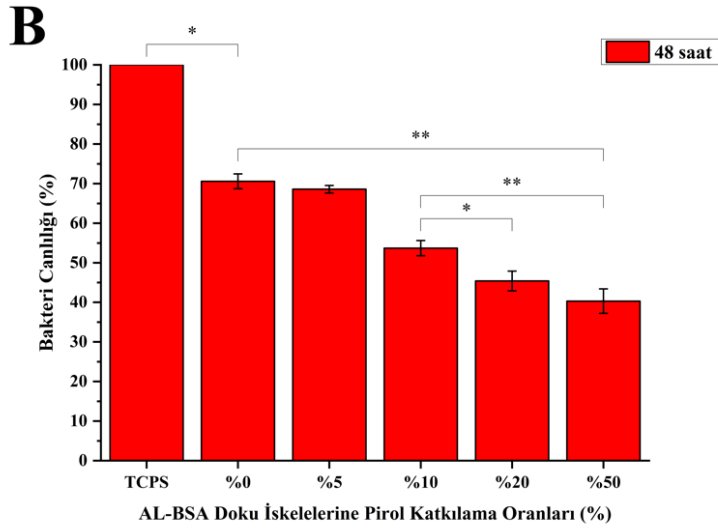
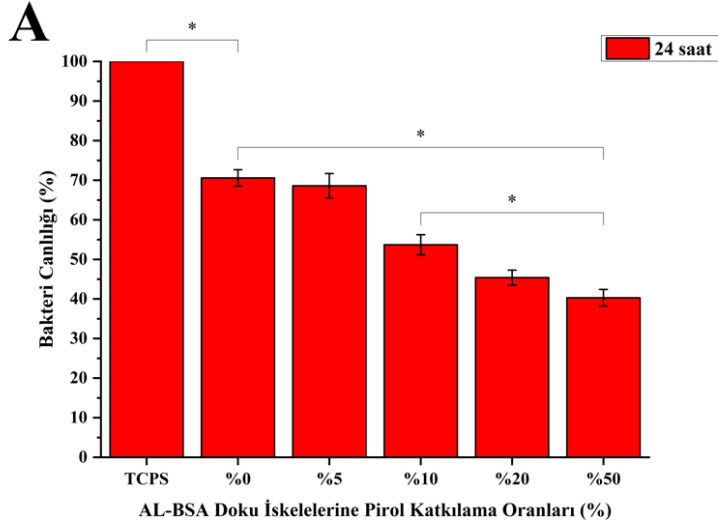
Doku iskelelerinin *E. coli* ile 24 saatlik inkübasyon sonunda AL-BSA, TCPS'ye kıyasla bakteri canlılığında  $29.42 \pm 2.08$  azalmaya neden olmuştur. AL-BSA'ya kıyasla %5 Pd-AL-BSA  $2.82 \pm 3.09$ , %10 Pd-AL-BSA  $23.90 \pm 2.54$ , %20 Pd-AL-BSA  $35.69 \pm 1.91$  ve %50 Pd-AL-BSA  $42.92 \pm 2.09$  oranlarında *E. coli* canlılığını inhibe etmiştir. *E. coli* ile doku iskelelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonunda TCPS'ye kıyasla AL-BSA  $34.81 \pm 1.87$  canlılıkta azalmaya sebep olmuştur. AL-BSA'ya kıyasla %5 Pd-AL-BSA  $3.76 \pm 0.94$ , %10 Pd-AL-BSA  $29.87 \pm 1.93$ , %20 Pd-AL-BSA  $38.81 \pm 2.51$  ve %50 Pd-AL-BSA  $46.05 \pm 3.09$  oranlarında *E. coli* canlılığında azalma görülmüştür. *E. coli*'nin 72 saat boyunca doku iskeleleri ile inkübasyonu sonucunda, AL-BSA TCPS'ye kıyasla  $44.17 \pm 1.87$  bakteri üremesini inhibe etmiştir. AL-BSA'ya kıyasla %5 Pd-AL-BSA  $7.95 \pm 1.83$ , %10 Pd-AL-BSA  $33.05 \pm 1.98$ , %20 Pd-AL-BSA  $42.34 \pm 2.19$  ve %50 Pd-AL-BSA  $54.45 \pm 2.85$  oranlarında *E. coli* canlılığında inhibisyon görülmüştür.

Doku iskelelerinin 24 saat boyunca *S. aureus* ile inkübasyon sonunda AL-BSA, TCPS'ye kıyasla bakteri canlılığında  $19.71 \pm 0.98$  azalmaya neden olmuştur. AL-BSA'ya kıyasla %5 Pd-AL-BSA  $1.82 \pm 1.35$ , %10 Pd-AL-BSA  $19.82 \pm 1.87$ , %20 Pd-AL-BSA  $29.99 \pm 0.87$  ve %50 Pd-AL-BSA  $36.01 \pm 2.64$  oranlarında *S. aureus* canlılığını inhibe etmiştir. *S. aureus* ile doku iskelelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonunda TCPS'ye kıyasla AL-BSA  $23.66 \pm 1.83$  canlılıkta azalmaya sebep olmuştur. AL-BSA'ya kıyasla %5 Pd-AL-BSA  $5.02 \pm 0.79$ , %10-Pd-AL-BSA  $24.26 \pm 1.92$ , %20 Pd-AL-BSA  $35.46 \pm 1.25$  ve %50 Pd-AL-BSA  $39.83 \pm 2.73$  oranlarında *S. aureus* canlılığında azalma görülmüştür. *S. aureus*'un 72 saat boyunca doku iskeleleri ile inkübasyonu sonucunda, AL-BSA, TCPS'ye kıyasla

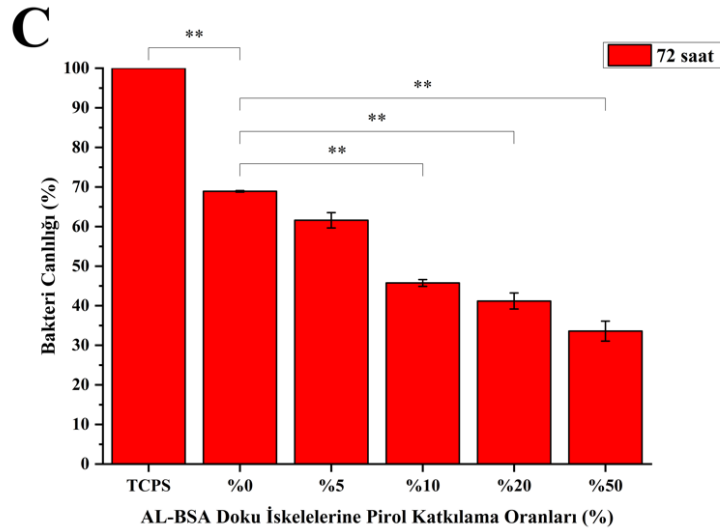
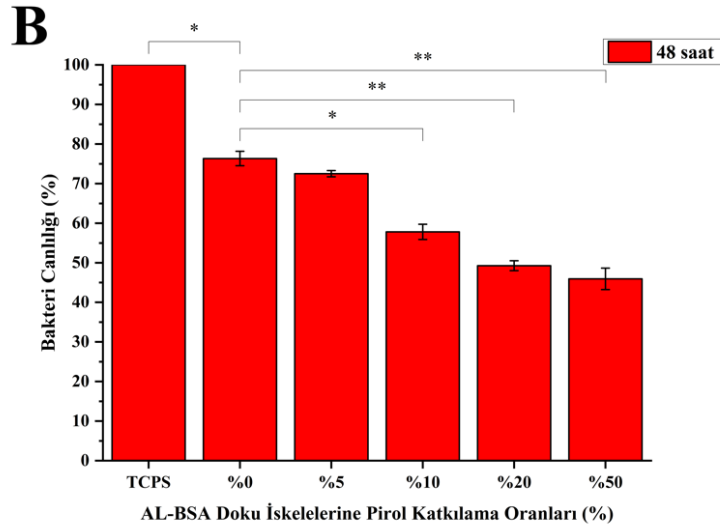
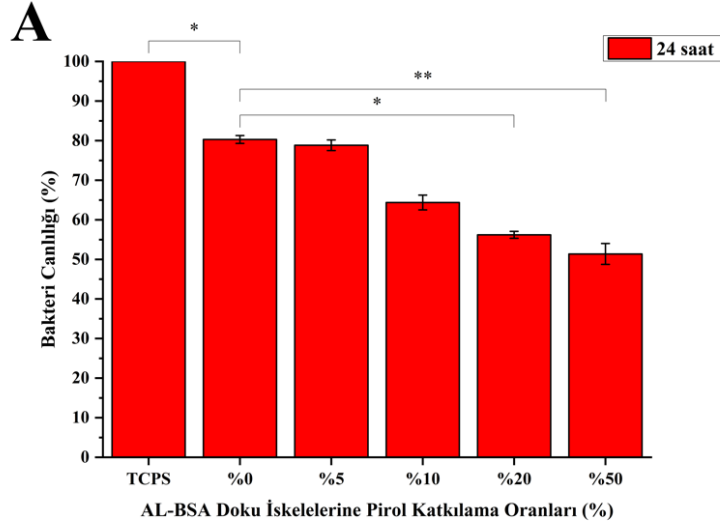
%31.08 ± 0.19 bakteri üremesinde inhibisyon görülmüştür. AL-BSA'ya kıyasla %5 Pd-AL-BSA %10.64 ± 1.94, %10 Pd-AL-BSA %33.65 ± 0.85, %20 Pd-AL-BSA %40.26 ± 2.03 ve %50 Pd-AL-BSA %51.28 ± 2.52 oranlarında *S. aureus* canlılığını inhibe etmiştir.

AL-BSA, TCPS'ye kıyasla 72 saatin sonunda, doku iskelesi yüzeyindeki *E. coli* canlılığında %44.17 ± 1.87 ve *S. aureus* canlılığında %31.08 ± 0.19 azalmaya neden olmuştur. Literatürde yapılan araştırmalar incelendiğinde, Hu vd. ve Tian vd. yapmış oldukları çalışmalar, amiloid benzeri yapıların nonspesifik tutunuma karşı güçlü direnç gösterdiğini belirtmiştir. *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin amiloid yapı üzerine tutunumu engellenerek biyofilm oluşumu önlenmiştir. Albümin protein yüzeyindeki pozitif ve negatif yüklerin dengesi, BSA'ya biyofilm önleyici özellik kazandırmaktadır [105–107].

AL-BSA'ya artan oranlarda pirol katkılanması *E. coli* ve *S. aureus* canlılığında azalışa sebep olmuştur. 72 saatin sonunda %50 Pd-AL-BSA, *E. coli* canlılığında %54.45 ± 2.85 ve *S. aureus* canlılığında %51.28 ± 2.52 inhibisyona neden olmuştur. Pirolün *E. coli* ve *S. aureus* üzerindeki fosfolipit sünger etkisinin (ing. Phospholipid Sponge Effect) bakteri canlılığında azalışa neden olduğu düşünülmektedir. Bakterilerin hücre zarlarındaki negatif yüke sahip fosfolipitler ile pozitif yüke sahip olan pirol birimleri arasındaki etkileşim, bakteri canlılığını azaltmıştır. İlk olarak elektrostatik temas yoluyla bakteriler Pd-AL-BSA doku iskelelerine bağlanmakta, ardından bakterilerin hücre duvarı zarının bozulmakta, kritik hücre içeriklerinin sızmakta ve ardından hücre ölümü gerçekleşmektedir [108–110].



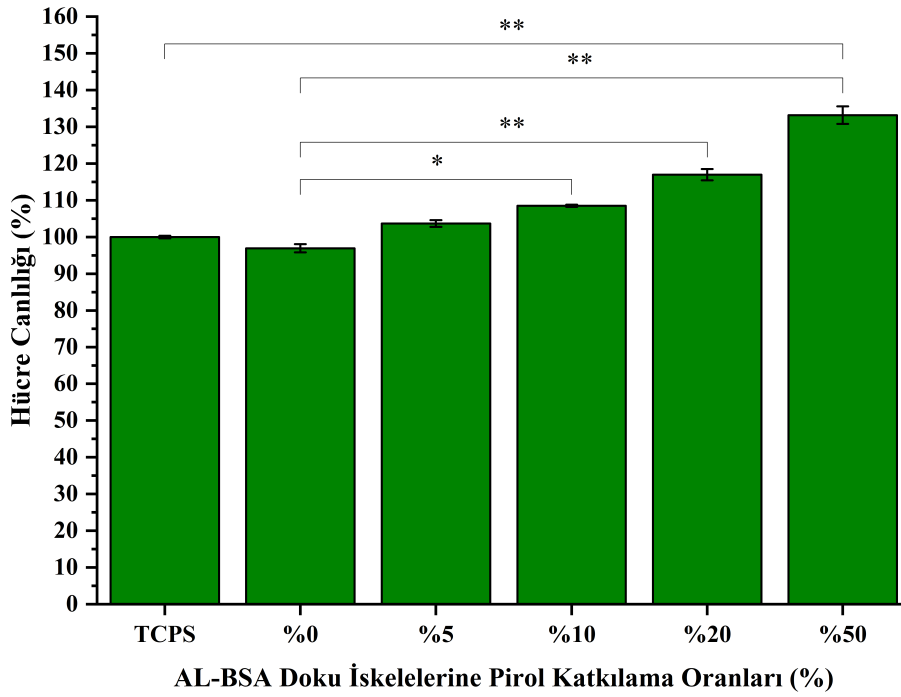
Şekil 4.13 : AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin 24, 48 ve 72 saat sonunda *E. coli*' ye karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).



Şekil 4.14 : AL-BSA ve pirok katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin 24, 48 ve 72 saat sonunda *S. aureus*' a karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

#### 4.1.7 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin BJ normal insan deri fibroblast hücre hattı ile etkileşiminin in-vitro olarak incelenmesi

AL-BSA ve farklı oranlarda pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin biyouyumluluklarının ve sağlıklı insan deri hücreleri üzerindeki canlılığın etkilenmesi için MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü plaka yüzeyi (TCPS) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. MTT testi sonucunda AL-BSA ve Pd-AL-BSA doku iskelelerinden elde edilen absorbans değerleri TCPS'ye göre yüzde olarak hesaplanmıştır. TCPS'deki hücre canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. MTT analizi sonucunda yüzde BJ hücre canlılık sonuçları Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



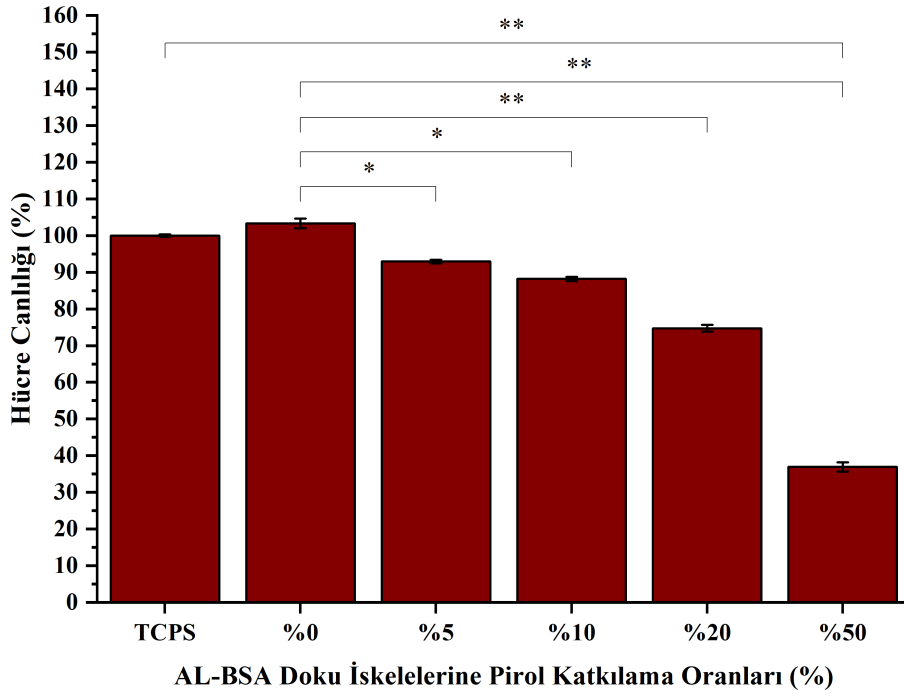
Şekil 4.15 : AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin BJ fibroblast hücre hattı üzerindeki hücre canlılığı grafiği (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

AL-BSA, TCPS'e kıyaslandığında  $96.93 \pm 1.1$  hücre canlılığı göstermiştir. TCPS ile AL-BSA doku iskelesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülemez. ISO 10993-5 standartlarına göre, canlılık yüzdesi  $> 70$  olduğu için BJ hücrelerine karşı herhangi bir sitotoksikite göstermemiştir. AL-BSA doku iskelesi ile kıyaslandığında, %5 Pd-AL-BSA  $103.96 \pm 0.92$ , %10 Pd-AL-BSA  $108.93 \pm 0.31$ , %20 Pd-AL-BSA  $117.66 \pm 1.53$  ve %50 Pd-AL-BSA  $133.38 \pm 2.39$  oranlarında BJ normal insan deri fibroblast hücre hattı canlılığında artışa neden olmuştur. %5, %10,

%20 ve %50 Pd-AL-BSA doku iskeleleri ile AL-BSA doku iskeleleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür. Pirol katkılanma oranı arttıkça BJ hücre canlılığında da artış gözlemlenmiştir. Bu artışın sebebi, DeVolder ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışma incelendiğinde; pirol birimlerinin hücrelerin biyomalzeme yüzeyine tutunumunu ve çoğalmasını arttırmasını ve hücrelerin daha büyük bir yüzey alanına sahip olarak karşıt yönlerde yayılmasını sağlaması olarak öngörülmektedir. Ayrıca pirol birimlerinin hücreler tarafından daha fazla vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ifade edilmesini ve özellikle yeterli serum proteinleri ile takviye edilmiş ortamlarda hücresel integrin ifadesini daha fazla aktive etmesini sağlaması bu artışın sebebi olarakta düşünülmektedir [37,102].

#### **4.1.8 Pirol katkılanmış amiloid benzeri sığır serum albümin nanofibröz doku iskelelerinin insan melanom hücre hattı ile etkileşiminin in-vitro olarak incelenmesi**

AL-BSA ve farklı oranlarda pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin A375 insan melanom hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin incelenmesi için MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak hücre kültürü plaka yüzeyi olarak kullanılmıştır. MTT analizi sonucunda AL-BSA ve Pd-AL-BSA doku iskelelerinden elde edilen absorbans değerleri TCPS'ye göre yüzde hesaplanmıştır. TCPS'deki hücre canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. MTT analizi sonucunda yüzde hücre canlılık sonuçları Şekil 4.16'da gösterilmiştir. AL-BSA, TCPS'e kıyaslandığında hücre canlılığında  $3.35 \pm 1.34$  artışa neden olmuş ve melanom hücrelerine karşı herhangi bir sitotoksosite göstermemiştir. İstatiksel olarak anlamlı olmayan bu artışın sebebi, 3 boyutlu kültür ortamı sunan doku iskelesinin 2 boyutlu kültür ortamı sunan TCPS'ye göre melanom hücrelerini fiziksel olarak desteklediği ve çoğalmalarını sağlaması olarak düşünülmektedir [103]. AL-BSA doku iskelesi ile kıyaslandığında, %5 Pd-AL-BSA  $10.07 \pm 0.46$ , %10 Pd-AL-BSA  $14.65 \pm 0.60$ , %20 Pd-AL-BSA  $27.66 \pm 0.91$  ve %50 Pd-AL-BSA  $64.27 \pm 1.30$  oranlarında A375 melanom hücre canlılığında azalmaya neden olmuştur. AL-BSA ile %5, %10, %20 ve %50 Pd-AL-BSA doku iskeleleri arasında istatistiksel olarak fark görülmüştür. AL-BSA doku iskelesine pirol katkılanma oranı arttıkça A375 hücre canlılığında azalma meydana gelmiştir. Bu azalışın sebebinin, Alhussein vd. ve Kuznietsova vd. yapmış oldukları araştırmalar incelendiğinde, pirol birimlerinin melanom hücreleri üzerinde kinaz inhibitörü olarak aktivite göstermesinin olduğu düşünülmektedir [104–107].



Şekil 4.16 : AL-BSA ve pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelelerinin A375 hücre hattı üzerindeki hücre canlılığı grafiği (\*p<0.05, \*\*p<0.01).



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında sığır serum albümin, amiloid benzeri forma dönüştürülerek elektro-eğrilebilir bir forma getirilmiştir. Amiloid benzeri sığır serum albümin (AL-BSA)'den elektro-eğirme yöntemi kullanılarak doğal polimerik yapıda nanofibröz doku iskelesi üretilmiştir. Böylece hücre dışı matriks ortamı biyotaklit edilerek doku iskelesinin hücre tutunumunu, canlılığını ve çoğalmasını arttırması sağlanmıştır. Ardından anti-kanser ve antimikrobiyal özellik gösteren pirol farklı oranlarda AL-BSA'ya katkılanarak pirol katkılanmış AL-BSA (Pd-AL-BSA) doku iskeleleri üretilmiştir. AL-BSA ve Pd-AL-BSA doku iskelelerinin sağlıklı insan deri hücre hattının ve insan melanom hücre hattının canlılıkları üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ayrıca bu doku iskelelerinin *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçların özeti aşağıdaki gibi sıralanmıştır.

- Elektro-eğrilmiş AL-BSA, %5 Pd-AL-BSA, %10 Pd-AL-BSA, %20 Pd-AL-BSA ve %50 Pd-AL-BSA doku iskelelerine ait morfolojik özellikler SEM ile analiz edilerek nanofiber çaplarının sırasıyla  $97.77 \pm 18.69$ ,  $147.97 \pm 13.36$ ,  $91.83 \pm 15.15$ ,  $114.77 \pm 21.57$  ve  $102.23 \pm 20.86$  nm boyutlarında oldukları saptanmıştır.
- AL-BSA ve Pd-AL-BSA doku iskelelerinin kimyasal yapıları FTIR ile analiz edilmiştir. AL-BSA doku iskelelerine pirol katkılanmasıyla  $3285 \text{ cm}^{-1}$ ' deki N-H gerilme,  $1539 \text{ cm}^{-1}$ ' deki C=C veya N-H bükülme,  $1240 \text{ cm}^{-1}$ ' deki C-N bağlarının pik absorbans değerlerinde gerçekleşen artışlar, pirolün AL-BSA doku iskeleleri içerisindeki varlığını göstermiştir.
- Çekme testi sonucunda AL-BSA, %5 Pd-AL-BSA, %10 Pd-AL-BSA, %20 Pd-AL-BSA ve %50 Pd-AL-BSA doku iskelelerine ait elastisite modülleri sırasıyla  $1021.7 \pm 1.2$ ,  $1080.5 \pm 0.9$ ,  $1139.0 \pm 1.1$ ,  $1205.7 \pm 2.3$  ve  $1215.1 \pm 1.6$  MPa olarak hesaplanmıştır. Doku iskelelerin elastisite modülleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.

- *E. coli* 'nin 72 saat boyunca doku iskeleleri ile inkübasyonu sonucunda, AL-BSA TCPS'ye kıyasla  $44.17 \pm 1.87$  bakteri üremesini inhibe etmiştir. AL-BSA'ya kıyasla %5 Pd-AL-BSA  $7.95 \pm 1.83$ , %10 Pd-AL-BSA  $33.05 \pm 1.98$ , %20 Pd-AL-BSA  $42.34 \pm 2.19$  ve %50 Pd-AL-BSA  $54.45 \pm 2.85$  oranlarında *E. coli* canlılığında inhibisyon görülmüştür.
- *S. aureus* ile doku iskelelerinin 72 saat boyunca inkübasyonu sonunda, TCPS'ye kıyasla AL-BSA bakteri canlılığında  $31.08 \pm 0.19$  azalmaya neden olmuştur. AL-BSA'ya kıyasla %5 Pd-AL-BSA  $10.64 \pm 1.94$ , %10 Pd-AL-BSA  $33.65 \pm 0.85$ , %20 Pd-AL-BSA  $40.26 \pm 2.03$  ve %50 Pd-AL-BSA  $51.28 \pm 2.52$  oranlarında *S. aureus* canlılığını inhibe etmiştir.
- AL-BSA ve Pd-AL-BSA doku iskelelerin BJ normal insan deri fibroblast hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisi incelenmiştir. TCPS'ye kıyasla AL-BSA doku iskelesi,  $96.93 \pm 1.10$  hücre canlılığı göstermiştir. AL-BSA doku iskelesi ile kıyaslandığında, %5 Pd-AL-BSA  $6.96 \pm 0.92$ , %10 Pd-AL-BSA  $11.93 \pm 0.31$ , %20 Pd-AL-BSA  $20.66 \pm 1.53$  ve %50 Pd-AL-BSA  $37.38 \pm 2.39$  oranlarında BJ hücre hattının canlılığını arttırmıştır.
- AL-BSA ve Pd-AL-BSA doku iskelelerin A375 insan melanom hücre hattı üzerinde anti-kanser etkisi araştırılmıştır. AL-BSA, TCPS'ye kıyaslandığında hücre canlılığında  $3.35 \pm 1.34$  artışa neden olmuştur. AL-BSA doku iskelesi ile kıyaslandığında, melanom hücre canlılığında %5 Pd-AL-BSA  $10.07 \pm 0.46$ , %10 Pd-AL-BSA  $14.65 \pm 0.60$ , %20 Pd-AL-BSA  $27.66 \pm 0.91$  ve %50 Pd-AL-BSA  $64.27 \pm 1.30$  oranlarında azalmaya neden olmuştur.

Bu sonuçlar doğrultusunda ortalama  $105.22 \pm 24.07$  nm fiber çapına sahip nanofibröz doku iskeleleri üretilmiştir. AL-BSA doku iskelesi BJ ve A375 hücre hatlarına karşı herhangi bir sitotoksosite göstermemiştir. AL-BSA'ya kütlece %5, %10, %20 ve %50 oranlarında pirol katkılanmasıyla BJ normal insan deri fibroblast hücresi canlılığı artan pirol oranı ile artmıştır. A375 insan melanom hücre hattı canlılığı ise artan pirol oranı ile azalmıştır. Kütlece %50 pirol katkılanmış AL-BSA doku iskelesi, AL-BSA'ya kıyasla BJ hücre canlılığını  $37.38 \pm 2.39$ 'a kadar arttırırken, A375 insan melanom hücre hattı canlılığını  $64.27 \pm 1.30$ 'a kadar inhibe etmiştir. Böylelikle %50 Pd-AL-BSA en çok anti-tümör aktivitesi göstererek kanser

hücrelerini öldürürken aynı zamanda sağlıklı hücrelerin canlılığını en çok arttıran doku iskelesi olmuştur. Ayrıca 72 saatin sonunda %50 Pd-AL-BSA *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı sırasıyla  $54.45 \pm 2.85$  ve  $51.28 \pm 2.52$  oranlarında antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Gelecek çalışmalarda;

Tez kapsamında üretilmiş olan AL-BSA ve farklı oranlarda pirol katkılanmış doku iskelelerinin in-vitro olarak sağlıklı ve kanser hücreleri üzerindeki etkisi, antimikrobiyal özelliği incelenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu doğrultuda devam çalışması niteliğinde, doku iskelelerinin BJ ve A375 hücreleri üzerindeki etkileri moleküler seviyede incelenecektir. Ardından, melanom fare modeli üzerinde in-vivo anti-kanser ve doku yenilenmesi özellikleri incelenecektir. Bununla birlikte AL-BSA ve Pd-AL-BSA doku iskelelerin in-vivo antimikrobiyal aktiviteleri analiz edilecektir.



## KAYNAKLAR

- [1] **Kelidari H. R., Alipanah H., Roozitalab G., Ebrahimi M., Osanloo M.,** (2021). Anticancer Effect of Solid-Lipid Nanoparticles Containing *Mentha longifolia* and *Mentha pulegium* Essential Oils: In Vitro Study on Human Melanoma and Breast Cancer Cell Lines.
- [2] **Radecka B., Litwiniuk M.,** (2016). Breast cancer in young women. *Ginekologia polska*. 87(9), 659–63.
- [3] **Pavri S. N., Clune J., Ariyan S., Narayan D.,** (2016). Malignant melanoma: beyond the basics. *Plastic and reconstructive surgery*. 138(2), 330e–340e.
- [4] **Bray F., Laversanne M., Weiderpass E., Soerjomataram I.,** (2021). The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*. 127(16), 3029–3030.
- [5] **Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., et al.,** (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 71(3), 209–249.
- [6] **Ossio R., Roldan-Marin R., Martinez-Said H., Adams D. J., Robles-Espinoza C. D.,** (2017). Melanoma: a global perspective. *Nature Reviews Cancer*. 17(7):393–4.
- [7] **Rozzo C., Sanna D., Garribba E., Serra M., Cantara A., Palmieri G., et al.,** (2017). Antitumoral effect of vanadium compounds in malignant melanoma cell lines. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 174, 14–24.
- [8] **Chen S. C., Wu Y. C., Mi F. L., Lin Y. H., Yu L. C., Sung H. W.,** (2004). A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 96(2), 285–300.
- [9] **Jalil R., Nixon J. R.,** (1990). Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: Problems associated with preparative techniques and release properties. *Journal of Microencapsulation*. 7(3), 297–325.
- [10] **Ke C-J., Su T-Y., Chen H-L., Liu H-L., Chiang W-L., Chu P-C., et al.,** (2011). Smart multifunctional hollow microspheres for the quick release of drugs in intracellular lysosomal compartments. *Angewandte Chemie*. 2011;123(35):8236–9.
- [11] **Kim J-H., Emoto K., Iijima M., Nagasaki Y., Aoyagi T., Okano T., et al.,** (1999) Core-stabilized polymeric micelle as potential drug carrier: increased solubilization of taxol. *Polymers for Advanced Technologies*. 10(11), 647–54.
- [12] **Khadka D. B., Haynie D. T.,** (2012). Protein-and peptide-based electrospun nanofibers in medical biomaterials. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 8(8), 1242-1262.

- [13] **Dror Y., Ziv T., Makarov V., Wolf H., Admon A., Zussman E.,** (2008). Nanofibers made of globular proteins. *Biomacromolecules*. 9(10), 2749–2754.
- [14] **Raheja A., Agarwal A., Muthuvijayan V., Chandra T.S., Natarajan T.S.,** (2013). Studies on encapsulation of bovine serum albumin, lysozyme and insulin through coaxial electrospinning. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. 3(6), 669–672.
- [15] **Kowalczyk T., Nowicka A., Elbaum D., Kowalewski T.A.,** (2008). Electrospinning of bovine serum albumin. Optimization and the use for production of biosensors. *Biomacromolecules*. 9(7), 2087–2090.
- [16] **Ding Y., Wang Y., Li B., Lei Y.,** (2010). Electrospun hemoglobin microbelts based biosensor for sensitive detection of hydrogen peroxide and nitrite. *Biosensors and Bioelectronics*. 25(9), 2009–2015.
- [17] **Barnes C. P., Smith M. J., Bowlin G. L., Sell S. A., Tang T., Matthews J. A., et al.,** (2006). Feasibility of electrospinning the globular proteins hemoglobin and myoglobin. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. 1(2):155892500600100200.
- [18] **Wang X., Li Y., He X., Chen S., Zhang J. Z. H.,** (2014). Effect of strong electric field on the conformational integrity of insulin. *The Journal of Physical Chemistry A*. 118(39), 8942–8952.
- [19] **Agarwal S., Wendorff J. H., Greiner A.,** (2009). Progress in the field of electrospinning for tissue engineering applications. *Advanced Materials*. 21(32–33), 3343–3351.
- [20] **Zhong S., Zhang Y., Lim C. T.,** (2012). Fabrication of large pores in electrospun nanofibrous scaffolds for cellular infiltration: a review. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 18(2), 77–87.
- [21] **Pham Q. P., Sharma U., Mikos A. G.,** (2006). Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue engineering*. 12(5), 1197–1211.
- [22] **Zhang Y., Lim C. T., Ramakrishna S., Huang Z-M.,** (2005). Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *Journal of materials science: materials in medicine*. 16(10), 933–946.
- [23] **Nseir N., Regev O., Kaully T., Blumenthal J., Levenberg S., Zussman E.,** (2013). Biodegradable scaffold fabricated of electrospun albumin fibers: Mechanical and biological characterization. *Tissue Engineering - Part C: Methods*. 19(4), 257–264.
- [24] **Patwa R., Soundararajan N., Mulchandani N., Bhasney S. M., Shah M., Kumar S., et al.,** (2018). Silk nano-discs: A natural material for cancer therapy. *Biopolymers*. 109(11).
- [25] **Chen Y., Liu S., Hou Z., Ma P., Yang D., Li C., et al.,** (2015). Multifunctional electrospinning composite fibers for orthotopic cancer treatment in vivo. *Nano Research*. 8(6), 1917–1931.
- [26] **Liu W., Wei J., Huo P., Lu Y., Chen Y., Wei Y.,** (2013). Controlled release of brefeldin A from electrospun PEG-PLLA nanofibers and their in vitro antitumor activity against HepG2 cells. *Materials Science and Engineering C*. 33(5), 2513–2518.
- [27] **Walsh C. T., Garneau-Tsodikova S., Howard-Jones A. R.,** (2006). Biological formation of pyrroles: Nature’s logic and enzymatic machinery. *Natural Product Reports*. 23(4), 517–531.

- [28] **Hanuske A., Chen V., Paoletti P., Niyikiza C.,** (2001). Pemetrexed Disodium: A Novel Antifolate Clinically Active Against Multiple Solid Tumors. *The Oncologist*. 6(4), 363–373.
- [29] **Bennasroune A., Gardin A., Aunis D., Crémel G., Hubert P.,** (2004). Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 50, 23–38.
- [30] **Moriarty K. J., Koblisch H. K., Garrabrant T., Maisuria J., Khalil E., Ali F., et al.,** (2006). The synthesis and SAR of 2-amino-pyrrolo[2,3-d]pyrimidines: A new class of Aurora-A kinase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 16(22), 5778–5783.
- [31] **Pegklidou K., Koukoulitsa C., Nicolaou I., Demopoulos V. J.,** (2010). Design and synthesis of novel series of pyrrole based chemotypes and their evaluation as selective aldose reductase inhibitors. A case of bioisosterism between a carboxylic acid moiety and that of a tetrazole. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 18(6), 2107–2114.
- [32] **Pegklidou K., Papastavrou N., Gkizis P., Komiotis D., Balzarini J., Nicolaou I.,** (2015). N-substituted Pyrrole-based Scaffolds as Potential Anticancer and Antiviral Lead Structures. *Medicinal Chemistry*. 11(6), 602–608.
- [33] **Gomtsyan A.,** (2012). Heterocycles in drugs and drug discovery. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 48(1), 7–10.
- [34] **Gholap S. S.,** (2016). Pyrrole: An emerging scaffold for construction of valuable therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 110, 13–31.
- [35] **Rosowsky A., Chen H., Fu H., Queener S. F.,** (2003). Synthesis of New 2,4-Diaminopyrido[2,3-d]pyrimidine and 2,4-Diaminopyrrolo[2,3-d]pyrimidine Inhibitors of Pneumocystis carinii, Toxoplasma gondii, and Mycobacterium avium Dihydrofolate Reductase.
- [36] **Morgan D. O., Fisher R. P., Espinoza F. H., Farrell A., Nourse J., Chamberlin H., et al.,** (1998). Control of eukaryotic cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinases. *The cancer journal from Scientific American*. Suppl 1:S77–83.
- [37] **Abdel-Latif E., Mustafa H. M., Etman H. A., Fadda A. A.,** (2007). Synthesis of new purine, pteridine, and other pyrimidine derivatives. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 43(3), 443–448.
- [38] **DeVolder R. J., Zill A. T., Jeong J. H., Kong H.,** (2012). Microfabrication of proangiogenic cell-Laden alginate-g-Pyrrole hydrogels. *Biomaterials*. 33(31) 7718–7726.
- [39] **World Health Organization,** (2020). WHO methods and data sources for country-level causes of death 2000-2019.
- [40] **Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., et al.,** (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 71(3), 209–249.
- [41] **American Cancer Society,** (2019). What Is Melanoma Skin Cancer?
- [42] **American Cancer Society,** (2021). Treating Melanoma Skin Cancer.
- [43] **Bergmann C. P., Stumpf A.,** (2013). Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering Dental Ceramics Microstructure, Properties and Degradation. *Biomaterials*. 9–13.

- [44] **Rahmati M., Mills D. K., Urbanska A. M., Saeb M. R., Venugopal J. R., Ramakrishna S., et al.,** (2021). Electrospinning for tissue engineering applications. *Progress in Materials Science*. 117.
- [45] **Wei G., Ma P. X.,** (2008). Nanostructured biomaterials for regeneration. *Advanced Functional Materials*. 18(22), 3568–3582.
- [46] **Korhonen H., Pihlanto A.,** (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. 16, 945–60.
- [47] **Li M., Mondrinos M. J., Gandhi M. R., Ko F. K., Weiss A. S., Lelkes P. I.,** (2005). Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*. 26(30), 5999–6008.
- [48] **Reddy N., Reddy R., Jiang Q.,** (2015). Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 33, 362–369.
- [49] **Buxbaum E.,** (2015). *Fundamentals of Protein Structure and Function*. 2nd ed. Cham: Springer International Publishing, 521.
- [50] **Ercan Alev M.,** (2010). Proteinlerin Fonksiyonel Yapısı ve Biyofiziksel Özellikleri. In: Dursun Ş, editor. *Biyofizik Ders Kitabı*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi. 333–346.
- [51] **Nelson D. L., Cox M. M., Hoskins A. A.,** (2021). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 8th ed., W. H. Freeman and Company.
- [52] **Kabay G., Kaleli Can G., Mutlu M.,** (2017). Amyloid-like protein nanofibrous membranes as a sensing layer infrastructure for the design of mass-sensitive biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 97, 285–291.
- [53] **Kabay G., Meydan A. E., Kaleli Can G., Demirci C., Mutlu M.,** (2017). Controlled release of a hydrophilic drug from electrospun amyloid-like protein blend nanofibers. *Materials Science and Engineering C*. 81, 271–279.
- [54] **Kabay G., Demirci C., Kaleli Can G., Meydan A. E., Daşan B. G., Mutlu M.,** (2018). A comparative study of single-needle and coaxial electrospun amyloid-like protein nanofibers to investigate hydrophilic drug release behavior. *International Journal of Biological Macromolecules*. 114, 989–997.
- [55] **Kabay G., Kaleli G., Sultanova Z., Ölmez T. T., Şeker U. Ö. Ş., Mutlu M.,** (2016). Biocatalytic protein membranes fabricated by electrospinning. *Reactive and Functional Polymers*. 103, 26–32.
- [56] **Majorek K. A., Porebski P. J., Dayal A., Zimmerman M. D., Jablonska K., Stewart A. J., et al.,** (2012). Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*. 52(3–4), 174–182.
- [57] **Hamerly T., Heinemann J., Tokmina-Lukaszewska M., Luszczyk E. R., Mulier K. E., Beilman G. J., et al.,** (2014). Bovine serum albumin as a molecular sensor for the discrimination of complex metabolite samples. *Analytica Chimica Acta*. 818, 61–66.
- [58] **Kang Y. N., Kim H., Shin W-S., Woo G., Moon T. W.,** (2003). Effect of Disulfide Bond Reduction on Bovine Serum Albumin-Stabilized Emulsion Gel Formed by Microbial Transglutaminase. 68.
- [59] **Merlini G., Bellotti V.,** (2003). Molecular Mechanisms of Amyloidosis. *New England Journal of Medicine*. 349(6), 583–596.



- [60] **Chiti F., Dobson C. M.**, (2006). Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry*. 75(1), 333–366.
- [61] **Kanova N.**, (2020). Synthesis of new pyrrole derivatives from npropargylic  $\beta$ -enaminones.
- [62] **National Center for Biotechnology Information**, (2021). PubChem Compound Summary for CID 8027, Pyrrole.
- [63] **Choi H. S., Wang Z., Richmond W., He X., Yang K., Jiang T., et al.**, (2006). Design and synthesis of 7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as focal adhesion kinase inhibitors. Part 2. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 16(10), 2689–2692.
- [64] **Reneker D. H., Chun I.**, (1996). Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*. 7(3), 216–223.
- [65] **Reneker D. H., Yarin A. L., Fong H., Koombhongse S.**, (2000). Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *Journal of Applied Physics*. 87(9), 4531–4547.
- [66] **Spivak A. F., Dzenis Y. A., Reneker D. H.**, (2020). A model of steady state jet in the electrospinning process. *Mechanics Research Communications*. 27(1), 37–42.
- [67] **Srinivasan G., Reneker D. H.**, (1995). Structure and morphology of small diameter electrospun aramid fibers. *Polymer International*. 36(2), 195–201.
- [68] **Greiner A., Wendorff J. H.**, (2007). Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angewandte Chemie International Edition*. 46(30), 5670–5703.
- [69] **Huang Z-M., Zhang Y-Z., Kotaki M., Ramakrishna S.**, (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*. 63(15), 2223–2253.
- [70] **Leung V., Ko F.**, (2011). Biomedical applications of nanofibers. *Polymers for Advanced Technologies*. 22(3), 350–365.
- [71] **He J-H., Wan Y-Q., Xu L.**, (2007). Nano-effects, quantum-like properties in electrospun nanofibers. *Chaos, Solitons & Fractals*. 33(1), 26–37.
- [72] **Pattison M. A., Wurster S., Webster T. J., Haberstroh K. M.**, (2005). Three-dimensional, nano-structured PLGA scaffolds for bladder tissue replacement applications. *Biomaterials*. 26(15), 2491–2500.
- [73] **Stevens M. M., George J. H.**, (2005). Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. *Science*. 310(5751), 1135–1138.
- [74] **Meydan A. E., Özgüzar H. F., Göçmen J. S., Mutlu M.**, (2020). Controlled drug release performance of plasma modified slab and mat matrices: A model study with “Ampicillin.” *International Journal of Pharmaceutics*. 587, 119586.
- [75] **Li D., Wang Y., Xia Y.**, (2004). Electrospinning Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays and Layer-by-Layer Stacked Films. *Advanced Materials*. 16(4), 361–366.
- [76] **Haider A., Haider S., Kang I. K.**, (2018). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*. 11, 1165–1188.

- [77] **Laudenslager M. J., Sigmund W.,** (2012). Electrospinning. In: Encyclopedia of nanotechnology. Springer Publishers; 769–775.
- [78] **Sill T. J., von Recum H. A.,** (2008). Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 29(13), 1989–2006.
- [79] **Li D., Xia Y.,** (2003). Fabrication of Titania Nanofibers by Electrospinning. *Nano Letters*. 3(4), 555–560.
- [80] **Patil J. V., Mali SS, Kamble A. S., Hong C. K., Kim J. H., Patil P. S.,** (2017). Electrospinning: A versatile technique for making of 1D growth of nanostructured nanofibers and its applications: An experimental approach. *Applied Surface Science*. 423, 641–674.
- [81] **Baumgarten P. K.,** (1971). Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *Journal of Colloid and Interface Science*. 36(1), 71–79.
- [82] **Matabola K. P., Moutloali R. M.,** (2013). The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly(vinylidene fluoride) nanofibers- effect of sodium chloride. *Journal of Materials Science*. 48(16), 5475–5482.
- [83] **Wang T., Kumar S.,** (2006). Electrospinning of polyacrylonitrile nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*. 102(2), 1023–1029.
- [84] **Zong X., Kim K., Fang D., Ran S., Hsiao B. S., Chu B.,** (2002). Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*. 43(16), 4403–4412.
- [85] **Zhao S., Wu X., Wang L., Huang Y.,** (2004). Electrospinning of ethylcyanoethyl cellulose/tetrahydrofuran solutions. *Journal of Applied Polymer Science*. 91(1), 242–246.
- [86] **Haider S., Al-Zeghayer Y., Ahmed Ali F. A., Haider A., Mahmood A., Al-Masry W. A., et al.,** (2013). Highly aligned narrow diameter chitosan electrospun nanofibers. *Journal of Polymer Research*. 20(4), 105.
- [87] **Fong H., Chun I., Reneker D. H.,** (1999). Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer*. 40(16), 4585–4592.
- [88] **Ray S. S., Chen S-S., Li C-W., Nguyen N. C., Nguyen H. T.,** (2016). A comprehensive review: electrospinning technique for fabrication and surface modification of membranes for water treatment application. 6(88), 85495–85514.
- [89] **Son W. K., Youk J. H., Lee T. S., Park W. H.,** (2004). The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*. 45(9), 2959–2966.
- [90] **Bhardwaj N., Kundu S. C.,** (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. 28(3), 325–347.
- [91] **Tan S-H., Inai R., Kotaki M., Ramakrishna S.,** (2005). Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer*. 46(16), 6128–6134.
- [92] **Theron S. A., Zussman E., Yarin A. L.,** (2004). Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions. *Polymer*. 45(6), 2017–2030.
- [93] **Nanoscience Instruments,** (2021). Scanning Electron Microscopy.
- [94] **Davis J. R., editor,** (2004). Tensile Testing. 2nd ed. ASM International. 283.
- [95] **Gerlier D., Thomasset N.,** (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods*. 94(1–2), 57–63.

- [96] **American Type Culture Collection**, (2021). BJ, CRL-2522.
- [97] **American Type Culture Collection**, (2021). A-375, CRL-1619.
- [98] **Chi H. Y., Chan V., Li C., Hsieh J. H., Lin P. H., Tsai Y-H., et al.**, (2020). Fabrication of polylactic acid/paclitaxel nano fibers by electrospinning for cancer therapeutics. *BMC Chemistry*. 14(1), 63.
- [99] **Hasanzadeh M., Moghadam B. H., Abatari M. H. M., Haghi A. K.**, (2013). On the production optimization of polyacrylonitrile electrospun nanofiber.
- [100] **Huang F., Wei Q., Cai Y., Wu N.**, (2008). Surface Structures and Contact Angles of Electrospun Poly(vinylidene fluoride) Nanofiber Membranes. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. 13(4), 292–301.
- [101] **Hekmati A. H., Khenoussi N., Nouali H., Patarin J., Drean J-Y.**, (2014). Effect of nanofiber diameter on water absorption properties and pore size of polyamide-6 electrospun nanoweb. *Textile Research Journal*. 84(19), 2045–2055.
- [102] **Ibrahim I., Yunus S., Hashim A.**, (2013). Relative Performance of Isopropylamine, Pyrrole and Pyridine as Corrosion Inhibitors for Carbon Steels in Saline Water at Mildly Elevated Temperatures. *International Journal of Scientific and Engineering Research*.
- [103] **Maharjan B., Kaliannagounder V. K., Jang S. R., Awasthi G. P., Bhattarai D. P., Choukrani G., et al.**, (2020). In-situ polymerized polypyrrole nanoparticles immobilized poly( $\epsilon$ -caprolactone) electrospun conductive scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 114, 111056.
- [104] **Morel A., Domaschke S., Urundolil Kumaran V., Alexeev D., Sadeghpour A., Ramakrishna S. N., et al.**, (2018). Correlating diameter, mechanical and structural properties of poly(l-lactide) fibres from needleless electrospinning. *Acta Biomaterialia*. 81, 169–183.
- [105] **Hu X., Tian J., Li C., Su H., Qin R., Wang Y., et al.**, (2020). Amyloid-Like Protein Aggregates: A New Class of Bioinspired Materials Merging an Interfacial Anchor with Antifouling. *Advanced Materials*. 32(23), 2000128.
- [106] **Tian J., Liu Y., Miao S., Yang Q., Hu X., Han Q., et al.**, (2020). Amyloid-like protein aggregates combining antifouling with antibacterial activity. *Biomaterials Science*. 8(24), 6903–6911.
- [107] **Chen S., Cao Z., Jiang S.**, (2009). Ultra-low fouling peptide surfaces derived from natural amino acids. *Biomaterials*. 30(29), 5892–5896.
- [108] **Soleimani M., Ghorbani M., Salahi S.**, (2016). Antibacterial Activity of Polypyrrole-Chitosan Nanocomposite: Mechanism of Action. *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 12(3), 191–197.
- [109] **Ginting M., Pasaribu S. P., Masmur I., Kaban J., Hestina.**, (2020). Self-healing composite hydrogel with antibacterial and reversible restorability conductive properties. *RSC Advances*. 10(9), 5050–5057.
- [110] **Salahuddin N., Elbarbary A. A., Alkabes H. A.**, (2017). Antibacterial and anticancer activity of loaded quinazolinone polypyrrole/chitosan

- silver chloride nanocomposite. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 66(6), 307–316.
- [111] **Rabionet M., Yeste M., Puig T., Ciurana J.**, (2017). Electrospinning PCL Scaffolds Manufacture for Three-Dimensional Breast Cancer Cell Culture. *Polymers*. 9(12), 328.
- [112] **Ibrahim A. A., El-Shehry M. F., M. Hosni H., E. Amr AE-G, M. Abdalla M.**, (2015). Antimelanomal Activities of some Newly Synthesized Pyrrolotriazolopyrimidines and Pyrrolotetrazolopyrimidines and their Derivatives. *International Journal of Pharmacology*. 11(7), 806–813.
- [113] **Kuznietsova H., Dziubenko N., Byelinska I., Hurmach V., Bychko A., Lynchak O., et al.**, (2020). Pyrrole derivatives as potential anti-cancer therapeutics: synthesis, mechanisms of action, safety. *Journal of Drug Targeting*. 28(5), 547–563.
- [114] **Bhardwaj V., Gumber D., Abbot V., Dhiman S., Sharma P.**, (2015). Pyrrole: a resourceful small molecule in key medicinal hetero-aromatics. *RSC Advances*. 5(20), 15233–15266.
- [115] **Li Petri G., Spanò V., Spatola R., Holl R., Raimondi M.V., Barraja P., et al.**, (2020). Bioactive pyrrole-based compounds with target selectivity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 208, 112783.



