

Araştırma Makalesi / Research Article

KULLANILAN FARKLI ÇÖZÜCÜLERİN İPEK FİBROİN-PVA KOMPOZİT SÜNGERLERİN YAPISINA OLAN ETKİSİ

Onur ARAS^{1,2}

<https://orcid.org/0000-0002-5495-5238>

Murat KAZANCI^{*2}

<https://orcid.org/0000-0002-5622-6960>

¹ Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Kimya Bölümü, Kocaeli, Türkiye.

² İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fak., Biyomedikal Müh. Böl., İstanbul, Türkiye

Gönderilme Tarihi / Received: 19.11.2018

Kabul Tarihi / Accepted: 06.08.2019

ÖZET: İpek fibroini farklı formlarda elde edebilmek için (film, fiber, sünger vs.), fibroinin uygun çözücüler içinde çözünmesi gerekmektedir. Bu işlem için farklı çözücüler kullanılmaktadır. Literatürde yer alan çalışmalardan çok azı, kullanılan çözücü sistemin, son ürünün yapısı üzerindeki etkilerini incelemiştir. Yapılan bu çalışma ile bu eksikliğin giderilmesi hedeflenmektedir. Bu nedenle, kullanılan farklı çözücülerin, elde edilen fibroin / Polivinilalkol (PVA) kompozit süngerlerin yapısı üzerine etkisinin araştırılması, bu çalışmanın temelini teşkil etmektedir. Elde edilen kompozit süngerlerin yara örtüsü olarak kullanılması hedeflendiğinden, yapılan bu çalışma, planlanan çalışmanın ilk aşaması olup, daha çok ön hazırlık aşamalarını kapsamaktadır. Bu çalışmada, fibroin/PVA kompozit yapılı süngerler, liyofilizasyon (dondurarak kurutma) yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Bu yöntem ile yüksek ve düzgün gözenekli ipek fibroin temelli süngerler üretilmiştir. Yapılan bu ön çalışmada, ilk olarak ipek fibroinin çözünmesinde kullanılan farklı çözücülerin, elde edilen malzemenin genel yapısını ve PVA ile oluşturduğu kompozit yapıya olan etkileri araştırılmıştır. Daha sonra, üretilen kompozit sünger yapılar; Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR), Termogravimetrik Analiz Cihazı (TGA) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) metodları kullanılarak karakterize edilmiştir. Kalsiyum Klorür (CaCl_2)-Etanol- H_2O den elde edilen kompozit sünger yapılar incelendiğinde ikincil yapının β sheet ağırlıklı olduğu görülmüştür. FTIR sonuçları, PVA ile karıştırıldıktan sonra Amid I ve Amid II bantlarının yerlerinde ve değerlerinde değişiklikler olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, fibroin molekülleri ile PVA molekülleri arasındaki etkileşimin oldukça kuvvetli olduğunu göstermiştir. Lityum Bromür (LiBr) içerisinde çözünen ipek fibroin de ise, düzensiz (random coil) yapının ağırlıkta olduğu, kompozit oluşumu sırasında β tabakalarına (sheet) dönüşmediği görülmüştür ve bu da kristal yapının amorf yapıya oranını ve termal kararlılığını etkilemektedir. Malzemelerin ısı özellikleri TGA ve DSC kullanılarak analiz edilmiştir. Özet olarak, CaCl_2 -Etanol- H_2O 'dan oluşan sistem içinde çözülerek elde edilen fibroin çözeltisi, LiBr içinde çözülerek elde edilen fibroin çözeltisi ile karşılaştırıldığında, ikincil yapı konformasyonlarının ve morfolojilerinin farklılık gösterdiği ve ilk çözeltiden (CaCl_2 -Etanol- H_2O) elde edilen fibroin yapıların PVA ile daha sağlam daha kararlı kompleks yapılar oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: İpek Fibroin, Kompozit, Sünger, PVA, İpek Çözücü Sistemleri

THE EFFECT OF DIFFERENT SOLVENTS ON THE STRUCTURE OF SILK FIBROIN-PVA COMPOSITE FOAMS

ABSTRACT: To be able to obtain silk fibroin in different forms (film, fiber, sponge etc.), fibroin should be dissolved in suitable solvents. Different solvents are used for this process. Very few of the studies in the literature were investigated on the effects of the solvent system on the structure of the final product. This work aimed to fulfil this deficiency. For this reason, the main purpose of this work is to investigate the effect of different solvents on the obtained structure of fibroin / Polyvinyl Alcohol (PVA) composite sponges. Since this study's final goal is to use the obtained composite sponges as a wound dressing, this presented work is the first part of the planned study that mainly consists of preliminary preparation steps. Fibroin / PVA composite sponges were obtained by using lyophilisation (freeze drying) method in this work. Silk fibroin based sponges with high porosity were produced by employing this technique. In this preliminary study, first the effects of different solvents that are used in the dissolution of silk fibroin on the general structure of the obtained material and the composite structures that are formed by mixing with PVA were investigated. Then, produced composite sponge structures were characterized by using Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Thermogravimetric Analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) methods. When the

composite sponge structures, obtained in Calcium Chloride (CaCl_2)-Ethanol- H_2O , were examined, it was observed that the secondary structure was dominated mainly by β sheet. The FTIR results showed that the Amide I and Amide II bands had changes in their location and values after mixing with PVA. These results demonstrated that the interaction between fibroin molecules and PVA molecules is quite strong. The silk fibroin, dissolved in Lithium Bromide (LiBr), mainly consisted the random coil structures and the structure had not transformed into a β sheet conformation during the formation of the composites, which affected the ratio of the crystal structure to the amorphous structure and thermal stability of the composite sponges. The thermal properties of the material were analyzed using TGA and DSC. In summary, when the fibroin solution, obtained by dissolving fibroin in the solvent system of CaCl_2 -Ethanol- H_2O , with the fibroin solutions, obtained by dissolving fibroin in the solvent system of LiBr are compared, it is found that their secondary structural conformation and morphologies were different and the fibroin structures that were obtained from CaCl_2 -Ethanol- H_2O solvent system formed more stable and strong complexes with PVA.

Keywords: Silk Fibroin; Composite, Sponge, PVA, Silk Decoding Systems

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: muratkazanci.tr@gmail.com

DOI: 10.7216/1300759920192611502, www.tekstilmuhendis.org.tr

1. GİRİŞ

İpek; ipek böceği ve örümcekler tarafından özel epitel hücreleri içinde sentezlenen lif yapılı bir proteindir. Yaygın olarak *Bombyx mori* (B. mori) ipek böceği, *Nephila calavipes* ve *Araneus diadematus* gibi bazı örümcek türlerinden elde edilir. Eldesi en kolay ve en iyi karakterize edilmiş ipek, evcil bir ipek böceği olan B. mori tarafından üretilmektedir. B. mori tarafından sentezlenmiş olan ipek iki tip proteinden oluşmaktadır, serisin ve fibroin. Fibroin ipeğin temelini teşkil eden proteindir ve saf ipeğin %70'ini oluşturmaktadır. İpek fibroin ağır zincirinin yaklaşık %90'ı alanin, glisin ve serin amino asitlerinden oluşur [1-3]. Bu proteinler hidrofilik polimer ailesinden olan serisin ile (20 kDa) kaplanmıştır [4]. Protein molekülleri arası hidrojen bağları ikincil yapı olarak bilinen konformasyonları oluşturur. İkincil yapıyı oluşturan hidrofilik, amorf bölgeler ve büyük hidrofobik bloklar amfifilik özelliklere sahiptir. Alanin açısından zengin bu bölgeler, biyopolimere mekanik dayanıklılık sağlar [5]. Fibroinin ikincil yapısında bulunan β -tabakaları dayanıklılık ve rijitlik özelliğine sahiptir [6 -8]. İpek fibroini, üstün malzeme özelliklerinin yanında kolaylıkla işlenebilirliği ile birçok alanda kullanılabilen bir malzemedir [9, 10].

İpek böceğinden elde edilen ipek hammaddesi, 4000 yılı aşkın bir süredir, geleneksel tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır. Özellikle verdiği yumuşaklık hissi ve mekanik özellikleri insanların çok eski çağlardan beri ilgisini çekmesine sebep olmuştur [9, 11]. İpek fibroin hammaddesinin biyomalzeme olarak kullanımı, ilk kez ameliyat ipliği olarak kullanılması ile yüzyıllar öncesinden başlamaktadır [1, 12]. Mükemmel performansı sayesinde, ipek fibroinden elde edilen malzemelerin çok farklı uygulamalarda biyomalzeme olarak kullanıldığını görmekteyiz. Bunların başında ilaç taşıma sistemleri [13], yapay damarlar [14], yara örtüleri [15], ve kemik doku iskeleleri

[16] sayılabilir. İpek fibroin bir biyomalzemedendir istenen pek çok özelliği içermektedir; bunların başında biyoyumlu olmasını, biyobozunur olmasını, yüksek derecede dayanıklı olmasını, tok olmasını ve kolaylıkla işlenebilir olmasını saymak mümkündür [17]. Bir biyomalzemenin mikro ve nanoyapısı sadece hücrenin yüzeydeki şeklini ve yapı içerisine migrasyonunu değil, aynı zamanda kök hücrenin farklılaşmasını da etkilemektedir [18-21]. Silk fibroin biyomalzeme olarak 1993 yılında FDA (US Food and Drug Administration) tarafından tanınmıştır [22].

İpek fibroin malzemeleri film, jel, gözenekli iskele ve elektrostatik özellikli ipek lifleri haline dönüştürülebilir. Bunun için öncelikle uygun çözücüler bulmak gerekmektedir. Literatüre bakıldığında ise ipek fibroin işlenmesinde farklı çözücü sistemlerin kullanıldığı görülmektedir [1, 9, 23, 24]. Yapılan birçok çalışmada özellikle kozadan serisinin uzaklaştırılması ile elde edilen ipek fibroini çözmek için kullanılan çözücülerin önemi vurgulanmıştır. Her ne kadar İpek-PVA karışımı kullanılarak üretilen malzemeler hakkında pek çok yayın olsa da, bunların hiçbirisi fibroinin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan çözücülerin, elde edilen malzemelerin yapısına etkisi konusunda detaylı bir bilgi vermemektedir. Bu çalışmada amaç ipek fibroinin rejenerasyonunda kullanılan çözücü sistemlerin, elde edilen ürünün yapısını ve PVA ile etkileşimine olan etkisini göstermektir. Buna uygun olarak iki farklı çözücü sistem kullanılmış, elde edilen fibroin ve fibroin-PVA yapıları farklı karakterizasyon metotları kullanılarak analizleri ve karşılaştırılmaları yapılmıştır.

2. MALZEME VE METOT

Deneyisel çalışmada kullanılan ipek kozaları Bursa Koza Birlik'ten, etanol, PVA (72000 g/mol) ve formik asit Merck

firmasından, diğer bütün kimyasallar ise (CaCl_2 , Na_2HCO_3 , LiBr) Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir.

2.1. Malzemelerin Hazırlanma Aşamaları

2.1.1. İpek Fibroin Çözeltilerinin Hazırlanması

İpek kozalaklarından fibroin protein elde edilme aşamaları aşağıda belirtilmiştir [25, 26].

1. Kozalar dört eşit parçaya ayrıldı ve ölü güveler temizlendi.
2. Serisini uzaklaştırmak için, temizlenen kozalar, Na_2CO_3 çözeltisinde (1L, 0,05 M) 100 °C de 1 saat manyetik karıştırıcı kullanılarak ısıtıldı. Fibroin karışımından süzülerek ayrıldı.
3. Fibroinin tamamen saflaştırılması için, fibroin 1 L saf suda 20 dakika 70 °C'de karıştırılarak ısıtıldı ve süzüldü. Bu işlem 5 kez tekrarlandı. Elde edilen fibroin oda sıcaklığında kurutuldu.
4. Fibroin aşağıda verilen iki farklı çözücü sistemden biri ile muamele edilerek çözündü.

A- 10 g fibroin Lityum bromür çözeltisinde (30 ml, 9,3 M) 1 saat 60 °C de karıştırıldı. Elde edilen çözelti buzdolabında (+4 °C) depolandı.

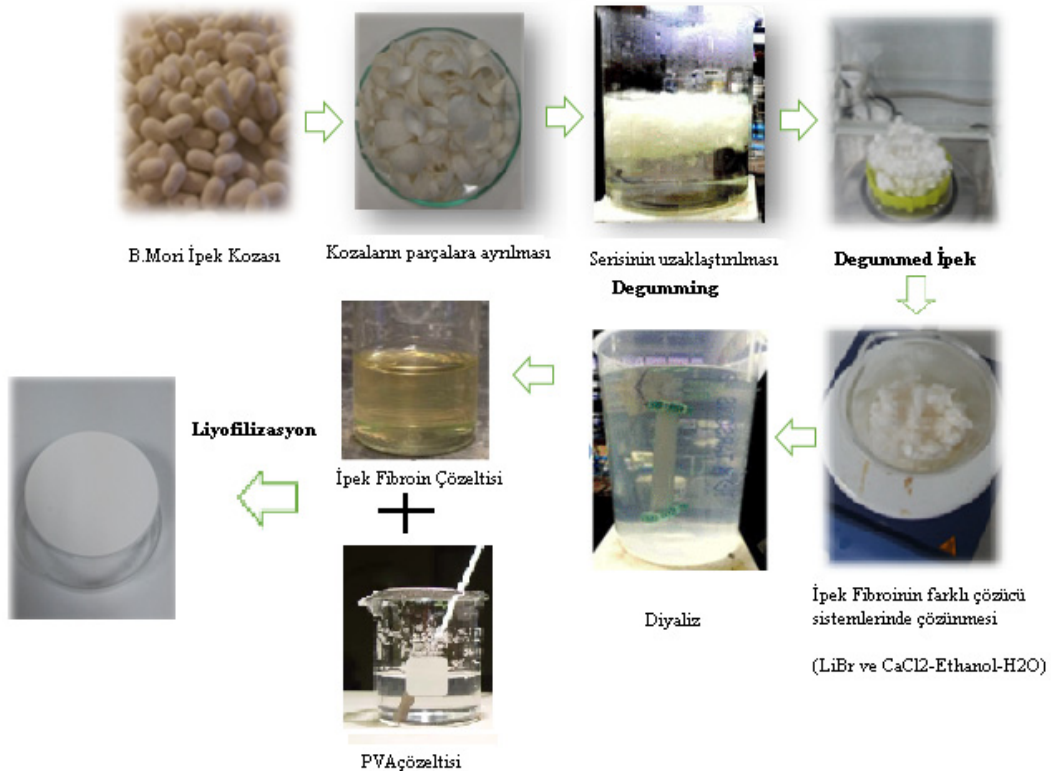
B- 14,7 g CaCl_2 , 11,6 ml Etanol, 10,8 ml ultra saf su çözeltisi hazırlandı. Çözelti içerisinde 1,2 g ipek fibroin fiberler 2 saat 150 rpm'de 70 °C de karıştırıldı. Elde edilen çözelti filtre edilerek saflaştırıldı.

5. Çözeltideki tuzlar selüloz diyaliz membranı (Sigma-MWCO 14000) kullanılarak 1000 ml'lik bir beherde 2-3 gün boyunca diyaliz işlemi uygulandı. Tuzun tamamen uzaklaşmasını

sağlamak için saf su 1 saat aralıklarla değiştirildi. Fibroin çözeltisi elde edildi.

2.1.2. İpek Fibroin-PVA Çözeltisinden Kompozit Süngerlerin Hazırlanması

Tüm numuneler için toplam hacim 10 ml olarak belirlendi ve yedi farklı çözelti hazırlandı (Tablo1). Bunlar sırasıyla: a) %100 ipek çözeltisi (PVA ile karıştırılmadan sadece %6'lık fibroin çözeltisinden oluşmaktadır). b) %30 İpek / %70 PVA karışımı hazırlamak için 3 ml %6'lık fibroin çözeltisi ile 7 ml %6'lık PVA çözeltisi karıştırıldı. c) %40 İpek / %60 PVA karışımı hazırlamak için 4 ml %6'lık fibroin çözeltisi ile 6 ml %6'lık PVA çözeltisi karıştırıldı. d) %50 İpek / %50 PVA karışımı hazırlamak için 5 ml %6'lık fibroin çözeltisi ile 5 ml %6'lık PVA çözeltisi karıştırıldı. e) %60 İpek / %40 PVA karışımı hazırlamak için 6 ml %6'lık fibroin çözeltisi ile 4 ml %6'lık PVA çözeltisi karıştırıldı. f) %70 İpek / %30 PVA karışımı hazırlamak için 7 ml %6'lık fibroin çözeltisi ile 3 ml %6'lık PVA çözeltisi karıştırıldı. g) %100 PVA çözeltisi (ipek ile karıştırılmadan sadece %6'lık PVA çözeltisinden oluşmaktadır). Hazırlanan tüm çözeltiler, 2 saat karıştırıldıktan sonra petri kaplara aktarıldı. Oda sıcaklığında 24 saat bekletildikten sonra, ilk olarak +4 °C'de 12 saat daha sonra -20 °C'de 12 saat tutuldu. Dondurulmuş halde olan İpek/PVA çözeltileri 18 saat boyunca liyofilize edilerek kompozit sünger oluşumu sağlandı. Tüm aşamalar ayrıntılı biçimde Şekil 1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Fibroin/PVA kompozit süngerlerin hazırlanması.

Tablo 1. İpek/PVA kompozit sünger kompozit derişim oranları ve deneysel parametreler

Sünger Kompozit	PVA (ml) (%6)	İPEK Fibroin Çözeltisi (LiBr) ml	Bekleme süresi (Saat)	Liyofilizasyon süresi (Saat)
a	0	10	12	18
b	3	7	12	18
c	4	6	12	18
d	5	5	12	18
e	6	4	12	18
f	7	3	12	18
g	10	0	12	18

2.2. Yapısal Karakterizasyon Metotları

2.2.1. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

İpek/PVA kompozit süngerlerin morfolojisi SEM ile incelenmiştir. (Philips XL 30 SFEG). Numuneler altın kaplanarak iletken olmayan protein yapıların analizinin yapılması sağlanmıştır.

2.2.2. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Analizi

İpek/PVA kompozit süngerlerin yapısal analizleri için Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektroskopisi (Perkin Elmer Spectrum 100) kullanılmıştır.

2.2.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Elde edilen yapıların, DSC analizleri (DSC-60 Shimadzu) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tarama hızı 10 °C/dak ve sıcaklık aralığı 25 °C - 200 °C olarak seçilmiştir. Veri analizi, Ta60 yazılımı (sürüm 2.21) kullanılarak yapılmıştır.

2.2.4. Termogravimetrik Analizi (TGA)

Kompozit süngerlerde, sıcaklığın veya zamanın bir fonksiyonu olarak meydana gelen kütle kaybı ve/veya kazanımlarının belirlenmesi için kullanılmıştır. Oda sıcaklığı ile 950 °C sıcaklık aralığında ve 1µg çözünürlükte deneyler yapılmıştır.

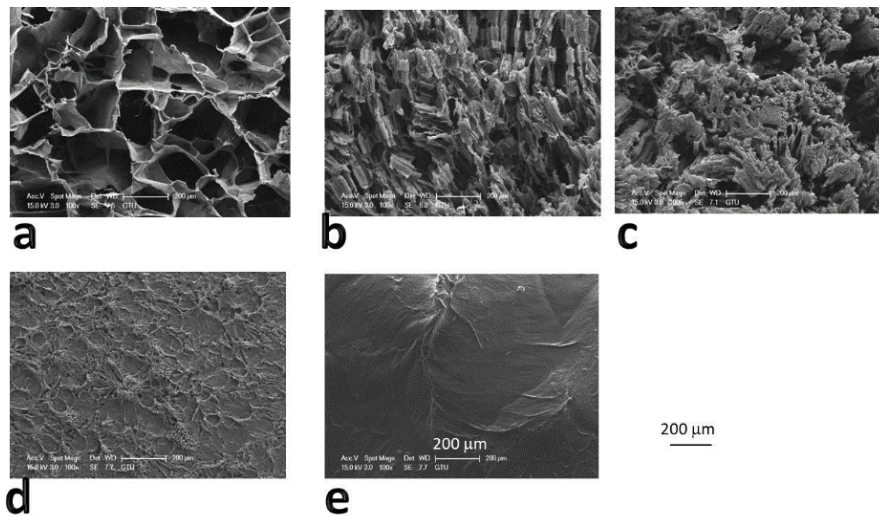
3. BULGULAR

Yapılan bu ön çalışmada ilk olarak elde edilen kompozit süngerlerin yapısal ve termal özellikleri incelenmiştir.

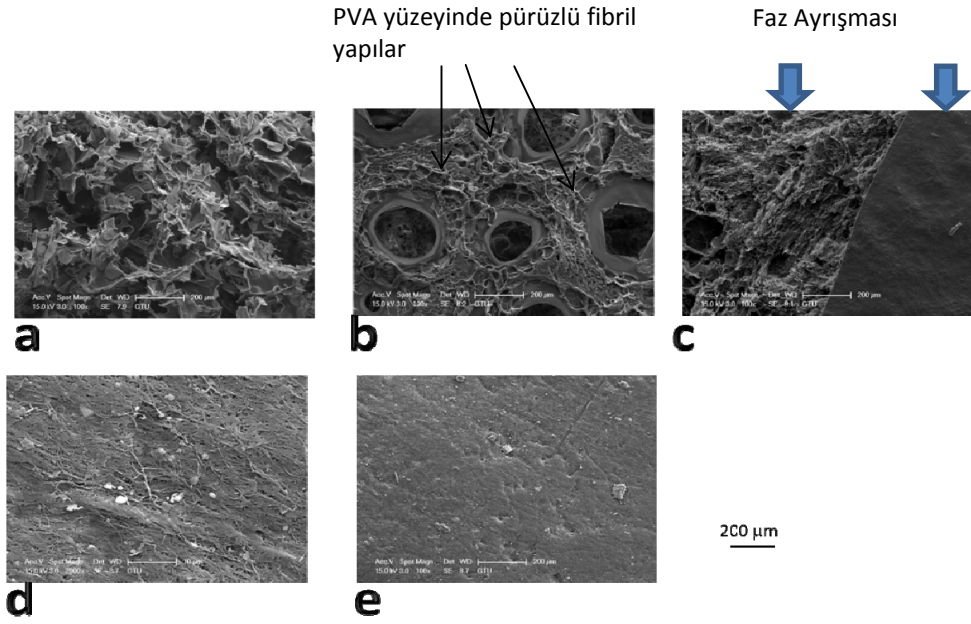
3.1. Kompozit Süngerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

İki farklı çözücü kullanılarak elde edilen ipek fibroin çözeltilerinin PVA ile karıştırılması ile oluşturulan gözenekli ipek süngerler, basit ve çevre dostu bir yöntem olan dondurarak kurutma tekniği kullanılarak son hallerini almışlardır.

CaCl₂/Etanol/H₂O çözücü sistemden elde edilen ipek fibroin kompozit süngerlerin morfolojileri SEM ile incelenmiştir. SEM sonuçları, İpek ve PVA'nın farklı karışım oranlarına sahip tüm örneklerinin (100% PVA sünger hariç) üç boyutlu gözenekli yapıya sahip olduğunu göstermektedir. SEM görüntülerine (Şekil 2) göre, fibroin/PVA oranı değiştiğinde, oluşan gözeneklerin miktarı ve çapının da değiştiği gözlemlenmiştir. PVA oranının artması ile birlikte gözenek çapı küçülmekte ancak daha çok sayıda gözenek ortaya çıkmaktadır. Bunun sebebi olarak; PVA moleküllerinin viskozitesinin yüksek olup, buz parçacıklarının büyümesine direnç göstermesi olarak açıklanmıştır [27]. Bu özelliği en iyi CaCl₂/Etanol/dH₂O'den elde edilen ipek fibroin çözeltileriyle hazırlanan süngerlerin sağladığı gözlemlenmiştir.



Şekil 2. CaCl₂ çözücü sisteminden elde edilen ipeğin PVA ile artan oranlarda karıştırılması ile oluşturulan sünger yapıları a)%100 fibroin : %0 PVA, b)%70 fibroin : %30 PVA, c) %40 fibroin : %60 PVA, d)%30 fibroin : %70 PVA ve e)%0 fibroin : %100 PVA.

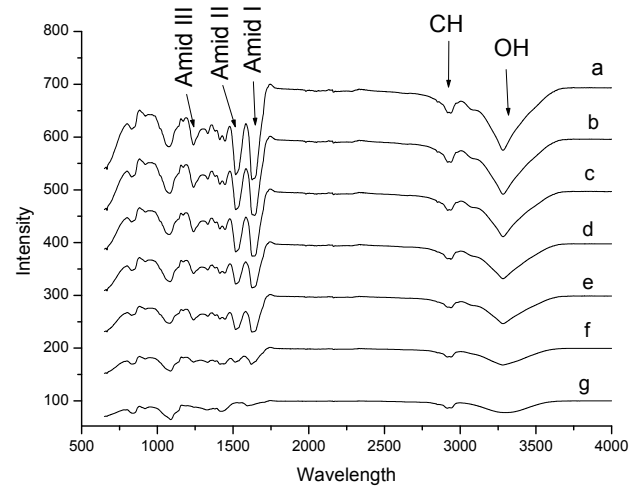


Şekil 3. LiBr çözücü sisteminden elde edilen ipeğin PVA ile artan oranlarda karıştırılması ile oluşturulan sünger yapıları a) %100 fibroin : %0 PVA, b) %70 fibroin : %30 PVA, c) %40 fibroin : %60 PVA, d) %30 fibroin : %70 PVA ve e) %0 fibroin : %100 PVA.

LiBr içinde ipek fibroinin çözülmesi ile üretilen kompozit süngerlerin morfolojik yapıları SEM ile incelenmiştir (Şekil 3). SEM sonuçları, fibroin ve PVA'nın farklı oranlarına sahip tüm örneklerin (100% PVA sünger hariç) CaCl_2 /Etanol çözücü sisteminden elde edilen kompozit süngerler gibi üç boyutlu gözenekli yapılara sahip olduğunu göstermektedir. Gözenek boyut ve şekli fibroin/PVA karışım oranlarına bağlı olarak değişmektedir. Fibril oluşumları da yüzeydeki gözeneklerin içinde görülmektedir. LiBr içinde çözünerek elde edilen kompozit süngerler ile CaCl_2 /Etanol içinde çözünerek elde edilen kompozit yapıların SEM resimleri karşılaştırıldığında, zaman zaman faz ayrışmalarının ortaya çıktığı (Şekil 3- C), CaCl_2 sisteminde çözülerek elde edilen fibroinlerde olduğu gibi fibroin ve PVA arasında tam bir bütünleşmenin gerçekleşmediği gözlemlenmiştir. Mesela Şekil 3.c'de PVA ve fibroin yüzeyleri ayrı ayrı seçilebilmekte veya Şekil 3.b'de olduğu gibi PVA yüzeylerin fibroin ile kaplandığı gözlemlenebilmektedir. Bunun başlıca sebebi; LiBr içinde çözünerek elde edilen ipek fibroinler yapısal değişim meydana getirememektedir. Yani β -tabakaları oluşturulmadığından düzensiz yapılardan daha düzenli yapılara doğru dönüşüm meydana gelmemektedir. Öte yandan, daha önceki çalışmalarda da bildirildiği gibi [28] diyaliz işleminden sonra da CaCl_2 kullanılarak elde edilen ipek fibroin çözeltiğinde bir miktar serbest halde Ca^{+2} iyonu bulunmaktadır. Bu iyonlar, etanol ile birlikte, hem fibroin de meydana gelen yapısal değişiklikleri tetiklemekte, hem de PVA ile daha sağlam ve kararlı bağlar oluşturmaya, kompleks yapılar ortaya çıkartmasına yardımcı olmaktadır. Buna karşın, yapısal transformasyon gerçekleştiremeyen ve düzensiz yapılar olarak kalan LiBr'den elde edilen ipek fibroin ise; PVA ile kararlı kompleksler oluşturmak yerine yer yer faz ayrışmalarına ve farklı formlarda yeni oluşumlara yol açmaktadır.

3.2. Kompozit Süngerin Yapısal Özelliği

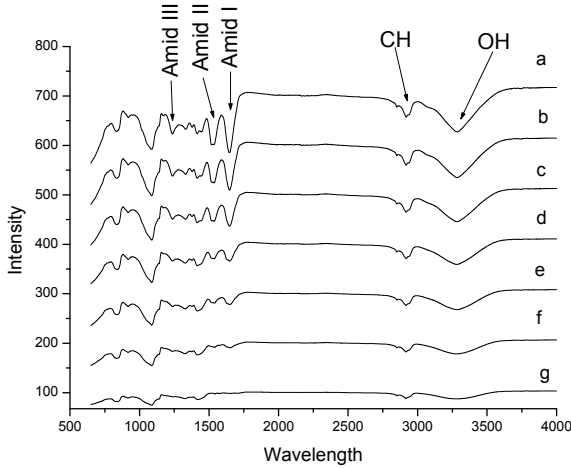
Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan fibroin/PVA sünger kompozitlerin yapıları FTIR aracılığıyla incelenmiştir.



Şekil 4. CaCl_2 den elde edilen kompozit süngerlerin FTIR spektralleri: a) %100 fibroin, b) %70 fibroin / %30 PVA, c) %60 fibroin / %40 PVA, d) %50 fibroin / %50 PVA, e) %40 fibroin / %60 PVA, f) %30 fibroin / %70 PVA ve g) %100 PVA

CaCl_2 'den elde edilen kompozit süngerlerin FTIR spektrumları, Şekil 4'de görülmektedir. Karışım oranlarına bakılmaksızın spektrumların benzer piklere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Yaklaşık 3280 cm^{-1} 'deki bantlar fibroin ve PVA'da ortak hidroksil gruplarını ifade etmektedir. PVA kaynaklı bantlar,

sırasıyla 2944 cm^{-1} doymuş C-H grupları ($-\text{CH}_3$), 2939 cm^{-1} ve $\sim 2915\text{ cm}^{-1}$ 'deki bantlar ise C-H çekme-gerilme modu ile ilişkilendirilmektedir [29]. 1644 cm^{-1} 'deki bant ($-\text{CH}_2$) gruplarını, 1168 cm^{-1} ve $\sim 1173\text{ cm}^{-1}$ 'deki bantlar ise C-O grupları hakkında bilgi vermektedir. PVA'ya atanan bu bantlar PVA konsantrasyon oranı arttıkça güçlenmektedir. FTIR spektrumlarında, Amid I (1622 cm^{-1} – 1650 cm^{-1}), Amid II bantları (1515 cm^{-1} – 1526 cm^{-1}) ve Amid III (1236 cm^{-1} – 1240 cm^{-1}) ipek fibroine ait bantları ifade etmektedir [29-32].



Şekil 5. LiBr' den elde edilen kompozit süngerlerin FTIR spektraları: a) %100 fibroin, b) %70 fibroin / %30 PVA, c) %60 fibroin / %40 PVA, d) %50 fibroin / %50 PVA, e) %40 fibroin / %60 PVA, f) %30 fibroin / %70 PVA ve g) %100 PVA

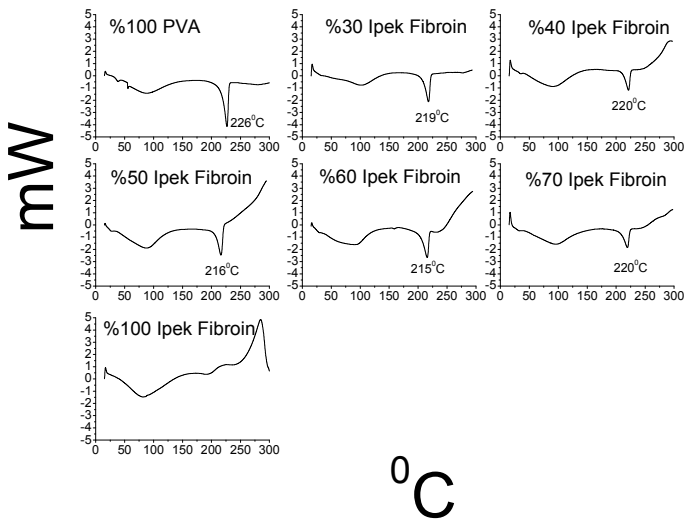
CaCl_2 – Etanol çözeltisinden elde edilen sünger yapıdaki ipek fibroinin, Amid I, Amid II ve Amid III bantlarına karşılık gelen 1623 cm^{-1} , 1516 cm^{-1} ve 1236 cm^{-1} bant değerleri incelendiğinde ikincil yapının β sheet ağırlıklı olduğu görülmektedir (Şekil 4). Muhtemelen çözücü içinde bulunan etanolün fibroinin ikincil yapısını β sheet konformasyonuna dönüştürmesinden kaynaklanmaktadır. PVA ile karıştırıldıktan sonra Amid bantlarının yerlerinde ve değerlerinde değişiklikler olduğu gözlemlenmiştir. Bu fibroin molekülleri ile PVA molekülleri arasındaki etkileşimin kuvvetli olduğunu göstermektedir. Şekil 4'de %70 fibroin / %30 PVA oranı için Amid I bölgesindeki 1646 cm^{-1} bant pozisyonu, ikincil yapıların ağırlıklı olarak; düzensiz yapı (random coil) ve α zincir yapı formunda olduğunu göstermektedir. 1644 cm^{-1} dalga boyundaki bant düzensiz yapıyı, 1622 cm^{-1} de bulunan bant ise β -tabakayı ifade etmektedir [24]. Aynı şekilde LiBr çözeltisi içinde elde edilen fibroin, CaCl_2 – Etanol çözücü sisteminden elde edilen fibroin ile karşılaştırıldığında ağırlıklı olarak düzensiz yapı (random coil) ve α zincir yapılardan oluştuğu söylenebilir (Şekil 5). Hidrofilik bloklar suda çözünürlüğü sağlarken, hidrofobik bloklar arası etkileşimler sonucu oluşan β -tabaka malzemeye dayanıklılık ve sertlik kazandırır. Buna karşın daha düzensiz olan hidrofilik bloklar tokluğu ve esnekliği artırır. Fibroin çözeltilerinde oluşan moleküller arası β -tabakaları, fiziksel çapraz bağ etkisi yaparak daha kararlı yapıları oluşturmaktadır [29,33, 34]. Karışım

oranlarına göre değişen bant pozisyonları ve bant yapıları PVA ile ipek fibroin moleküllerinin etkileşimini göstermektedir. Amid I bantları göz önüne alındığında, CaCl_2 – Etanol sisteminden elde edilen fibroinin PVA ile karıştırıldıktan sonra bant pozisyonunda daha büyük oranda bir yer değiştirme görülmekte, bu da fibroin-PVA'nın oluşturduğu kompozit yapının, diğerine göre daha etkin ve kararlı olduğunu kanıtlamaktadır [35, 36].

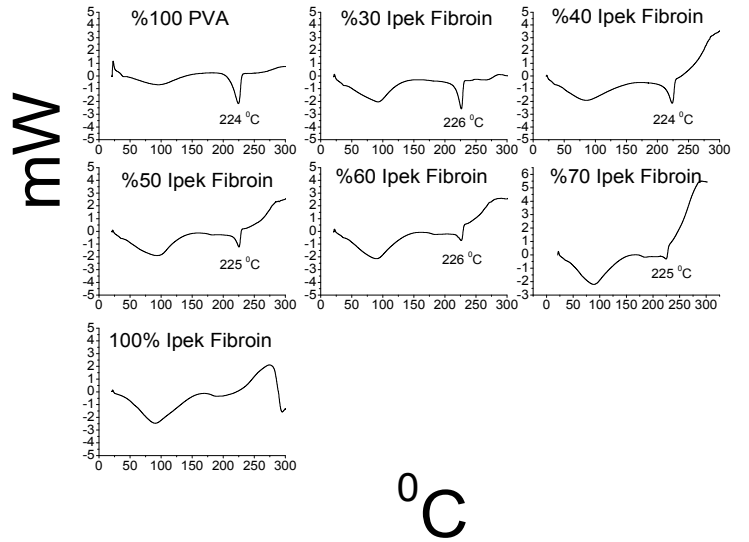
3.3. Fibroin/PVA Kompozit Süngerlerin Termal Davranışlarının İncelenmesi

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ve Termogravimetrik Analiz (TGA) cihazları kullanılarak üretilen kompozit süngerlerin termal davranışları incelenmiştir. İlk olarak 90°C – 100°C 'de gözlemlenen endotermik pik suyun ortamdan uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır (Şekil 6). 225°C deki kuvvetli endotermik pik ise PVA'nın bozunma sıcaklığı ile ilişkilidir. Karışımda CaCl_2 çözeltisinden elde edilen fibroin oranı arttıkça, bu endotermik pikin sıcaklık değeri 226 – 215 arasında değiştiği gözlemlenmiştir (%70'lik karışımda gözlemlenen durum (220°C endotermik pik) genel eğilim dışında kalan bir istisnadır. Ancak halen %100 PVA termal bozunma grafiği ile karşılaştırıldığında, yine de bir düşüş göstermektedir)). Genel olarak bozunma sıcaklığı 220°C civarında değişmektedir. Bu, amorf yapıların kararlı bir β yapısına dönüştüğünün ve PVA ile kuvvetli etkileşimler oluşturduğunun bir göstergesidir. Ancak LiBr içinde çözünerek elde edilen fibroin karışımlarından oluşan kompozit süngerlerde benzer bir davranış gözlemlenmemiş olup, LiBr' den elde edilen bütün fibroin karışımlarda PVA kaynaklı pik 225°C civarında değişmektedir (Şekil 7) [33, 34, 36]. Bu durum, CaCl_2 'den elde edilen fibroin ile PVA arasında etkileşimin LiBr'den elde edilen fibroine göre daha kuvvetli olduğunu gösteren bir başka kanıttır. Şekil 8'de karışım oranlarına bağlı olarak, DSC pik değerlerindeki değişim gösterilmiştir.

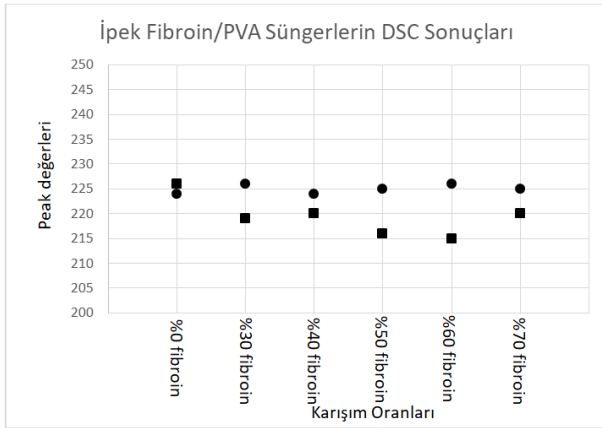
İpek fibroin liflerin LiBr 'de çözünmesinden elde edilen ipek fibroin/PVA kompozit süngerlerin camısı geçiş sıcaklığı 60°C iken, ipek fibroin liflerin CaCl_2 /Etanol 'de çözünmesinden elde edilen ipek fibroin/PVA süngerlerin camısı geçiş sıcaklığının 70°C 'ye yükseldiği gözlemlenmiştir. TGA malzeme bozunma sıcaklıklarının birinci türevleri karşılaştırıldığında, PVA ile LiBr' den elde edilen ipek fibroin çözeltileri karıştırılmaya başlandıktan sonra uzunca bir süre madde bozunma eğrisinde bir fark gözlemlenmemesine karşın, CaCl_2 /Etanol çözeltisinden elde edilen fibroin ve PVA çözeltileri karıştırılmaya başlanır başlanmaz madde bozunma sıcaklığının yüksek değerlere doğru kaydığı gözlemlenmiştir. Şekil 9'de her bir karışım noktasının bozunma sıcaklığı, o malzemenin TGA grafiklerinin, birinci türevlerinin eğrilerinde minimum değeri ifade etmektedir. Bu termal etki, CaCl_2 /Etanol çözeltisinde çözünerek elde edilen fibroinin, LiBr'den elde edilen fibroin çözeltisine göre PVA ile daha kuvvetli bağlar kurup, sağlam yapılar oluşturduğunu gösteren bir başka kanıttır. Kompozit süngerlerin termal davranışındaki farklılıklar, hem fibroinin amorf yapıdan kristalin yapıya geçişinde kullanılan çözücülerin, hem de karışım oranlarının etkisini göstermektedir [29, 34, 36, 37].



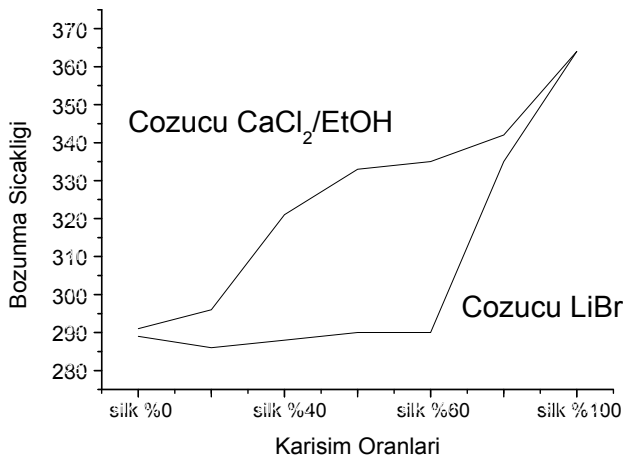
Şekil 6. CaCl₂/Etanol'den elde ipek fibroin/PVA kompozit süngerlerin DSC grafikleri



Şekil 7. LiBr' den elde ipek fibroin/PVA kompozit süngerlerin DSC grafikleri



Şekil 8. İpek fibroin / PVA süngerlerin DSC sonuçları (■) CaCl₂ ve (●) LiBr için farklı karışım oranlarında gösterilmiştir.



Şekil 9. Farklı çözücü sistemler içinde çözünmüş ipek fibroinlerin farklı oranlarda PVA ile karıştırılması ile elde edilmiş kompozit süngerlerin bozunma sıcaklık eğrileri.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan bu çalışma, ipek fibroinin çözelti haline getirmede çözücü seçiminin önemi göstermektedir. Burada kozadan serisinin uzaklaştırılması ile elde edilen ipek fibroinin çözünmesinde yaygın olarak kullanılan iki farklı çözücü denenmiştir (CaCl₂-Etanol-dH₂O ve LiBr). Daha sonra süngerde yapısal kararlılık, sağlamlık, esneklik sağlamak amacıyla belli oranlarda PVA eklenmiştir. Artan PVA oranı hidrofilik etkileşime bu ise termal kararlılığa sebep olmuştur. İlk olarak sünger kompozitlerin SEM resimleri incelenerek morfolojik yapısı incelenmiştir. SEM yapısında görüldüğü üzere, genelde LiBr'den elde edilen fibroin yapıların PVA üzerinde küçük iplikcikler oluşturarak yüzeyi kısmen kapladığı ve CaCl₂-Etanol çözeltisinden elde edilen fibroinin tersine homojen bir yapı oluşturmadıkları gözlemlenmiştir. Genel olarak, bütün karışımların SEM analizleri, hücre büyümesi ve yayılmasını sağlayabilecek gözenekli yapıya sahip olduğunu göstermiştir. Ancak bunun doğrulanabilmesi için hücre kültürü testlerinin yapılması gerekmektedir.

Cheng vd. (24) yapmış olduğu çalışma, LiBr-H₂O içinde çözünen fibroinin daha çok random coil ve α -heliks yapıya sahip iken, CaCl₂-Etanol içinde çözünen fibroinlerin ise β katmanlı tabakaya sahip olduğunu göstermiştir. Yapılan tüm yapısal karakterizasyonlar (FTIR, DSC ve TGA) CaCl₂'den elde edilen fibroinin, LiBr'den elde edilen fibroine göre, PVA ile daha kararlı, sağlam ve dayanıklı kompozit yapılar oluşturduğunu göstermiştir. Kullanılan farklı çözücüler, fibroinin hidroliz işlemlerini ve oluşan moleküllerin yapısını etkilemektedir. Mesela etanol, fibroin moleküllerinin konformasyonunu değiştirip, β -katmanlı yapılara dönüştürmekte, iyonların fibroin içine nüfuzunu kolaylaştırmakta ve bu da PVA ile daha sağlam ve kararlı kompleksler oluşturmasını etkileyebilmektedir. Yine CaCl₂-Etanol sistemi içinde çözünen fibroin, ağırlıklı olarak β -tabakalar ihtiva ettiğinden, termal olarak daha kararlı yapılar

oluşturmakta ve PVA ile de daha kararlı kompozit kompleks yapılar meydana getirmektedir. Özet olarak, üretilmek istenen malzemenin son kullanım yerlerine göre, farklı çözücü sistemler kullanılabilir. Bu hem üretilen malzemenin morfolojisini hem de farklı moleküller ile kompleks oluşturma kabiliyetini ve kalitesini etkilemektedir.

Ön çalışmalar tamamlanmış olmasına rağmen, halen *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalara ihtiyaç duyulmakta olup, üretilen malzeme yeni nesil yara örtülerinin geliştirilmesi için bir başlangıç teşkil etmektedir. Bu amaca yönelik olarak tek başına kullanılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Altman G. H., Diaz F., Jakuba C., Calabro T., Horan R. L., Chen. J., (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 24 (16), 401–16.
- Correlo V. M., Oliveira J. M., Mano J. F., Neves N. M., Reis R. L., (2011), "Natural Origin Materials for Bone Tissue Engineering – Properties, Processing, and Performance", 2th Edition, Elsevier Inc.
- Amini A. R., Laurencin C. T., Nukavarapu S. T., 2013. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 40(5),363–408.
- Mondal, M., Trivedy, K., Kumar S.N. (2007). The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 5(14) , 63-76.
- Zhou C. Z., Confalonieri F., Medina N., Zivanovic Y., Esnault C., Yang T., Jacquet M., Janin J., Duguët M., Perasso R., Li Z.G., (2000). Fine organization of bombyx mori fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res.*, 28(12) , 2413-2419.
- Jin H. J., Kaplan D. L., (2003).Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*, 424(1), 1057-1061.
- Kim U. J., Park J., Li C., Jin H. J., Valluzzi R., Kaplan D. L., (2004). Structure and properties of silk hydrogels. *Biomacromolecules*, 5(3), 786-792.
- Winkler S., Kaplan D. L., (2000). Molecular biology of spider silk. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74(2), 85-93.
- Vepari C., Kaplan D. L., (2007). Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science*. 32(8-9) , 991-1007.
- Vollrath F., Porter D., (2009).Silks as ancient models for modern polymers. *Polymer*,50(24), 5623-5632.
- Chen, F., Porter, D., Vollrath, F., (2012). Morphology and structure of silkworm cocoons. *Mater. Sci. Eng. C* 32, 772–778.
- Omenetto, F.G., Kaplan, D.L, (2010). New Opportunities for an Ancient Material. *Science*, 329, 528–531.
- Zhao, Z., Li, Y., Xie, M, (2015). Silk Fibroin-Based Nanoparticles for Drug Delivery. *Int. J. Mol. Sci*, 16, 4880–4903.
- Nakazawa, Y., Sato, M., Takahashi, R., Aytemiz, D., Takabayashi, C., Tamura, T., Enomoto, S., Sata, M., Asakura, T, (2011). Development of Small-Diameter Vascular Grafts Based on Silk Fibroin Fibers from Bombyx mori for Vascular Regeneration. *J. Biomater. Sci. Polym. E*, 22, 195–206.
- Roh, D., Kang, S., Kim, J., Kwon, Y., Young Kweon, H., Lee, K., Park, Y., Baek, R., Heo, C., Choe, J. et al. (2006). Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 17, 547–552.
- Mandal, B.B., Kaplan, D.L., (2012). High-strength silk protein scaffolds for bone repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 7699–7704.
- Kundu, B., Kurland, N.E., Bano, S., Patra, C., Engel, F.B., Yadavalli, V.K., (2014). Kundu, S.C. Silk proteins for biomedical applications: Bioengineering perspectives. *Prog. Polym. Sci.*, 39, 251–267.
- Kolind, K., Leong, K.W., Besenbacher, F., Foss, M, (2012). Guidance of stem cell fate on 2D patterned surfaces. *Biomaterials*, 33, 6626–6633.
- Nikkhah, M., Edalat, F., Manoucheri, S., Khademhosseini, A, (2012). Engineering microscale topographies to control the cell–substrate interface. *Biomaterials*, 33, 5230–5246.
- Metavarayuth, K., Sitasuwan, P., Zhao, X., Lin, Y., Wang, Q, (2016). Influence of Surface Topographical Cues on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2, 142–151.
- McMurray, R.J., Wann, A., Thompson, C.L., Connelly, J.T., Knight, M.M., (2013). Surface topography regulates wnt signaling through control of primary cilia structure in mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.*, 3, 3545.
- Melke, J., Midha, S., Ghosh, S., Ito, K., (2016). Hofmann, S. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. *Acta Biomater.*, 31, 1–16.
- Qi, Y., Wang, H., Wei, K., Yang, Y., Zheng, R-Y., Kim, I. S., Zhang, K.-Q., (2017). A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures. *Int. J. Molec. Sci.*, 18, 1-21.
- Cheng G., Wang X., Tao S., Xia J., Xu S. (2015). Differences in regenerated silk fibroin prepared with different solvent systems: From structures to conformational changes. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(22)
- Iridag Y., Kazanci M. (2006). Preparation and characterization of bombyx mori silk fibroin and wool keratin. *Journal of Applied Polymer Science* 100 (5), 4260-4264.
- Alemdar A., Iridag Y., Kazanci M. (2005). Flow behaviour of regenerated wool-keratin proteins in different mediums. *Int. J Bio. Macromol.*, 27, 253-260.
- Li, M., Minoura, N., Dai, L., Zhang, L. (2001). Preparation of porous poly(vinyl alcohol)-sil fibroin (PVA/SF) blend membranes. *Macromol. Mater. Eng.*, 286, 529-534.
- Li, G., Zhou, P., Shao, Z., Xie, X., Chen, X., Wang, H., Chunyu, L., Yu, T. (2001). The natural silk spinning process. A nucleation-dependent aggregation mechanism? *Eur. J. Biochem.*, 268, 6600-6606.
- Li X., Qin J., Ma J. (2015).Silk fibroin/poly (vinyl alcohol) blend scaffolds for controlled delivery of curcumin. *Regenerative Biomaterials Advance*, 2(2),97-105.
- Lu Q., Zhang B., Li M., Zuo B., Kaplan D., Huang Y., Zhu H. (2011). Degradation mechanism and control of silk fibroin. *Regenerative Biomaterials Advance*, 12(4), 1080-1086.
- Miyazawa T., Blout E. R (1961). The Infrared Spectra of Polypeptides in Various Conformations: Amide I and II Bands' *J. Am. Chem. Soc.*, 83(3), 712-719.
- Guziewicz N.,Best A.,Perez Ramirez B., L.Kaplan B. (2011). Lyophilized silk fibroin hydrogels for the sustained local delivery of therapeutic monoclonal antibodies. *Biomaterials*.32(10),2642-2650.

33. Li G., Kong Y., Zhao Y., Zhang L., Yang Y. (2015). Fabrication and characterization of polyacrylamide/silk fibroin hydrogels for peripheral nerve regeneration. *Journal of Biomaterials Science*.26(14),899-916.
34. Tsukada I., Freddi G., Crichton J. (1994).Structure and compatibility of poly (vinyl alcohol) silk fibroin (PVA/SF) blend films. *Journal Of Polymer Science*, 32(2),243-248.
35. Dong A., Huang P., Caughey WS. (1990).Protein secondary structures in water from second-derivative amide I Infrared spectra. *Biochemistry*, 29(13),3303-3308.
36. Lu Q., Hu X., Wang X., Kluge JA., Lu S., Cebe P. (2010). Water-insoluble silk films with silk I structure. *Acta Biomaterialia*, 6(4),1380-1387.
37. Bhattacharjee P., Kundu B., Naskar D., Maiti TK., Bhattacharya D., Kundu SC. (2015). Nanofibrous nonmulberry silk/PVA scaffold for osteoinduction and osseointegration. *Biopolymers*, 103(5),271-284.