

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

JELATİN- POLİ([2-(METAKRİLOİLOKSİ)ETİL]TRİMETİLAMONYUM
KLORÜR) KOMPOZİT NANOLİFLERİN ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU,
ANTİBAKTERİYEL VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

GÖKÇE MÜLAZIMOĞLU

MART 2017

ÖZET

JELATİN- POLİ([2-(METAKRİLOİLOKSİ)ETİL]TRİMETİLAMONYUM Klorür) KOMPOZİT NANOLİFLERİN ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU, ANTİBAKTERİYEL VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

MÜLAZIMOĞLU, Gökçe

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Murat İNAL

Mart 2017, 112 sayfa

Cilt yaralandığı zaman, cildi oluşturan proteinler bozulur ve cilde oksijen sağlanması azalır. Bu durum patojen mikroorganizmaların gelişimi ve çoğalması için mükemmel bir ortam sağlar. İyileşme sürecini kısaltmak ve derinin kısa süre içinde yapı ve işlevlerini yeniden kazanmasına katkı sağlamak için yeni yara örtü materyallerinin geliştirilmesi önemlidir. İdeal bir yara örtü materyali, gaz alışverişine izin vermeli, yara ara yüzünde nemli bir ortam sağlamalı, mikroorganizmalara karşı bir bariyer oluşturmalı ve aşırı akıntıları emmeli ve yara üzerinden travma oluşturmaktan kolayca kaldırılabilmelidir. Ayrıca, toksik olmayan, biyolojik olarak uyumlu ve antimikrobiyal bir malzemeden yapılmış olması gereklidir.

Jelatin, kollojenin kısmen parçalanmasıyla elde edilen biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak bozunabilir bir doğal polimerdir. Jelatin nanolifler yara örtü malzemesi olarak kullanıldığı zaman, gerekli olan bütün gereksinimleri karşılamaktadır. Fakat antimikrobiyal özellikte olmaması onun kullanım alanlarını kısıtlamaktadır. Bu çalışmanın amacı, jelatine antimikrobiyal özellik kazandırarak kullanım alanını genişletmektir. Bu amaçla bir dördüncül amonyum polimeri olan poli([2-(metakriloiloksi)etil]trimetilamonyum klorür) (PMETAK) polimeri kullanılmıştır. Bu polimer iyi antibakteriyel etki, düşük toksisite ve cilt tahrişinin düşük olması gibi vücutta kullanım için önemli özelliklere sahiptir.

Bu çalışmada, nanofiberler, formik asit-asetik asit karışımında çözündürülmüş ve farklı oranlarda karıştırılmış jelatin ve PMETAK kullanılarak elektro döndürme yöntemi ile sentezlenmiştir. Elde edilen nanolifler, taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR) ve termogravimetrik analiz (TGA) yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Elektro döndürme yöntemiyle elde edilen nanoliflerin çapına etki eden sistem parametreleri uygulanan gerilim, toplayıcı ile şırınga arasındaki mesafe, akış hızı, polimer yüzdesi değiştirilerek incelenmiştir. Nanoliflerin antibakteriyel etkisi, gram pozitif *Staphylococcus aureus* ve gram negatif *Escherichia coli* bakterilerine karşı sıvı kültür ortamın içerisinde incelenmiştir. Nanolifler, biyolojik olarak parçalanabilirliğini belirlemek amacıyla fosfat tamponu içinde parçalanma testine tabi tutulmuştur. Nanoliflerin sitotoksik etkisi L929 fibroblast hücrelerine karşı WST-1 ve ikili boyama testleri ile belirlenmiştir.

SEM çalışmalarından nanoliflerin homojen ve pürüzsüz oldukları görülmektedir. %20 PMETAK içeren nanoliflerin çaplarının elektro döndürme parametrelerine bağlı olarak 350– 485 nm aralığında değiştiği bulunmuştur. PMETAK yüzdesi % 20'den %80'e yükseldiğinde, nanofiberlerin çapları 2410 nm olarak bulunmuştur. Parçalanma test sonuçlarına göre, 14 gün sonunda bütün nanoliflerin kütlelerinin %90'ından fazlasını kaybettikleri bulunmuştur. In vitro WST-1 ve çift boyama testleri, özellikle % 20 ve % 40 PMETAK içeren nanofiberlerin biyolojik olarak uyumlu olduğunu göstermiştir. PMETAK içeren nanofiberlerin her ikisi de *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı iyi bir bakterisidal aktivite göstermiştir. Yürütülen çalışmalar sonucunda, elde edilen nanoliflerin antimikrobiyal yara örtü malzemesi olarak güvenli ve etkili bir şekilde kullanılabileceği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Yara örtü malzemesi; Jelatin; Poli([2-(metakriloiloksi)etil]trimetilamonyum klorür); Elektro döndürme; Antibakteriyel etki; Sitotoksik etki.

ABSTRACT

PRODUCTION, CHARACTERIZATION, INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL AND CYTOTOXIC EFFECTS OF GELATIN-[2- (METHACRYLOYLOXY)ETHYL]TRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE) COMPOSITE NANOFIBERS

MÜLAZIMOĞLU, Gökçe

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Bioengineering, Master Thesis

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Murat İNAL

March 2017, 112 pages

When the skin is burned, the proteins that make up the skin break down and the oxygen supply to the skin decreases. This situation provides an excellent environment for the growth and proliferation of pathogenic microorganisms. It is important to develop new wound dressing materials to shorten the healing process, and contribute to the regeneration of skin's structure and function in a short period of time. An ideal wound dressing material should allow gas exchange, provide a moist environment in the wound interface, form a barrier against microorganisms, absorb excess fluids, and easily removed without creating trauma to the wound. In addition, it must be made from a non-toxic, biocompatible and antimicrobial material.

Gelatin is a biocompatible and biodegradable natural polymer obtained by partial degradation of collagen. When gelatin nanofibers are used as wound dressing material, they meet all the necessary requirements. However, their lack of antimicrobial properties restricts their use. The purpose of this study is to expand the field of use by bringing antimicrobial property for gelatin. For this purpose poly([(2-(methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride) (PMETAK), a quaternary ammonium polymer, a quaternary ammonium salt, is used. This polymer has

important properties for use on the body such as good antibacterial effect, low toxicity and low skin irritation.

In this study, the nanofibers were synthesized by electrospinning method using polymers of gelatin and PMETAK that dissolved in the formic acid-acetic acid mixture and mixed at different ratios. The obtained nanofibers were characterized with scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectrometer (FTIR), and thermogravimetric analysis (TGA) studies. The affect of system parameters on diameter of the nanofibers obtained with electrospinning method were examined by varying applied voltage, distance between collector and syringe, the flow rate, percentage of METAK polymer. The antibacterial effect of nanofibers was investigated in liquid culture medium against gram positive *Staphylococcus aureus* and gram negative *Escherichia coli* bacteria. The nanofibers were subjected to a breakdown test in phosphate buffer to determine their biodegradability. The cytotoxic effect of nanofibers was determined by WST-1 and double staining tests against L929 fibroblast cells. As a result of the studies carried out, it has been concluded that the obtained nanofibers can be used safely and effectively as antimicrobial wound dressing material.

The SEM studies show that the nanofibers are homogeneous and smooth. The diameters of the nanofibers containing 20% PMETAK were found to vary between 350–485 nm depending on the electrospinning parameters. When percentage of PMETAK increase from 20% to 80%, the diameters of nanofibers was found as 2410 nm. According to the fragmentation test results, it was found that after 14 days, more than 90% of the masses of all the nanofibers were lost. the nanofibers containing PMETAK showed good bactericidal activity against both of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria. In vitro WST-1 and double staining tests demonstrated that the nanofibers containing especially 20 and 40% PMETAK were biocompatible. As a result of the studies carried out, it has been concluded that the obtained nanofibers can be used safely and effectively as antimicrobial wound dressing material.

Key words: Wound dressing materials; Gelatin; Poly([2- (methacryloyloxy) ethyl]trimethylammonium chloride); Bactericidal activity; Cytotoxic effect.



TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında bütün aşamalarda hiç bir yardımını esirgemeyip, üstün sabrıyla ve değerli bilgileriyle bana yardımcı olup, yol gösteren kıymetli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat İNAL'a araştırmaya teşviği, yaklaşımı ve bu çalışma dışında hayata dair uslub ve tutumuyla da bana ilham olması sebebiyle şükranlarımı sunarım.

Her türlü konuda olduğu gibi bu konuda da dostluğu ile yanımda bulunan sevgili arkadaşım Ayşe YILMAZ'a tüm yaptıkları için teşekkür ederim.

Son olarak, bütün hayatım boyunca yanımda olup bitmek tükenmek bilmeyen bir sabırla maddi manevi destek olan aileme her daim teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
1.1. Polimerler	4
1.1.1. Polimerlerin Fiziksel Özellikleri	6
1.1.2. Polimerlerin Sentezi	7
1.2. Nanoteknoloji ve Nanolifler	12
1.3. Nanolif Üretim Yöntemleri	13
1.3.1. Faz Ayrımı	13
1.3.2. Çekme Yöntemi	13
1.3.3. Kendiliğinden Düzenleme	13
1.3.4. Kalıp Sentez Yöntemi	14
1.3.5. Fibrilasyon İle Nanolif Üretim Yöntemi	14
1.3.6. Eriyikten Nanolif Üretim Yöntemi	14
1.3.7. Çift Bileşenli Nanolif Üretim Yöntemi	14
1.3.8. Elektrodöndürme	15
1.4. Nanoliflerin Karakterizasyonu	19
1.5. Biyouyumluluk Testleri	20
1.5.1. İn Vitro Deneyler	23
1.6. Antimikrobiyal Aktivite	27
1.7. Nanoliflerin Kullanım Alanları Ve Kullanılan Polimerler	29
1.7.1. Biyomedikal Uygulamaları	29
1.7.2. Kullanılan Polimerler	33
1.8. Çalışmada kullanılan temel kimyasal maddeler	36

1.8.1. Jelatin	37
1.8.2. [2-(Metakriloiloksi)etil]trimetilamonyum klorür (METAK).....	38
1.9. Literatür Özeti	40
2. MATERİYAL VE YÖNTEM.....	46
2.1. Materyal.....	46
2.2. Cihazlar.....	47
2.3. Yöntem	48
2.3.1. Antibakteriyel Poli([2-(Metakriloiloksi)etil]trimetilamonyum klorür)'ün Sentezi.....	48
2.3.2. Nanoliflerin Sentezi ve Karakterizasyonu	48
2.3.3. İn Vitro Parçalanma Testi	52
2.3.4. Antimikrobiyal Etki Testi	52
2.3.5. Sitotoksosite Testleri	52
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	54
3.1. Moleküler Ağırlık Analizi Sonuçları.....	54
3.2. Nanoliflerin Karakterizasyonu	54
3.2.1. SEM Analizi	54
3.2.2 FTIR Analiz Sonuçları.....	60
3.2.3. TGA Test Sonuçları.....	63
3.2.4. Element Analizi	68
3.2.5. Parçalanma Testi Deney Sonuçları	69
3.3. Antimikrobiyal Etki Testi Deney Sonuçları	72
3.4. Sitotoksosite Testleri Deney Sonuçları	75
3.4.1. WST-1 Sitotoksosite Test Sonuçları.....	75

3.4.2. İkili Boyama Sonuçları	75
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	82
KAYNAKLAR.....	84



ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	SAYFA
1.1. Polimerizasyon yöntemleri.....	8
1.2. Serbest radikal katılma polimerleşmesinde büyüyen aktif zincire bir monomerin katılması	10
1.3. Radikalik katılma polimerizasyonunda zincir büyümesi [34]	11
1.4. Radikalik katılma polimerizasyonunda zincir sonlanması.....	11
1.5. Elektro döndürme düzeneğinin basit gösterimi.....	16
1.6. Dördüncül amonyum bileşiğinin temel gösterimi.....	28
1.7. Jelatinin kimyasal yapısı	38
1.8. METAK ve PMETAK'ın kimyasal yapısı.....	40
2.1. Elektro döndürme düzeneği	49
2.2. %40 METAK polimeri içeren çözeltiden elde edilen nanolif.....	50
3.1. A: Jelatin nanoliflere ait, B:%20 PMETAK polimeri içeren nanoliflere ait, C: %40 PMETAK içeren nanoliflere ait, D: %60 PMETAK içeren nanoliflere ait, E: %80 PMETAK içeren nanoliflere ait SEM görüntüleri.....	55
3.2. Gluteraldehit buharına maruz bırakılan A: Jelatin nanoliflere ait, B: %20 PMETAK içeren nanoliflere ait, C: %40 PMETAK içeren nanoliflere ait, D: %60 PMETAK içeren nanoliflere ait; E: %80 PMETAK içeren nanoliflere ait SEM görüntüleri.....	59
3.3. METAK polimerine ait FTIR spektrumu.....	60
3.4. Jelatin nanoliflerin FTIR spektrumu	61
3.5. Kütlece %60 METAK polimeri içeren jelatin/PMETAK nanoliflerin FTIR spektrumu.....	62
3.6. Gluteraldehit buharına maruz bırakılan kütlece %60 METAK polimeri içeren jelatin/PMETAK nanoliflerin FTIR spektrumu	63
3.7. Jelatin nanoliflerden oluşan numuneye ait TGA termogramı	64
3.8. PMETAK'tan oluşan numuneye ait TGA termogramı.....	65
3.9. %60 METAK polimeri içeren jelatin/PMETAK numunesine ait TGA termogramı	66

3.10. Gluteraldehit ile çapraz bağlanan %60 METAK polimeri içeren jelatin/PMETAK numunesine ait TGA termogramı	67
3.11. Numunelerin fosfat tamponu içerisinde güne bağlı kütle kayıpları	70
3.12. Fosfat tamponu içinde 24 saat bekletildikten sonra alınan A: jelatinden oluşan nanolif numunesine, B: %20 PMETAK içeren nanolif numunesine, C: %40 PMETAK içeren nanolif numunesine, D: %60 PMETAK içeren nanolif numunesine, E: %80 PMETAK içeren nanolif numunesine ait SEM görüntüleri	71
3.13. <i>Escherichia coli</i> için nanoliflerin antimikrobiyal etkisinin optik yoğunlukla değişimi (Kontrol: Sadece bakteri ekilmiş kültür ortamı; Jelatin: Jelatin nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %20 PMETAK: %20 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %40 PMETAK: %40 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %60 PMETAK: %60 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %80 PMETAK: %80 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı)	73
3.14. <i>Staphylococcus aureus</i> için nanoliflerin antimikrobiyal etkisinin optik yoğunlukla değişimi (Kontrol: Sadece bakteri ekilmiş kültür ortamı; Jelatin: Jelatin nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %20 PMETAK: %20 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %40 PMETAK: %40 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %60 PMETAK: %60 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %80 PMETAK: %80 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı).....	74
3.15. Kontrol grubu (ortamda hiç nanolif bulunmazken) için; A: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, B: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek, 100 µm mesafeyi göstermektedir.....	77
3.16. Jelatin nanolif (derişim=6,25 µg/mL) için; C: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, D: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek, 100 µm mesafeyi göstermektedir	77
3.17. Jelatin nanolif (derişim=200 µg/mL) için; E: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, F: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek, 100 µm mesafeyi göstermektedir	78

3.18. %20 PMETAK içeren nanolif (derişim=6,25 µg/mL) için; G: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, H: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Hücrelerde apoptotik veya nekrotik görüntü bulgularına rastlanmamıştır. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 100µm mesafeyi göstermektedir.....	78
3.19. %20 PMETAK içeren nanolif (derişim=100 µg/mL) için; K: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, L: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 100 µm mesafeyi göstermektedir.	79
3.20. %40 PMETAK içeren nanolif (derişim=6,25 µg/mL) için; M: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, N: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek, 100 µm mesafeyi göstermektedir.	79
3.21. %60 PMETAK içeren nanolif (derişim=6,25 µg/mL) için; R: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, S: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 100 µm mesafeyi göstermektedir	80
3.22. %80 PMETAK içeren nanolif (derişim=6,25 µg/mL) için; Ü: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, V: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 100 µm mesafeyi göstermektedir.	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>SAYFA</u>
1.1. Biyouyumluluk testlerinin avantaj ve dezavantajları.....	22
1.2. Elektro döndürme yöntemiyle nanolif eldesinde kullanılan bazı polimerler ve kullanım alanları.....	35
2.1. Yapılan deneysel çalışmalara ait parametreler.....	51
3.1. Elektro döndürme işleminde değişen parametreler ile elde edilen liflerin ortalama çaplarının değişimi.....	57
3.2. Farklı PMETAK içerikleri ile hazırlanan nanoliflerin element analizi sonuçları.....	69
3.3. Farklı PMETAK içerikleri ile hazırlanan nanoliflerin olması gereken ve hesaplanan %PMETAK miktarları.....	70
3.4. Jelatin ve farklı %PMETAK içeriğine sahip nanoliflerin fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi (% Hücre Canlılığı) (Jelatin:jelatinden oluşan nanolif numunesine; %20: %20 METAK polimeri içeren nanolif numunesine; %40: %40 METAK polimeri içeren nanolif numunesine; %60: %60 METAK polimeri içeren nanolif numunesine; %80: %80 METAK polimeri içeren nanolif numunesine ait sonuçlar).....	76
3.5. Jelatin ve farklı %PMETAK içeriğine sahip nanoliflerin %nekrotik indeks sonuçları (Jelatin: jelatinden oluşan nanolif numunesine; %20: %20 METAK polimeri içeren nanolif numunesine; %40: %40 METAK polimeri içeren nanolif numunesine; %60: %60 METAK polimeri içeren nanolif numunesine; %80: %80 METAK polimeri içeren nanolif numunesine ait sonuçlardır).....	82

KISALTMALAR DİZİNİ

DAB	Dördüncül Amonyum Bileşikleri
DLS	Dinamik Işık Spektrometresi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
ECM	Doğal Hücre Dışı Matrise
FCS	Fetal Buzağı Serum
FESEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi
HeLa	İnsan Epitel Hücreleri
LDH	Laktat Dehidrogenaz testi
METAK	[2-(Metakriloloksi)etil]trimetilamonyum klorür
MTS	Tetrazolyum Tuzları ile Yapılan Test
MTT	Tetrazolyum Tuzları ile Yapılan Test
PI	Propidium İyodür
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TGA	Termogravimetrik Analiz
UV	Morötesi Spektroskopi
WST	Tetrazolyum Tuzları ile Yapılan Test
XRD	X-ışını Difraksiyon Cihazı

XTT

Tetrazolyum Tuzları İle Yapılan Test



1. GİRİŞ

Açık yaraların bazı tiplerinin tedavisinde (örneğin, ısıl, travmatik, kronik, cilt kanserleri) yara örtü materyalleri önemli bir rol oynamaktadır. İdeal bir yara örtü materyalinin gaz alışverişine izin vermesi, yara ara yüzeyinde nemli bir ortam sağlaması, yara üzerinden travma oluşturmada kolayca kaldırılabilmesi, mikroorganizmalara karşı bir bariyer oluşturması ve aşırı akıntıları dışarı sızdırması gerekir. Ayrıca, antimikrobiyal, toksik olmayan, biyolojik olarak uyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen, yaranın iyileşmesini teşvik eden ve az işlem gerektiren bir biyolojik malzemeden yapılmış olması gerekmektedir [1, 2]. Geleneksel olarak kullanılan yara bantları; nemli, sıcak ve besleyici bir ortam sağlayarak yaralı bölge üzerinde mikroorganizmaların büyümesi için ideal bir ortam yaratmaktadır. İyileşme sürecini kısaltmak ve daha az ağrılı hale getirmek, aynı zamanda, derinin kısa süre içinde yapı ve işlevlerini yeniden kazanmasına katkı sağlamak için yeni yara örtü malzemelerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir [3, 4]. Etkili bir biçimde kullanılabilecek ve aranan bütün gereksinimleri karşılayabilecek bir yara örtü malzemesi geliştirmek için bu malzemenin yapısal olarak uyarlanabilir olması ve özelliklerinin kontrol edilebilir olması gerekmektedir. Bu amaçla son yıllarda elektrodöndürme ile elde edilen nanoliflerin kullanımı artmıştır [5, 6]. Elektrodöndürme tekniği mikro veya nano boyutlarda liflerin elde edilmesinde kullanılan basit, kurulumu ucuz, hızlı, süreç parametrelerinde rahatlıkla değişiklik yapılabilen, kullanılabilecek polimerlerin çok geniş bir çeşitlilik gösterdiği, ticari üretime elverişli bir işlemdir. Bu işlemde, bir şırınga yardımıyla polimer çözeltisi kilovolt seviyesinde yüksek voltaj ile yüklenmiş iki plaka arasında oluşturulan bir çekim alanı ile bir plakadan diğerine çekilmekte ve bu şekilde lifler oluşturulmaktadır [7]. Elde edilen liflerin önemli bir özelliği, bu yöntem ile elde edilen nanoliflerin birim kütle başına çok geniş yüzey alanı, çok gözenekli mikro yapısı, yüksek gaz geçirgenliği ve fibriller arası küçük gözenek boyutu ile doğal hücre dışı matrise (ECM) çok benzemeleridir. Elektro döndürülmüş gözenekli nanoliflerin doğal ECM'yi mikromorfolojik olarak taklit edebilmesi, nano ölçekte yüzey yapısı ve özellikleri yara iyileşmesi için arzu edilen hücrelerin yapışması ve çoğalması gibi hücre davranışlarını arttırmaktadır. Ayrıca polimerlerin biyolojik

olarak parçalanmasıyla, örtü malzemesinin yapısı zaman içinde buna uygun olarak değişerek tohum hücrelerinin çoğalmasına ve kendi doğal ECM'lerini üretmesine izin verir [7-10]. Bu da beklenen yara iyileşme etkisinin daha hızlı ve etkili bir biçimde gerçekleşmesini sağlamaktadır.

Jelatin, kollojenin hidrolizi ile elde edilen, kolajen ile hemen hemen aynı bileşime ve biyolojik özelliklere sahip doğal bir biyolojik polimerdir. Bilindiği gibi, kolajen hayvan vücudu ve doğal ECM'nin en önemli bileşenlerinden biri olarak en bol bulunan yapısal proteindir. Bundan elde edilen jelatinin de kolajenle aynı bileşime sahip olması ve biyolojik kökenli olmasından dolayı hücrelerin yapışması ve çoğalmasını arttırdığı bilinmektedir. Bu önemli özelliklerine bakıldığında ve klinik sonuçlar incelendiğinde jelatinin yara iyileşmesi ve doku yenilenmesini hızlandırdığı belirlenmiştir [10, 11]. Jelatinin yukarıda belirtilen özellikleri, toksik olmaması, biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bir malzeme olmasından dolayı elektro döndürme metodu ile elde edilen jelatin nanoliflerin yara örtü malzemesi, kontrollü salım sistemleri ve doku mühendisliği iskeleti olarak yaygın bir kullanım alanı bulunmaktadır [12-18]. Ancak, zayıf mekanik özellikleri ve suda çözünürlüğü jelatinin kullanım alanlarını daraltmaktadır [10]. Bu sebeple, jelatin nanoliflerin sulu ortamlardaki kararlılığını arttırmak amacıyla çapraz bağlanarak kullanılması gerekmektedir [19, 20]. Açık yaralar, bakterilerin kolonileşmesi ve enfeksiyon için uygun ortamlar oluşturmaktadır. Açık yaraların tedavisinde kullanılan yara bantları, yaranın yüzeyinde mikroorganizmaların rahatlıkla çoğalabilecekleri nemli, sıcak ve besleyici bir ortam sağlayarak bu bölgede enfeksiyona sebep olabilmektedir. Kronik yaralarda enfeksiyon önce kontaminasyonla başlamakta, ardından kolonileşme ile devam etmekte ve son olarak kritik kolonileşme seviyesinden sonra enfeksiyon hızla gelişmektedir. Bu enfeksiyonlar zamanla konak dokularda toksinler, proteazlar ve iltihaplanmaya sebep olan moleküller gibi çeşitli maddelerin aşırı birikmesine ve bu da beklenen tedavinin ve yara iyileşme sürecinin uzamasına neden olabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı cilt yaralarının acil bakımında yara iyileşmesinin hızlanmasını sağlamak için mikrobiyal enfeksiyonun önlenmesi çok önemlidir. Bundan dolayı da ideal bir yara örtü malzemesinin antimikrobiyal bir özellikte olması gerekmektedir. Örtü malzemelerine antimikrobiyal özellik kazandırmak amacıyla ağır metaller (gümüş, bakır, çinko ve kalay gibi), fenoller, halojenler (örneğin, iyot), nitrik oksit,

fosfonyum tuzları, dördüncül amonyum bileşikleri ve antibiyotikler sayılabilir. Antibakteriyel maddeler arasında dördüncül amonyum bileşikleri, iyi antibakteriyel özelliklerine, düşük toksisitesine, cildi tahrişinin düşük olmasına, düşük korozyon özelliklerine, iyi çevre kararlılığına ve mükemmel hücre zarı geçirgenlik özelliklerine bağlı olarak en yaygın olarak kullanılan ajanlar arasında bulunmaktadır. Ancak, örtü malzemesi tasarlanırken kullanılan düşük molekül ağırlıklı aktif maddeler ortama yavaş yavaş salındığı için kullanım süreleri çok sınırlıdır ve bunun yanı sıra antibakteriyel maddelerin açığa çıkması insanlarda toksik özelliğe ve bakteri direncinin oluşması gibi etkilere neden olabilmektedir. Antimikrobiyal madde olarak düşük molekül ağırlıklı maddeler yerine polimerik malzemelerin kullanılmasının hijyenik yüzeylerin alanını büyütürken zararlı mikroorganizmalarla temasında öldürme yeteneğini artıracakları düşünülmektedir. Bu yaklaşım, antimikrobiyal maddelerin çevreye salımının önlenmesi ile malzemelerin daha uzun süreli etki göstermesini, verimliliğinin ve seçiciliğinin artmasını sağlayacaktır [4, 21-23].

Jelatin nanolifler yara örtü malzemesi olarak kullanıldığı zaman, gerekli olan bütün gereksinimleri karşılamaktadır, fakat antimikrobiyal olmadığı için bu özelliği onun kullanımını kısıtlamaktadır.

Bu çalışmanın amacı jelatine antimikrobiyal özellik kazandırarak kullanım alanını genişletmektir. Bu amaçla bir dördüncül amonyum polimeri olan poli([2-(metakriloloksi)etil]trimetilamonyum klorür) kullanılacaktır. Bu madde bir dördüncül amonyum polimeri olarak iyi antibakteriyel özellik, düşük toksisite ve cilt tahrişinin düşük olması gibi vücutta kullanım için önemli özelliklere sahiptir. Ayrıca antimikrobiyal madde olarak kullanılacak polimerin bir akrilat polimeri olması sebebiyle, bunun yapıya ilave edilmesinin diğer özelliklerin yanı sıra jelatinin mekanik özelliklerini de büyük oranda artıracakları düşünülmektedir. Poli([2-(metakriloloksi)etil]trimetilamonyum klorür), jelatin ile birlikte formik asit-asetik asit karışımı içinde çözülerek, hızlı, ucuz ve kolay uygulanabilir bir yöntem olan elektro döndürme yöntemi ile nanolifler sentezlenecektir. Elde edilen liflerin suya olan dayanıklılığını ve mekanik özelliklerini arttırmak amacıyla gluteraldehit buharına maruz bırakmak suretiyle çapraz bağlanarak kullanılacaklardır. Elde edilen

ve çapraz bağlanan lifler taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (SEM), fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), termogravimetrik analiz (TGA) teknikleri ve parçalanma testleri ile karakterize edilecektir. En son aşamada liflerin antimikrobiyal yara örtü malzemesi olarak kullanılabilirliğini belirlemek için *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* kültürleri ile antimikrobiyal etkisi araştırılacak ve son olarak vücuda uyumluluğu fibroblast hücreleri kullanılarak sitotoksikite, apoptoz ve nekroz çalışmaları yapılarak değerlendirilecektir.

1.1. Polimerler

Doğada çok yaygın olarak bulunan polimerik maddelerin tarihi yeryüzünün oluşumu, kullanımı ise insanlık tarihi kadar eskidir [24]. Örneğin hala kullanılan ve polimerik ürünlere örnek verebileceğimiz kauçuğun kullanımı 5000 yıl öncesine dayanmaktadır. Yine bugün dikiş ipliklerinden şişelere, dekoratif malzemelerden yapıştırıcılara, mutfak eşyalarından tıbbi malzemelere, elektronik cihaz parçalarına kadar birçok malzeme polimerlerin hayatımızın ne kadar içinde olduğunu göstergesidir [25]. Polimerlerin, ucuz ve hafif olması, mekanik özelliklerinin genellikle yeterli olması, rahat şekillendirilebilir olması, kimyasal açıdan inert olup korozyona uğramıyor olması ve yüksek molekül ağırlığından kaynaklı yüksek vizkoziteye sahip olması gibi özellikleri polimer malzemelerin sahip olduğu geniş kullanım alanlarının nedenini açıklamaktadır [26]. Polimerler sahip oldukları bu özelliklerden dolayı yalnız kimyacıların ve malzemecilerin değil; tıp, elektrik, makine, tekstil, endüstri, fizik ve biyoloji gibi alanlarda çalışanların da ilgisini çeken malzemelerdir [24, 27]. Başlangıçta gündelik eşya yapımında veya temel endüstri alanlarında kendine yer bulan polimerler bugün yapay organ üretimi, kontak lensler, kontrollü ilaç salımı, yara-doku örtü malzemesi, ameliyat iplikleri gibi birçok uygulamayla sağlık alanında da önemli bir yer edinmiştir [26]. Yapılan bütün bu değerlendirmelere bakıldığında polimer kimyası, kimyanın yanı sıra yukarıda bahsi geçen birçok bilim alanını kapsayan ayrı bir bilim disiplini olarak görünmektedir [27, 28]. Bütün bunlar yaşantımızın hemen hemen her alanında polimerik malzemeleri oldukça sık kullandığımızı göstermekte olup modern teknolojinin her geçen yıl ilerlemesiyle bu malzemelere duyulan ihtiyacın giderek artacağını da

ispatıdır [29]. Bunun sonucu olarak polimerlere duyulan talep de artmakta ve bu artan talebe karşılık geçmişten günümüze devam eden polimer araştırmaları da büyük önem kazanmaktadır [26]. Kısaca polimerlerin merkezinde bulunduğu hızla genişleyen bilimsel ve teknolojik devrim devam etmektedir. Bu devrim; malzeme biliminin daha iyi anlaşılması, sentetik tekniklerinin ve analitik araçların kullanılabilmesi gibi birbirini tamamlayan faktörlerin sonucudur [30].

Polimer, kelime anlamı olarak incelendiğinde "çok birim" anlamına gelen, Yunanca "polus (çok)" ve "meros (birim)" kelimelerinden türetildiği görülmektedir [24, 26, 30]. Kimyasal anlamda incelendiğindeyse; kimyasal bağlarla bağlanmış çok sayıda aynı veya farklı grupların uzun zincirli, yüksek molekül ağırlıklı oluşturdukları bileşikler olarak tanımlanabilir. Kısaca küçük ve basit birimlerden oluşmuş makro moleküllerdir [26]. Burada; *mer* (tekrarlanan birim) olarak tanımlanan, polimer molekülü içerisinde tekrarlanan küçük ve basit kimyasal maddelerdir, polimeri elde etmek için başlangıçta kullanılan küçük molekül ağırlıklı organik maddelere de *monomer* denir. Çifte bağ, üçlü bağ, iki ve daha fazla fonksiyonel gruplar içeren monomerler vardır. Bir çok monomerin birleşerek, büyük molekül meydana getirmesi sonucu polimerler oluşur [31]. Monomerlerin çeşitli kimyasal bağlarla bir araya gelerek polimer oluşturmaya polimerleşme veya polimerizasyon adı verilir. Tıpkı diğer maddelerde olduğu gibi polimeri oluşturan moleküller de atomlardan ibarettir ancak basit maddelerle kıyaslandıklarında polimer maddeler kendilerini oluşturan moleküllerin büyüklüğü ve molekül ağırlığı ile onlardan ayrılırlar [26]. Özetle polimerler genel manada 5.000 – 250.000 ve daha fazla molekül ağırlığı bölgesinde bulunan, büyük molekül kütlelerine sahip maddelerdir. Öyle ki bu molekül kütleleri on ve yüz binlerle hatta bazı hallerde milyonlarla ifade edilebilir [29]. Bu makro yapı, monomerlerin kendi kendileriyle ve diğer monomerlerle bağlanmalarından, bağlanma şekillerinden ve bağlanma miktarlarının fazlalığından kaynaklanmaktadır [32].

Polimerlerin sahip olduğu yüksek viskozite, sünebilme ve şekil alabilme, kalıplanabilme gibi çok geniş alanda kullanılabilmelerine imkan sağlayan özelliklerinin temelinde kovalent bağlar vardır. Üstelik polimerlerin sahip olduğu bu özellikler gerekli fiziksel veya kimyasal değişiklikler yapılarak daha da iyileştirilebilir. Yeni bir polimer sentezlemek yerine elimizdeki polimerin

değiştirilmesini tercih etmek; üretim maliyetinin azalması, işleme tekniklerinin geliştirilmesi ve iyileştirilen polimerin kullanım alanının genişletilmesi açısından daha avantajlıdır [26].

Katı, sıvı ve çözelti halde kullanılabilen polimerik maddelerde polimer yapısı ile polimerlerin mekanik, termal ve diğer fiziksel özellikleri yakından ilgilidir. Polimer yapısı denildiğinde ilk olarak kimyasal bileşim terimi incelenmelidir. Burada yinelenen birimler dikkate alınır, kimyasal formülü ve adı belirtilir. İkinci sıradaysa moleküler mimari incelenir ve bu kısımda polimerin doğrusal, dallanmış ya da üç boyutlu bir ağ örgüsü oluşuna göre yapısal düzen dikkate alınır [25].

1.1.1. Polimerlerin Fiziksel Özellikleri

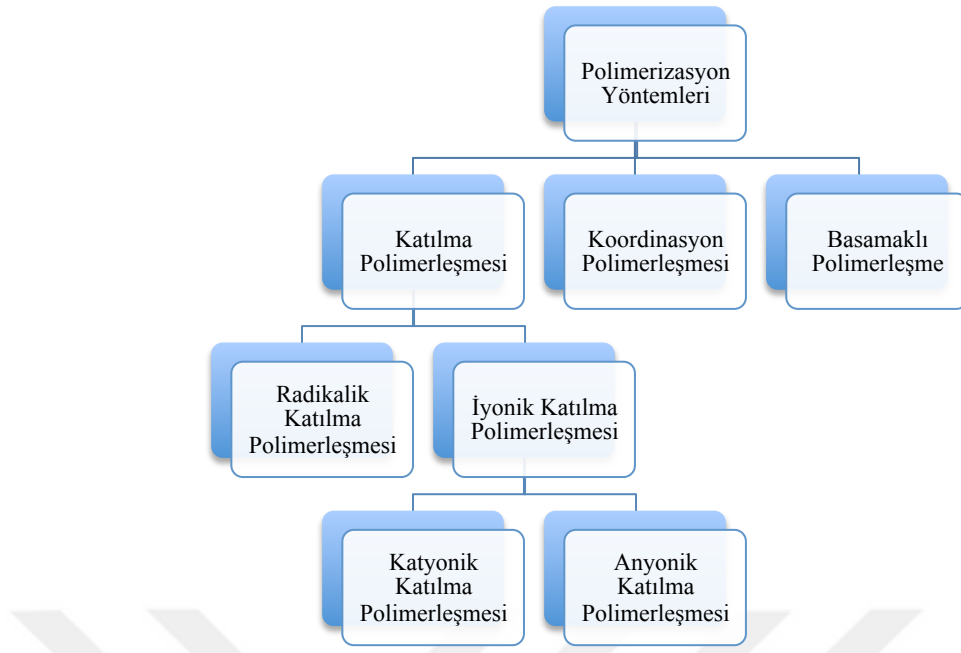
Diğer bütün maddelerde olduğu gibi polimerlerin de kimyasal özellikleri yapılarına bağlıdır. Polimerler molekül ağırlıkları büyük olan maddelerdir ancak yapılarında bulunan fonksiyonel grupların reaksiyon kabiliyetlerinin bu molekül ağırlığından bağımsız olduğu kabul edilir ve bu gruplar bulundukları yere bakılmaksızın kendilerine özgü reaksiyon vermelidir [29]. Polimer moleküllerinin büyüklüklerinden ve çok sayıda fonksiyonel grup içermelerinden kaynaklı, kimyasal reaksiyonlar için bazı özel durumlar gerektirmelerinin ve diğer küçük moleküllü bileşiklerin reaksiyonlarına göre daha yavaş olmalarının dışında küçük moleküllü bileşiklerin reaksiyonları ile aynıdır diyebiliriz. Ayrıca polimer yapısında bulunan fonksiyonel grupların tamamı reaksiyona girmez [33].

Polimer içinde bazı bölgelerde polimer zincirlerinin istiflenmesiyle kristal bölgeler oluşur. Polimerlerin çoğu örgülerinde amorf ve kristal bölgeleri birlikte bulundurur (yarı kristal). Bu yarı kristal polimerlerin genel örgüsü, kristal bölgelerin amorf faz içine gömüldüğü bir sisteme benzetilir [34]. Polimer yapısının kristal, yarı kristal veya amorf olması ısı karşısındaki davranış ile doğrudan ilişkilidir [26]. Bu ilişkiyi örneklendirecek olursak; amorf yapıdaki bir polimer (cam gibi) yeterince düşük sıcaklıklarda sert ve kırılgandır bu polimer ısıtıldığında camsı geçiş sıcaklığı denilen bir sıcaklıkta yumuşayarak kauçuk özelliği gösterir. Sıcaklık arttırılmaya

devam ettiğinde, kauçuğumsu davranışı da bırakarak yavaş yavaş zambak görüntüsü üzerinden yeterince yüksek sıcaklıklarda sıvı halini alır. Yarı kristal yapıdaki polimerler de camsı geçiş sıcaklıkları altında kırılırlar ve bu sıcaklık geçildiğinde belli derecede yumuşamasının yanında kristal yapılarından dolayı esnek termoplastik davranış gösterirler ve erime sıcaklığına ulaşınca kadar termoplastik özelliklerini değiştirmeyip erime sıcaklığına getirildiklerinde erirler ve oluşturdukları sıvı viskoz yapıdadır [34]. Tam kristal polimerler ise serttirler ve camsı geçiş göstermezler, diğerleri gibi bunlar da belli bir sıcaklıkta erirler [34]. Genel itibari ile polimerler oda sıcaklığında katıdır [26]. Polimer yapısındaki bağlarla ilişkili olarak lineer ve dallanmış polimerler, sıcaklık ile eriyerek viskozitesi çok yüksek sıvı haline dönüşürken çapraz bağlı ve üç boyutlu ağ yapıda olan polimerler çok zor erir veya hiç erimezler [29]. Degradasyon, sıcaklığın etkisi ile polimerlerin molekül ağırlığı daha küçük olan maddelere parçalanmasıdır. Polimerlerin molekül ağırlığı arttıkça yoğunluk artar ve erime noktası yükselir ancak molekül ağırlığı belli bir değere ulaştıktan sonra yoğunluk ve erime noktası gibi fiziksel faktörlerde artık bir değişme gözlenmez [26].

1.1.2. Polimerlerin Sentezi

Polimerler arasında var olan bileşen farklılıkları son ürün özellikleri bakımından önemli olup bu farklı özellikler polimerlerin kullanım alanlarını doğrudan etkilemektedirler. Son ürün özelliklerini etkileyen bir diğer faktörse polimerlerin hazırlanma ve elde edilme mekanizmalarıdır. Flory polimer oluşturma mekanizmalarının önemini 1953 yılında göstermiştir [35]. Polimer oluşturma mekanizmalarında kimyasal tepkimelerden faydalanılır. Bu kimyasal tepkimeler, basamaklı polimerizasyon ve katılma polimerizasyonu olmak üzere iki ayrı temel polimerizasyon yöntemi altında incelenir. Eğer bir polimer basamaklı polimerizasyon üzerinden elde edilmişse bu polimere basamaklı polimer, katılma polimerizasyonu ile elde edilmişse de katılma polimeri olarak adlandırılır. Polimerizasyon yöntemlerinin şematik olarak genel gösterimi aşağıda verilmiştir [36].



Şekil 1.1. Polimerizasyon yöntemleri

1.1.2.1.Katılma (Zincir) Polimerizasyonu

Katılma polimerizasyonunda tepkimeler için mutlaka bir başlatıcı kullanılır ve polimerleşme hızı kondensasyon tepkimelerinin polimerleşme hızından daha büyüktür. Burada monomerler büyümekte olan zincire birer birer ve hızlıca katılırlar, bu yüzden katılma polimerizasyonun her aşamasında sadece yüksek mol kütleli polimer ve tepkimeye girmemiş olan monomer bulunur. Katılma polimerizasyonunda büyüme yalnız aktif zincirler ve monomer molekülleri arasında gerçekleşir [37]. Aktif polimer zincirlerinin, sonlanma tepkimeleriyle aktifliklerini kaybetmesiyle de polimerizasyon işlemi tamamlanır [36].

Katılma polimerizasyonu zincir büyümesini sağlayan aktif merkezlerin karakterine göre temel olarak iki gruba ayrılır. Eğer bu aktif merkezler radikalik karakterde ise radikalik polimerizasyon (radikalik zincir polimerizasyonu), iyonik bir karaktere sahip ise de iyonik polimerizasyon (iyonik zincir polimerizasyonu) olarak adlandırılır

[38]. İyonik polimerizasyon da kendi içerisinde katyonik polimerizasyon ve anyonik polimerizasyon olmak üzere iki başlık altında incelenir.

1.1.2.2. Serbest Radikalik Zincir Polimerizasyonu

1930'lu yıllardan beri bilinmekte olan ve günümüzde de zengin monomer çeşitliliğine sahip olup özel polimer üretimine olanak sağlamasıyla endüstriyel alanlarda ve kimyasal araştırmalarda oldukça sık kullanılan, ayrıntılı araştırılmış ve özellikleri iyi bilinen bir yöntemdir [39]. Ne kadar çok kullanıldığını sadece yapılan plastik üretime bakarak da anlayabiliriz. Dünyadaki plastik üretimin neredeyse yarısı bu yöntemle elde edilmektedir ve bu yöntemle elde edilen önemli plastiklere; polietilen, polistiren, polipropilen, poli(vinilklorür) örnek olarak verilebilir [27].

Radikalik zincir polimerizasyonunda polimerizasyon serbest radikaller (eşleşmemiş elektron bulunduran molekül) üzerinden yürür. Burada doymamış moleküllerin zincir büyüme reaksiyonları radikallerle başlatılır [40]. Monomerle etkileşen başlatıcı, aktif bir ara bileşik oluşturur böylece bir başka monomer bu ara bileşiğe bağlanabilir. Bunun sonucunda bir aktif merkezli bileşik meydana gelir ve bu şekilde devam ederek zincir hızla büyür. Polimerizasyon süresince monomer derişimi sürekli azalır [30]. Monomerler büyüyen zincire sırayla ve hızla katılırlar ve monomer derişimi çok küçük olsa bile reaksiyon hızlıdır [27].

Polimerizasyonun ilk anlarında yüksek molekül ağırlıklı polimer oluşur ve tepkime sonuna kadar polimer kütlesi çok fazla değişmez [41]. Reaktif merkezin kaybolmasıyla da zincir büyümesi durur. Serbest radikalik zincir polimerizasyonun üç temel aşaması vardır [27].

1. Başlama Basamağı

İlk olarak monomer moleküllerinin oluşturulması gerekir ve radikal oluşumu ya ısı, radyasyon, ışık gibi yöntemler ya da peroksitler, azo bileşikleri, redoks çiftleri gibi çeşitli başlatıcılar tarafından sağlanır. Bunlar arasından en sık kullanılanı dışarıdan bir başlatıcı eklemektir. Ortaya çıkan bu serbest radikaller de bir monomere katılarak

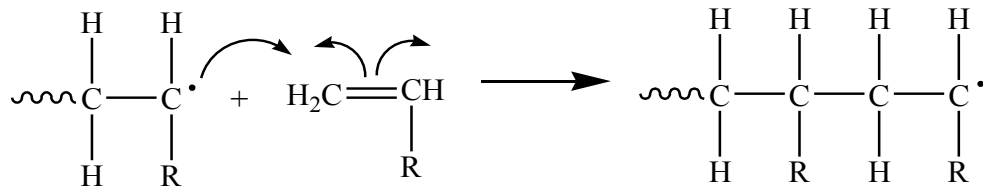
aktif merkezi oluşturlar böylece polimerizasyonu başlatmış olurlar [40]. (I) bir başlatıcı ve (M) bir monomer molekülünü göstermek üzere başlama tepkimesi;



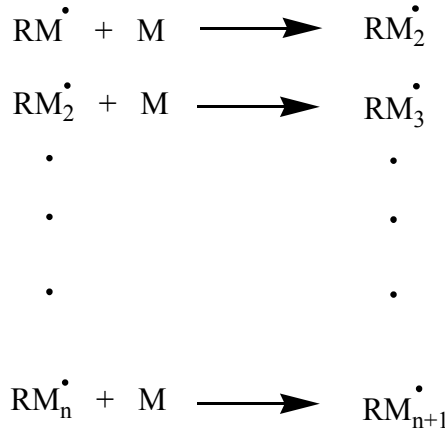
şeklinde iki basamaklı bir tepkimedir. Bu tepkimeler sayesinde ilk aktif merkezler meydana gelmiş olur.

2. Büyüme Basamağı

Bu basamakta monomer molekülleri oluşan radikallere hızla katılır ve polimer zinciri de hızla büyür [40].



Şekil 1.2. Serbest radikal katılma polimerleşmesinde büyüyen aktif zincire bir monomerin katılması

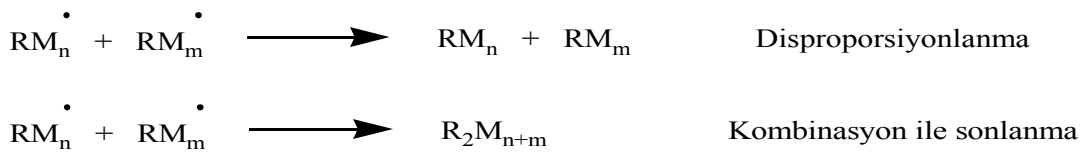


Şekil 1.3. Radikalik katılma polimerizasyonunda zincir büyümesi [34]

3. Sonlanma Basamağı

Bu basamakta ise çoğalan radikallerin yok olmasıyla polimer zincirlerinin büyümesi durur.

Sonlanma basamağı ya radikal birleşmesi ya da orantısız sonlanma şeklinde gerçekleşir. Eğer bir hidrojen atomu bir radikalden ötekine geçer ve iki polimer zincirinden birinin ucunda olefinik çift bağ, diğerinde de doymuş bir bağ meydana gelirse buna ayrı ayrı sonlanma (disproporsiyonlanma) denir. Büyümekte olan aktif polimer zincirleri birbiri ile birleşirse, buna birleşerek (kombinasyonla) sonlanma denir. Sonlanmanın birleşerek veya ayrı ayrı ilerlemesi monomer molekülünün yapısına ve polimerizasyon ortamının sıcaklığına yakından bağlıdır. Katılma polimerizasyonun da bu temel sonlanma reaksiyonları yanında transfer reaksiyonları da görülür. Büyümekte olan polimer zinciri aktifliğini ortamda bulunan monomere, başlatıcıya, çözücüye ve aktifliğini yitirmiş bir polimer molekülüne aktarabilir [40].



Şekil 1.4. Radikalik katılma polimerizasyonunda zincir sonlanması

1.2. Nanoteknoloji ve Nanolifler

Dünya şu anda yeni disiplinler arası bir teknoloji olan nanoteknolojinin ilerlemesine ve gelişmesine tanıklık etmektedir. Nanoteknoloji kavramı ilk olarak 1959 yılında ünlü fizikçi Richard Feynman tarafından ele alındı ve nanoteknoloji terimiyle ilk 1990 yılında K.Eric Drexler ve Marvin Minsky tarafından kitaplarında direkt olarak kullanıldı. Daha sonra, nanometre ölçeğindeki her türlü yapı ve cihazları kapsayan, bir kavram olarak kabul edildi [42]. Araştırmacılar nanoteknolojinin ortaya çıkmasıyla birlikte nano ölçekli malzemelerin eşsiz özelliklerinin incelemesiyle daha çok ilgilendiler [43]. Hayatın kendisine uyum sağlamak karşı karşıya olduğumuz en temel konulardan birisidir ve nanoteknoloji bu aşamada bize oldukça yardım etmektedir. Fermentatif katalizden DNA replikasyonuna kadar bütün biyolojik süreçlerin nano ölçekte yer alması nano boyutun bizler için önemini gözler önüne sermektedir [44]. Bir insan saçının yüz binde birine karşılık gelen nanometre (nm), metrenin milyarda biridir [42]. Nanolifler de genellikle 1 mikrondan daha küçük çaplara sahip iplikli nano malzemelerdir.

Polimer liflerinin çapları nanometre veya mikrometrenin altına çekildiğinde, bilinen diğer formları ile kıyaslandığında, geniş yüzey alanı, yüksek yüzey/hacim oranı (nanoliflerdeki hacim oranı mikroliflerinkinden 10³ kat daha büyük olabilir), düşük özgül ağırlık, yüksek gözeneklilik, yüzey fonksiyonlarında esneklik ve üstün mekanik performans gibi birçok değişik özellik açığa çıkar. Küçük boyutlu olmaları yapısal kusurlarını azaltmıştır [45] ve yüzey/hacim veya yüzey/kütle oranlarını arttırmıştır böylece yüksek spesifik yüzey alanlarına sahiplerdir. Bu geniş yüzey alanları sayesinde fonksiyonel grupları, iyonları ve çeşitli parçacıkları tutma ve yayma kapasiteleri de yüksektir [46, 47]. Nanolifler bu üstün özellikler sayesinde birçok alanda önemli pek çok uygulama için en uygun aday haline gelmektedirler. Son yıllarda polimer nanolif hazırlamak için faz ayrımı, çekme, kendiliğinden düzenleme, kalıp sentezi, fibrilasyon ile üretim, eriyikten nanolif üretimi, çift bileşenli üretim ve elektro döndürme yöntemleri kullanılmaktadır [48].

1.3. Nanolif Üretim Yöntemleri

1.3.1. Faz Ayrımı

Faz ayırma tekniği, gözenekli malzemelerin elde edilmesinde kullanılmaktadır. Bu teknikte ilk olarak polimerin çözülmesi sağlanır sonrasında jel oluşumu, çözücü ekstraksiyonu, dondurma ve kurutma işlemleri sırasıyla yapılır. Bu teknikte katı polimer taneciklerinin köpük içindeki transferi oldukça uzun sürmektedir [48]. Faz ayırma tekniğinde çözücü ve polimerin oluşturduğu homojen çözeltinin iki faza ayrılması sayesinde nanolif elde edilmektedir [49].

1.3.2. Çekme Yöntemi

Çekme yöntemi lif sektöründeki kuru eğrilme sürecine benzer bir süreçtir. Bu yöntemde mikromanipulator adı verilen ve mikroskop altında çalışmaya imkan sağlayan bir alet kullanılır. Mikro manipulator aracılığı ile çözeltiye daldırılan birkaç mikrometre çapındaki mikropipet belirli bir hızda çözeltiden çekilir böylece lif elde edilir. Ancak bu şekilde elde edilen liflerde lif çapının kontrolü oldukça zordur [50, 51].

1.3.3. Kendiliğinden Düzenleme

Kendiliğinden düzenlenmede elde edilmek istenen polimer bileşenlerinin kendiliğinden, çeşitli zayıf kimyasal bağlar ile belirli bir düzen içine girmesi beklenir. Bu süreç oldukça zaman alıcı ve karmaşıktır [48].

1.3.4. Kalıp Sentez Yöntemi

Kalıp sentez yöntemi ile nanolif elde etmek için kalıp olarak adalandırılan nano gözenekli membranlar kullanılır. Membran gözenekleri silindirik yapıdadır bu gözenekler sayesinde nanolif veya içi boş borucuk şeklinde olan nanotüpler elde edilmesi mümkündür [52].

1.3.5. Fibrilasyon İle Nanolif Üretim Yöntemi

Bu yöntemde ayrı ayrı liflerin elde edilmesinden ziyade selülozik liflerin çözünmesi, jelleşmesi, dondurulması ve nano gözenekli köpük oluşturacak şekilde kurutulması işlemleriyle nanolif tülbendi şeklinde üretim sağlanır. Elde edilen bu gözenekli yapı özellikle filtre üretiminde kullanılmaktadır [46, 49].

1.3.6. Eriyikten Nanolif Üretim Yöntemi

Bu işlem tekstil sektöründe dokuma olmayan kumaş üretmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Eriyik halinde bulunan polimer çeşitli filtrelerden geçirilerek bir pompa vasıtasıyla karıştırıcı bölgeye gönderilir, sonrasında yüksek basınçta sıcak hava üflenerek metal uçtan filamentler halinde çıkması sağlanır. Daha sonra da hareketli bantlar aracılığıyla silindirden geçirilerek üretim sağlanır [49, 53].

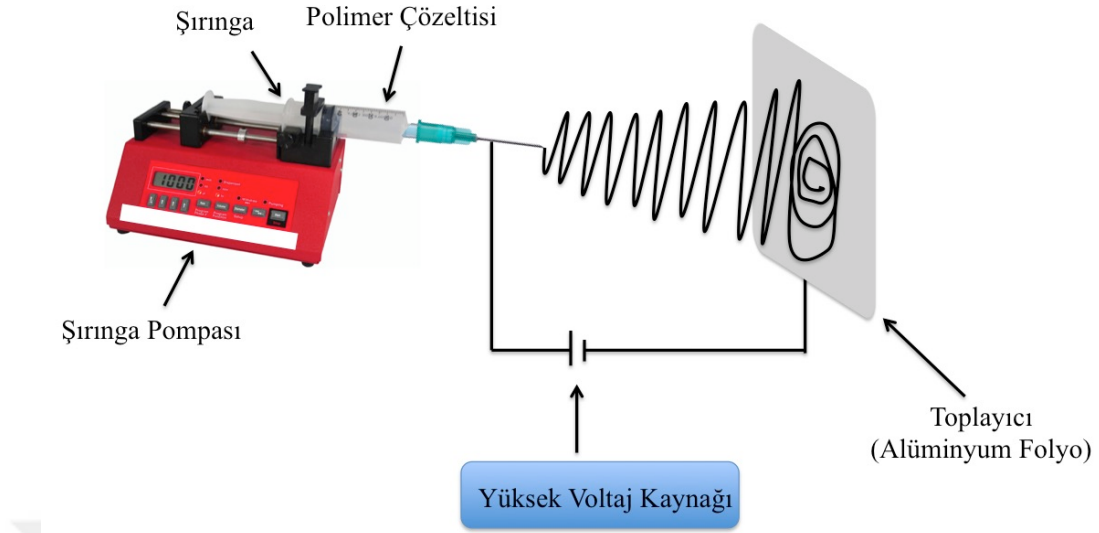
1.3.7. Çift Bileşenli Nanolif Üretim Yöntemi

Bu yöntemde çözünebilen yani bir başka deyişle ayrışabilen çift bileşenli lifler kullanılmaktadır. Bu işlem için özel olarak tasarlanmış metal bir uçtan iki farklı polimerin akıtılması ile üretim yapılmaktadır. Bu yöntemle üretilen liflerin kullanım alanları yapay kürklerden, sentetik damarlara ve filtrasyon malzemelerine kadar uzanmaktadır [49, 54].

1.3.8. Elektro döndürme

İlk 1914'te Zeleny tarafından çalışılmış olmasına karşın 1934 yılında Formhals tarafından patenti alınan elektro döndürme yöntemi, nanolif üretiminde en yaygın kullanılan yöntemlerden birisidir [55]. Yaygın kullanılmasının başlıca nedenleri sistemin basitliği, çok yönlülüğü ve ölçeklendirme kolaylığı sağlamasıdır. Üstelik bu teknikte besleme hızı, uygulanan voltaj, toplayıcı mesafesi gibi sistem şartlarının değiştirilmesiyle nanoliflerin morfolojisi kolayca kontrol edilebilir [56]. Elektro döndürme yöntemi klasik lif eldesi için kullanılan poliamid, akrilik gibi polimerlerin yanı sıra biyo bozunur, elektriği iletebilen, fotonik yapıdaki özel polimerler için de uygulanabilir [57]. Bu teknik ile çapları 3 nanometreyle 5 mikrometre arasında değişen polimerik lifler üretmek mümkündür ve elde edilen liflerin potansiyel uygulama alanları oldukça geniştir. Bu alanlara; doku mühendisliği uygulamaları, filtrasyon membranları, katalitik nanolifler, fiber tabanlı sensörler, enzim immobilizasyonu, tekstil alanındaki uygulamalar örnek olarak gösterilebilir [58].

Elektro döndürme yönteminde ultra ince yapıya sahip olan nanolifler polimer çözeltisinin ya da eriyiğinin üzerine güçlü bir elektrik alanının uygulanmasıyla elde edilir [59]. Şekil 1.5'te temel bir elektro döndürme düzeneğini göstermektedir. Bu düzeneğin en basit haliyle bir yüksek gerilim kaynağı, bir enjektör pompası ve bir tane de toplayıcıdan oluşur [59].



Şekil 1.5. Elektro döndürme düzeneğinin basit gösterimi

Bu sistemin temeli, uygulanan güçlü elektrik alanına dayanmaktadır. Şırınga pompası polimer çözeltisinin ya da eriyiğinin iğneden istenen kontrollü bir akış hızında gönderilmesi için kullanılır [60]. Polimer çözeltisi veya eriyik enjektör içine çekilmiştir. İğne ucuna bağlanan elektrot ile genelde 1-30 kV aralığında değişen yüksek voltaj uygulandığında, iğne ucundaki polimer çözeltisine ait damlacık yüksek elektrik yükünün etkisiyle dengeli bir şekilde toplayıcı yüzeyine dağılır [59]. Bunun olması için polimer akışkanına uygulanan voltajın kritik seviyeye ulaşması gerekir, voltaj kritik seviyeyi yakaladığında Taylor konisi oluşur ve damlada jet oluşumu gözlenir. Voltajın kritik seviyeye ulaşmasıyla iğne ucunda yüksek bir elektrik alanı oluşur bu da elektrohüdrodinamik kuvvetlerin oluşumuna neden olur. Elektrohüdrodinamik kuvvetler öncelikle ara yüzeyde yük varlığı ile ortaya çıkarlar. Çözelti moleküllerinin sahip olduğu yüzey gerilim kuvveti ile voltajdan kaynaklı arka basınç kuvveti ile uyumlu çalışırlar. Bu kuvvetler birlikte sıvı damlacığın Taylor konisi olarak adlandırılan konik biçimli bir hal almasına neden olurlar [61]. Daha sonra elektrik alan şiddeti arttırılmaya devam eder ve elektrostatik kuvvetler yüzey gerilim kuvvetlerini yenerek Taylor konisi ucundan çözeltinin jet akışına neden olurlar. Oluşan polimer jeti düşük potansiyelli toplayıcıya doğru hareket eder ve

toplayıcı yüzeyine dağılır. Toplayıcı üzerinde rastgele ağısı bir yapı oluşturan liflerin çapları birçok faktöre bağlı olarak 3 nanometre ile 5 mikrometre arasında değişmektedir [58, 62].

1.3.8.1. Etkileyen Faktörler

Elektro döndürme yöntemini etkileyen birçok işletme faktörü bulunmaktadır bunlar en genel anlamda 3 başlık altında toplanır [63].

- 1- Prosese ait parametreler
- 2- Çözeltiye ait parametreler
- 3- Çevresel parametreler

1.3.8.1.1. Prosese Ait Parametreler

Sistem düzeneği en basit haliyle bir yüksek gerilim kaynağı, bir enjektör pompası ve bir tane de toplayıcıdan oluşan bu yöntemde uygulanan voltaj, enjektör çapı, akış hızı, enjektör ile toplayıcı arasındaki mesafe gibi sistemsel faktörler nanolif oluşumunu etkileyen parametrelerdendir [43].

Üretimi etkileyen parametrelerin başında uygulanan voltaj gelmektedir. Çünkü polimer çözeltisinin elektriksel olarak yüklenmesini sağlayarak toplayıcı üzerine birikmesine neden olur [64]. Voltaj değerlerinin değişmesiyle şırınga ucundaki damlanın şekli de değişir, dolayısıyla yük taşınımını da etkiler. Genel olarak yapılan çalışmalarda voltaj artışının lif çapını azalttığı görülmüştür. Ancak belirli bir sınır geçildiğinde lif morfolojisinde boncuk oluşumu gibi istenmeyen durumlar ortaya çıkar [43]. Bunun temel nedeni voltaj artışıyla Taylor konisi iğne içerisinde oluşmaya başlar ve daha fazla polimer çözeltisi çekilerek boncuklanmalar oluşturabilir [63]. Bir başka ayarlanabilir ve temel etken de şırınga toplayıcı arasındaki mesafedir [65]. Lif oluşumu jetin ivmelenerek hareket etmesine, çözücünün buharlaşmasına bağlıdır ve lif oluşumu için az da olsa süreye ihtiyaç vardır. Toplayıcıya olan mesafe azaldığında pompalanan çözelti toplayıcıya daha

kısa sürede ulaşacaktır bu da çözücünün buharlaşmasına fırsat vermeyecektir ve lifler arasında yapışmalar ve boncuklanmalar gözlenecektir [66]. Mesafe artışı ise jetin izlediği yolun artmasına dolayısıyla lif çapının azalmasına neden olur [67]. Voltaj değerinin ve toplayıcıya olan mesafenin yanında enjektör çapı, besleme hızı, akış hızı, toplayıcı geometrisi ve dizaynı da elde edilen nanolifleri doğrudan etkileyen prosese ait parametrelerdendir [66].

1.3.8.1.2. Çözeltiye Ait Parametreler

Elektro döndürme yönteminde kullanılan polimer eriyik haldedir. Kullanılacak olan polimerin katı olması durumunda ise polimerin çözeltisi hazırlanır. Dolayısıyla akışkana ait yüzey gerilimi, viskozite, iletkenlik gibi özellikler nanolif eldesini doğrudan etkileyecektir.

Uzunluk başına birim düzleme etki eden kuvvete yüzey gerilimi denir ve elektro döndürme yöntemiyle nanolif elde edilebilmesi için bu kuvveti yani yüzey gerilimini aşacak bir yük uygulanmalıdır. Kullanılan akışkanın yüksek yüzey gerilimine sahip olması boncuklanmalara neden olabilir. Bunu önlemek amacıyla yüzey aktif maddeler veya düşük yüzey gerilimine sahip çözücüler kullanılabilir [43].

Viskozite, akmaya karşı gösterilen dirençtir bir başka deyişle akışkan moleküllerinin birbirlerini çekme kuvvetidir. Viskozite lif morfolojisini etkileyen parametrelerin başında gelmektedir. Elektro döndürme yöntemiyle düzgün nanolifler elde edebilmek için kullanılan akışkanın belirli bir viskoziteye sahip olması gerekir, viskoziteyse molekül ağırlığına, derişime, sıcaklığa bağlıdır. Düşük akışkan viskozitesi stabil jetten nanolif oluşumunu engeller [68]. Molekül ağırlığı ve aynı polimer için derişimi arttıkça akışkanın viskozitesi artar ve artan viskozite daha düzgün liflerin üretilmesine olanak sağlar [64]. Artan viskozite lif çapını da arttırır [65]. Viskozite belirli bir değeri aştığında enjektör ucundaki damla büyür ve çözeltinin akış hızı azalır buda sürekli lif oluşumunu engeller [64, 69]. Viskoziteye ek olarak yine çözeltiyle doğrudan ilişkili olan dielektrik sabiti de nanolif eldesinde önem arz etmektedir. Yüksek dielektrik sabitine sahip çözeltilerin toplam yük yoğunluğu

fazladır. Bu durum polimer jetinin kolayca uzamasını sağlayarak daha küçük çaplı ve daha düzgün lifler elde edilmesine olanak sağlar [64]. Dielektrik sabitinin yüksek olması o polimerin iletkenliğinin de yüksek olması anlamına gelir.

1.3.8.1.3. Çevresel Parametreler

Elektro döndürme tekniğiyle nanolif üretilirken ortam sıcaklığı, basınç, nem, atmosfer tipi, hava bileşimi gibi çevresel faktörler elde edilecek lif özelliklerini etkilemektedir. Örneğin ortam sıcaklığının yüksek olması viskozitenin azalmasına, çözünürlüğün ve çözücünün buharlaşma hızının artmasına neden olur [66]. Bunlar da belirli bir sıcaklığa kadar daha düzgün nanolif elde edilmesine yardımcı olur. Nemli ortam ise su moleküllerinin lif üzerinde yoğunlaşması nedeniyle gözenekli yapı oluşturur ve çözücünün buharlaşma hızını da olumsuz yönde etkiler [64].

1.4. Nanoliflerin Karakterizasyonu

Elektro döndürme yöntemiyle üretilmiş nanoliflerin karakterizasyonu yapılırken morfolojik, mekanik ve moleküler yapı özellikleri çeşitli yöntemlerle incelenir. Nanolif morfolojisinin belirlenmesinde alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM), SEM ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılır. Nanoliflerin yüzey özelliklerinin yanı sıra lif çapı ve çap dağılımı, boncuk büyüklüğü ve sayısı da morfolojik özellikleri arasındadır. Her bir özelliğin başarılı sonuçlar alabilmek adına kullanım alanına göre istenen şartları sağlaması oldukça önemlidir. Genellikle elde edilen liflerin çapları ve nanolif tabakasındaki dağılımlarının tek tip ve düzgün olması istenir. Lif çaplarının belirlenmesinde yaygın olarak SEM kullanılmaktadır. Bu cihazda numune üzerine elektronlar gönderilir ve görüntü numuneler üzerinden yansıyan bu elektronların dedektörler tarafından algılanmasıyla elde edilir. İletken numuneler doğrudan incelenebilirken iletken olmayanların iletken maddelerle kaplanması gerekmektedir. Boyutu 200 nm altı olan nanoliflerin incelenmesindeyse yüksek çözünürlüklü FESEM cihazının kullanılması SEM'deki aşırı ısınma sorununu azalttığı için daha uygundur. Her iki cihazda da elde edilen görüntüler görüntü analiz programları ile incelenir ve ortalama çap ile çap dağılımları belirlenir. Bir diğer

önemli ve istenmeyen durum ise nanolif tabakalarında boncuk oluşumudur. Elektro döndürme yönteminin parametrelerinin iyi ayarlanmaması sonucu oluşan boncuklar, lif tabakası üzerine damlayan polimer çözeltileri olarak tanımlanır. Boncuk oluşumu tabakadaki düzgün dağılımın ve lifsi yapının bozulmasına neden olduğu için istenmeyen bir durumdur ve SEM ile tespit edilmeleri oldukça kolaydır.

Nanoliflerin karakterizasyonu yapılırken nanoliflerin yüzey yapısının durumu, oluşan nanolifli tabakadaki nanolifler arası boşluklar, varsa üzerlerindeki gözenek sayısı, büyüklüğü, derinliği ve nanoliflerin hidrofilik ve hidrofobik yüzey özellikleri de dikkate alınır. Her bir özellik için uygun görüntüleme sistemi kullanılarak analiz edilir. Bunların yanında nanolif tabakanın mekanik özelliğinin incelenmesi dayanımlarının ve parçalanma sürelerinin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Bunun için genel olarak Dumbell formunda ya da dikdörtgensel formda numuneler hazırlanır ve mukavemet cihazlarında çeşitli yüklere tabi tutulurlar [70, 71]. Son olarak elde edilen nanoliflerin moleküler yapı özelliklerinden kristalin bölge oranları incelenir. Burada X-ışını difraksiyon cihazı (XRD), diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ve TEM cihazları kullanılabilmektedir [72-74].

1.5. Biyouyumluluk Testleri

Yabancı malzemelerin vücut içerisinde kullanılmaya başlamasından beri biyouyumluluk her zaman bir sorun olmuştur [75]. Bu vücut içerisinde kullanılan biyomalzemenin veya implantın başarısı temel olarak üç ana faktöre bağlıdır. Bunlardan biri kullanılan implantın özellikleri ve biyouyumluluğu, diğeri alıcının sağlık durumu ve sonuncusu da implantasyonu yapan cerrahın yetkinliğidir [76]. Kullanılan implantın özellikleri tedavi edilecek, desteklenecek veya değişecek bölgenin ihtiyaçlarını karşılayacak şekilde seçilir. Çeşitli malzemelerin canlı dokular ile temas halinde kullanma gereksinimi biyouyumluluk kavramını da beraberinde getirmiştir [77]. İmplant malzemesinin vücut sıvısında çözünmesi veya bozunması bölgesel inflamasyonlara, sistem toksik etkilere veya istenmeyen alerjik reaksiyonlara yol açabilir [78]. Biyouyumlu bir malzeme tamamen "etkisiz" olmayabilir, aslında biyouyumluluk için belirleyici olan konakçı yanıtının uygunluğudur. Bu yeterlilik belirli kurallara göre çeşitli uzmanlar tarafından

değerlendirilir [79]. En genel tanımıyla biyouyumluluk, bir malzemenin canlı dokular ile temas halinde iken doku reaksiyonlarına neden olmamasıdır, bu reaksiyonlar alerjik, mutajenik ve karsinojenik etkiler olabileceği gibi sistemik ve bölgesel toksik etkiler de olabilir [80]. Bir malzeme biyolojik bir ortam ile temas içindeyken, malzemenin yüzey kimyası ve topografyası, protein adsorpsiyonunu, hücrel etkileşimi ve nihai olarak konakçı yanıtını etkileyen önemli parametrelerdir [81]. Yeni bir biyomalzemenin vücut üzerinde istenmeyen bir etkiye neden olmaması için biyouyumluluğunun, insanlar üzerinde kullanımından önce, detaylı olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Günümüzde bu değerlendirme yapılırken in vitro ve in vivo testlerden faydalanılmaktadır. Vücut dışında başlatılan test çalışmalarında istenilen sonuçlar elde edildiğinde vücut içerisinde testler yapılır. Klinik denemelerle ve yapılan test sonuçlarıyla malzemenin biyouyumluluğu ve performansı tespit edilir. Bunun için malzemenin kullanıldığı alandan doku örnekleri alınarak morfolojik incelemesi yapılır [82]. Biyouyumluluk için yapılan bir çok test vardır. Ancak bu testler arasından yapılacak uygulamaya göre en uygun test seçiminin yapılması anlamlı sonuç elde etmek ve gereksiz harcamalardan kurtulmak açısından oldukça önemlidir [83]. Bu kapsamda yapılan testleri en geniş kapsamda in vitro testler, in vivo (hayvan testleri) ve kullanım testleri olmak üzere üç grup altında toplanır. Bu testlerin avantajları ve dezavantajları aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir [82].

Çizelge 1.1. Biyouyumluluk testlerinin avantaj ve dezavantajları

Test	İn Vitro	Hayvan Testleri	Kullanım Testleri
Avantaj	Ucuz ve hızlı uygulama. Standartlaştırılabilir olması. Deney ortamının kontrollünün kolay olması. Değerlendirmenin geniş bir skalada yapılabilmesi.	Karmaşık sistemik etkileşimler belirlenebilir. İn vitro testlere göre daha gerçekçi ve daha geniş kapsamlıdır.	Seçilen ve kullanılan malzemenin dokularla olan ilişkisi belirlenebilir.
Dezavantaj	İn vivo ortamla olan ilişkisi net değildir.	Pahalıdır ve etik açıdan tartışmalıdır. Kontrolü ve sonuçların değerlendirilmesi zordur.	Çok pahalıdır ve uzun bir süreç gerektirir. Kontrolünün zor olmasının yanı sıra etik açıdan oldukça tartışmalıdır. Sonuçlarının değerlendirilmesi zordur.

1.5.1. İn Vitro Deneyler

Birincil ya da eleme testleri olarak da nitelendirebileceğimiz in vitro biyouyumluluk testlerinin amacı vücut dokularının üzerine veya içerisine yerleştirilen malzemelerin biyolojik reaksiyonlarının simülasyonunu yapmaktır. Bu testler, hayvan kullanım testlerinde (in vivo testler) veya klinik çalışmalarda sürprizlerle karşılaşma olasılığını azaltır ve yeni malzemeler geliştirmek için maliyet açısından uygun yollar sunar. İn vitro testler yapılmadan doğrudan hayvan testlerinin kullanılması çok zaman alıcı ve maliyetli olabilir [80]. Etik sorunlar, zaman kaybı ve maliyet nedeniyle hayvan tabanlı in vivo testlere alternatif olarak in vitro testler tercih edilirler [84]. İn vitro testlerin deneysel avantajları kontrol edilebilir olması, tekrarlanabilir olması, hızlı olması, nispeten basit ve ucuz olması şeklinde özetlenebilir [85]. İn vitro testlerin en büyük dezavantajı vücut dokusunun dışında elde edilen sonuçların yanıltıcı olabilmesidir. İn vitro ortamdan elde edilen sonuçlar, sağlam organizmaların dışında yapılmaları ve burada vücut içerisinde malzemeye yanıt oluşturabilecek bir çok sistemin mevcut olmayışından yanıltıcı sonuçlar verebilir [85]. Ancak in vitro ortamdaki hücre kültürleri, in vivo dokulara kıyasla genel olarak toksik maddelere karşı daha duyarlıdır. Bu nedenle in vitro olarak toksik sonuç veren bir malzeme in vivo kullanımda doku için toksik olmayabilir [86].

Ürünlerin biyouyumlulukları hakkında üreticiler tarafından yapılan bir çok iddia hücre kültürü çalışmalarından elde edilen verilere dayanmaktadır. İnsan veya hayvan dokularından izole edilen hücreler steril hücre plakaları içerisinde çeşitli tuzlar, amino asitler, tampon maddeleri, vitaminler, at veya dana serumu içeren besleyici sıvılarda süspanse edilerek büyütülür ve daha sonra bu testler için kullanılırlar [79, 82]. Hücre kültürü; çeşitli dokulardan izole edilen bu hücrelerin in vitro ortamda büyütülmesi ve çoğaltılması işlemlerine verilen isimdir. Hücre kültürü çalışmaları hayvan deneylerine göre daha kolay, hızlı ve tekrarlanabilir olmalarının yanı sıra deney hayvanı kullanımının ve maliyetin azaltılması için tercih edilebilecek önemli bir yöntemdir [87, 88]. Günümüzde temel olarak sürekli büyüyen hücreler (sürekli hücre hatları) kolay çoğaltılabilir olmaları, nispeten tutarlı ve sürekli olan davranışlarının iyi bilinmesi nedeniyle kullanılırlar. Bu amaç için fare fibroblastları (L-929, 3T3) ve insan epitel hücreleri (HeLa) sık sık kullanılır. Ancak hedef

dokulardan alınan diğer hücreler de direkt büyütülerek hücre kültürü çalışmalarında kullanılabilirler [79].

Sitotoksisite, makromoleküllerin sentezine engel olarak hücresel, fonksiyonel ve yapısal belirgin hasarlara neden olan moleküler seviyede oluşan olayları tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Hücresel bozulmaları tetikleyen sayısız yol olduğundan sitotoksisite sürecini karakterize etmek oldukça zordur [89]. Bunun için sitotoksisite testlerinden faydalanılır. Sitotoksisite testleri hücrelerde meydana gelen, hücrede yapısal veya fonksiyonel hasarlara neden olan basamakların varlığının tespit edilmesi ve ne ölçüde hasar oluşturduğunun saptanması temeline dayanır [78, 86]. Sitotoksisite testlerinde; tripan mavisi testi, nötral kırmızı ile boyama, tetrazolyum tuzları ile yapılan testler (MTT, XTT, MTS, WST), laktat dehidrogenaz (LDH) testi olmak üzere bir çok yöntem kullanılmaktadır. Kullanılan her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır ve sitotoksisite tespitinde genel olarak iki veya daha fazla yöntem birleştirilerek kullanılır [88].

1.5.1.1. Nötral Kırmızı Testi

Nötral kırmızı (3-amino-7-dimetil-2-metilfenazin hidroklorür) kültürdeki canlı hücrelerin belirlenmesinde kullanılmıştır [90]. Bu test, toksik maddelere maruz kalan kültür içerisinde canlı kalan ve zarar görmeyen hücrelerin sayısını belirlemek için kullanılır. Bu testin temeli suda çözünen boyanın canlı hücrelerin lizozomuna bağlanması esasına dayanır. Daha sonra hücrelerden ekstrakte edilen boya miktarının, direkt hücre sayımı yoluyla ve hücre popülasyonlarının protein tayinleri ile elde edilen hücre sayıları ile doğrusal olduğu gösterilmiştir [91], [92].

1.5.1.2. Tripan Mavisi Testi

Tripan mavisi, nötral kırmızının aksine canlı olmayan hücreleri etkileyen bir boyadır. Yani membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerde birikir. Kültür ortamına tripan mavisi eklendiğinde canlı hücreler boyayı almazlar ve küçük ışığı yansıtabilen, saydam yuvarlaklar halinde görünürlerken, ölü hücreler eklenen boyayı alarak büyük

ve şişmiş koyu mavilikler halinde görünürler. Burada canlı veya cansız her iki hücrenin sayısı ve oranı hemositometre yardımı ile belirlenebilir [86, 88].

1.5.1.3. LDH Testi

Komşu dokulara yayılma göstermeyen metabolik parametrelerin değişimi hücre canlılığının tespiti için kullanılabilir. Hücre yoğunluğunun fazla veya girdi çıktının çok olduğu sistemlerde hücre canlılığı hakkında bilgi elde etmek amacıyla geliştirilen bir yöntemdir. Bu yöntemde hücre membranının zarar görmesiyle, zarar gören hücrelerden hızla dışarı yayılan ve yöntem ismini veren LDH enziminin analizi ile kültürdeki değişimler tespit edilebilir. Kolorimetrik sitotoksite değerlendirme yöntemidir. Kısaca hücrelerin membran bütünlüğü ölçülür ve membranda meydana gelen hasar değerlendirilir [78, 88, 90-93].

1.5.1.4. MTT Testi

MTT testi sitotoksite değerlendirmelerinde oldukça sık kullanılan, metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı kantitatif, hassas ve enzimatik bir testtir [94, 95]. Biyouyumluluk testleri arasında hassas olması ve hızlı sonuç vermesinden dolayı en güvenilir testlerden biri olarak kabul edilmektedir [93, 96]. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) suda çözünen bir tetrazolyum tuzudur. Başlangıçta sarımtırak bir çözelti halinde olan MTT yapısındaki tetrazolyum halkasının süksinat dehidrojenaz enzimlerince parçalanması sonucu koyu mor renkli ve çözünmez formdaki formazana dönüşür. Bu dönüşüm metabolik aktivitesi olan yani canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile gerçekleştiğinden bu test sadece canlı hücreleri saptar. Çözünmez formdaki formazan kristalleri çözücü yardımıyla çözünür duruma getirilir ve oluşan mor renk spektrofotometre yardımıyla 570 nm'de ölçülür [93-95, 97].

1.5.1.5. WST Testi

WST testinin çalışma prensibi MTT testinin çalışma prensibiyle benzerdir. Bu test de canlı hücrelerin süksinat tetrazolyum redüktaz enzimi tarafından bir tetrazolyum tuzu olan WST-1'in indirgenmesine ve bu indirgenme sonucu formazan kristalleri oluşturmaya dayanır. MTT'den farklı olarak burada oluşan formazan tuzları doğrudan suda çözünebilir formdadırlar ve çözünen kristallerin oluşturduğu renk sarı-turuncudur. Oluşan bu renk belirtilen dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Tetrazolyum tuzlarına ait testler kıyaslandığında daha hassas olması, daha verimli tüketilmesi ve daha hızlı renk değişimi göstermesi açısından en iyi alternatif WST-1 gibi görünmektedir [98, 99].

1.5.1.6. İkili Boyama Testi

Sitotoksikite testlerinde kullanılan bir başka yöntem de Hoechst ve Propidium iyodürün (PI) birlikte kullanıldığı ikili boyama testleridir. Bu yöntem ile materyal üzerindeki hücrelerin apoptoz veya nekroza uğrayıp uğramadığı gözlemlenebilir. İmplantasyon için kullanılan malzemenin sitotoksik bir etki göstermesi durumunda kullanıldığı yerde hücre büyümesini ve çoğalmasını engelleyerek apoptozise veya nekroza yol açabilir. Apoptoz Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında kendine özgü morfolojik görüntüsü bulunan hücre ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır [100, 101]. Kelime anlamı olarak ağaç yapraklarının dökülmesi anlamına gelen apoptoz anormalleşmiş veya ihtiyaç duyulmayan hücrelerin ortadan kaldırılması için gelişen kontrollü hücre ölüm şeklidir. Hücre membranının tomurcuklanması, hücre büzüşmesi ve kromatin yoğunlaşması morfolojik olarak apoptoz göstergesidir [102]. Hücreler apoptoza girdikten sonra parçalanarak makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Apoptoz programlı hücre ölümüdür, fizyolojik süreçlerdeki ve normal hücre döngüsündeki rolleri ile doku homeostazisini sağlar [103]. Nekroz ise patolojik bir nedenden dolayı sitoplazmik şişme sonrası hücre membranının bozularak, hücresel içeriğin ekstrasellüler alana dağılması ile meydana gelen kontrolsüz hücre ölümüdür [102, 103]. Apoptoza neden olan malzemeler, nekroz oluşumuna neden olan malzemelere kıyasla dokuda daha hafif bir iltihaplanmaya neden olur. Nekroza neden olan malzemede şiddetli doku reaksiyonları ile karşılaşılabilir [100, 104].

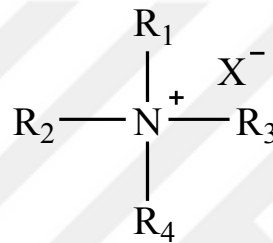
Hoechst 33342 boyası, mavi floresan bir boyadır ve canlı hücreler ile apoptoza uğramış hücrelerin çekirdeklerini maviye boyar. Maviye boyadığı bu iki tür hücrelerin ayrımı parlaklıklarına göre yapılabilir. Hoechst, apoptoza uğramış olan hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşan kromatin bölgelerini boyayarak bu hücrelerin canlı hücrelere kıyasla daha parlak mavi-mor görünmesine neden olur [105, 106]. Boya DNA'ya bağlanmışsa emisyon dalga boyu 461 nm, eksitasyon dalga boyu ise 350 nm'dir [107, 108]. PI plazma membranına tamamen giremeyen bir boyadır yalnızca hasar gören hücrelerin membranından girerek nükleik asidi boyar ve floresan ışık altında kırmızı şekilde parlamalarını sağlar. Yani PI boyası ölü hücrelerin (nekrotik) nükleuslarını kırmızıya boyamaktadır [109, 110]. Boya DNA'ya bağlandığı durumda emisyon dalga boyu 617 nm, eksitasyon dalga boyu ise 535 nm'dir. Boyaların dalga boylarının farklı olması, boyanan hücrelerin floresan mikroskop altında kolaylıkla ayrımının yapılabilmesini sağlar [103, 108].

1.6. Antimikrobiyal Aktivite

Gözle göremediğimiz özellikle bakteriler ve virüsler gibi çeşitli mikroorganizmaların varlığı günlük yaşantımızda sağlık sektöründen gıda sektörüne kadar pek çok alanda karşılaşılan en ciddi problemlerden birisidir. Doğada hemen hemen her yerde bulunan ve besin, nem, sıcaklık gibi temel gereksinimler bir araya geldiğinde hızlı bir şekilde çoğalan bu mikroorganizmaları ortamdan yok etmek, çoğalma ve faaliyetlerini önlemek için çeşitli antimikrobiyal etkili maddeler farklı yöntemlerle birlikte kullanılmaktadırlar. Dezenfektan olarak da isimlendirilen bu maddeler kabul edilebilir sağlık standartlarının sağlanmasında mikrobiyal yükleri azaltarak ve patojenleri inaktive ederek önemli rol oynamaktadırlar [111]. Günümüzde, bakteri öldüren materyalleri hazırlamanın en yaygın ve en kolay yolu, onları antibiyotikler, gümüş iyonları, halojenler ve dördüncül amonyum bileşikleri (DAB) gibi antibakteriyel ajanlarla yüklemektir. Antimikrobiyal ajanların hücre içi iletimi in vitro şartlarda yüksek bakteri öldüren bir aktivite sergiler [112]. Bu tür sistemlerin etki mekanizması bu antimikrobiyal malzemelerin yavaş salımına dayanmaktadır [113]. Bu amaçla kullanılan dördüncül amonyum bileşikleri, 1930'lu yılların sonlarında ortaya atılan özellikle insan ve hayvan sağlığı tesislerinde, kozmetikte,

tarımda ve endüstride dezenfektan ve antiseptik formülasyonlarda kullanılan katyonik yüzey aktif maddelerdir [114, 115].

DAB terimi, genel olarak karşılıklı birer hidrofobik ve hidrofilik alkil zincirden oluşan lineer alkil amonyum bileşiklerinin alt grubunu belirtmektedir [116]. Şekil 1.6' da temel yapısı görülen dördüncül amonyum bileşiklerinde R1-R4 alkil ya da heterosiklik grupları, X ise klorür, iyodür ya da bromürü göstermektedir [117, 118]. DAB arasında en çok kullanılanları alkil piridinyumlar ve DAB'ne dönüştürülmüş poli (2-(dimetilamino) etil metakrilat), dördüncül fosfonyumlar, ve N-kloraminlerdir [119].



Şekil 1.6. Dördüncül amonyum bileşiğinin temel gösterimi

DAB geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahiplerdir. Çok düşük derişimlerde bile çeşitli bakteri, mantar ve virüslere karşı etkilidirler [111, 120]. DAB biyosit olarak yaygın şekilde kullanılmaktadırlar ve çeşitli yüzeylerde antimikrobiyal kaplamalar olarak başarılı bir şekilde uygulanabilirler [117, 118]. DAB immobilize edilmiş haldeyken bile (yeterince hidrofobik kuyruklara sahiplerse) bakteriyal hücrelerin membranıyla etkileşip bakteri membranını bozarak antimikrobiyal özellik gösterebilirler. DAB'lardan özellikle 12-18 karbonlu olanları yaygın bir şekilde dezenfektan olarak kullanılmaktadırlar. Azot atomlarında pozitif bir yük taşıyan bu bileşikler mikroplar üzerinde hücre yapısını bozmak, hücre zarlarına zarar vermek ve proteinlerin doğasını değiştirmek gibi çeşitli etkilere sahiplerdir [121]. Antimikrobiyal etki, DAB'ın pozitif yüklü dördüncül azotu ile bakteri membranlarındaki asidik fosfolipidlerin negatif yüklü baş grupları arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkar [118, 122]. Bakteri hücreleri DAB immobilize edilen bir yüzeye temas ettiğinde uzun hidrofobik zincirler tarafından membranları parçalanır [113]. DAB antimikrobiyal etkisi membran parçalanmasına ek olarak

yapısal proteinlerin ve enzimlerin paçalanmasını ve denatürasyonunu da içerebilir. Özetle DAB antimikrobiyal aktivitesi hücre membranları ile etkileşim, zar bütünlüğünün bozulması ve hücre içi içeriğin sızması esasına dayanır [118]. Bakteri hücrelerinin etkisizleştirilmesi sırasında, dördüncül amonyum grubu bütün olarak kalır ve ortamda bulunduğu sürece antimikrobiyal özelliklerini korurlar [121].

Hem patojenik hem de çevresel mikroorganizmaları etkili bir şekilde kontrol edebilen, ancak insan vücudu veya çevre üzerinde zararlı etkiler göstermeyen üstün bir DAB arayışında antimikrobiyal DAB'lerin geliştirilmesine devam edilmektedir [123].

1.7. Nanoliflerin Kullanım Alanları ve Kullanılan Polimerler

Nanolifler sahip oldukları yüksek hacim/yüzey oranı, yüksek gözeneklilik, geliştirilmiş ve geliştirilebilir fiziko-mekanik özellikler nedeniyle oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptirler [43]. Özellikle biyouyumlu ve biyobozunabilir polimerlerden elde edilen nanolifler biyomedikal alanda önem kazanmışlardır [124]. Elektro döndürme tekniği ile elde edilen nanolifler biyomedikal uygulamalarda, doku mühendisliğinde yapı iskelesi olarak, yara iyileşmesinde, filtrasyonda, ilaç salımında, enzim immobilizasyonunda, küçük çaplı damar yamalarında, çevre mühendisliğinde, savunma ve güvenlik alanlarında, enerji üretimi ve depolanması gibi birçok farklı alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar [43].

1.7.1. Biyomedikal Uygulamaları

Doku mühendisliği, çeşitli biyolojik yapıları elde etmek amacıyla biyoloji, tıp, malzeme ve mühendislik bilimlerini kapsayan çok disiplinli bir alan olarak ortaya çıkmıştır [125]. 1993 yılında Langer ve Vacanti tarafından yapılan tanıma göre *“doku mühendisliği, dokuların çalışmalarını iyileştirmek, düzeltmek, eski haline getirmek için mühendislik ve fen bilimleri [tıp, biyoloji, malzeme vs.] prensiplerinin uygulanarak biyolojik alternatifler geliştirmeye çalışan disiplinler arası bir bilim dalıdır.”* [58]. Doku mühendisliği yaralanma veya çeşitli hasarlar sonucu ortaya çıkan doku ve organ yetmezliği, hasarı, kaybı gibi geniş bir alanda alternatif çözüm

olarak gelecek vaat eden bir potansiyele sahiptir [126]. Doku mühendisliği ile elde edilmek istenen yapılar doğal dokuların yapısal, fiziksel ve topografik özelliklerini içeren fizyolojik ortamı iyi bir şekilde taklit etmelidir. Hücrelerin elde edilen yapılara tutunması ve çoğalması yüzeyin fizikokimyasal özelliklerinden yani kimyasal bileşiminden, yüzey enerjisinden, polarizasyonundan, pürüzlülüğünden ve mekanik özelliklerinden direkt olarak etkilenmektedir [124, 125]. Doku mühendisliğinde "iskele" olarak adlandırılan içerisine canlı hücrelerin de eklenebildiği biyouyumlu yapılar ile hasarlı dokuların yenilenmesi amaçlanmıştır [127]. Bu yapılar üzerinde hastadan gelen izole edilmiş, sağlıklı hücreler ex vivo olarak büyütülüp hasta vücudundaki yaralı bölgeye implante edilebileceği gibi doğrudan yaralı alana yerleştirilerek doku oluşumunu uyarması için de kullanılabilir [60]. Literatürde doku iskelesi üretimi için çeşitli metotlar bulunmaktadır. Ancak son zamanlarda nanolif sistemleri doku mühendisliği için iskele hazırlanmasında hedef olarak seçilmişlerdir. Doku yenilenmesi için biyouyumlu ve biyobozunur nanolif yapıları iskeleler kendilerine özgü doğası, ECM'i taklit etme yetenekleri nedeniyle geleneksel iskelelere göre tercih edilir ve bu yüzden doku mühendisliğinde elektro döndürme yöntemiyle elde edilen nanoliflerin kullanımı her geçen gün artmaktadır [63]. Doku mühendisliğinde elektro döndürme yöntemiyle elde edilen nanoliflerin kullanımı; malzeme seçimi, lif yönlendirmesi, yüzey modifikasyonu, gözeneklilik, doku uygulamaları gibi hususlar içermektedir. Bunlar içinden malzeme seçimi nanolif iskele üretiminde kritik önem taşımaktadır. Malzemenin hücrelerle etkileşimi çeşitli doku tepkileriyle sonuçlanır. Bu nedenle biyolojik çevreye uygunluklarına bağlı olarak kullanılacak malzeme doğal, sentetik veya her ikisinin karışımı halinde, istenen mekanik ve biyolojik özellikleri sağlayacak şekilde seçilebilir [128]. Malzeme seçiminin yanı sıra nanolif doku iskelesinin hücrelerle olan biyouyumluluğunu arttırmak için insülin, kolajen, fibronektin, epidermal büyüme faktörü, beyin kaynaklı nörotrofik faktör gibi spesifik proteinler veya kemik morfogenetik protein gibi maddeler kullanılır [129]. İdeal malzemenin sadece biyouyumlu ve biyobozunur olması yeterli değildir. Bu iki özelliğin yanında toksik olmamalı, orta düzeyde hidrofilitiklik göstermeli ve yeterli dayanıma da sahip olması gerekmektedir. Bu güne kadar farklı pek çok polimer, yalnız başlarına veya karışımlar halinde nanolif eldesi için kullanılmışlardır. Doğal polimerlerin uygun biyolojik özelliklerini ve sentetik polimerlerin mekanik dayanımlarını bir arada bulunduran, belirli oranlarda doğal ve sentetik polimerlerden oluşan kompozit nanolifler gelişmekte olan yeni iskele

yapılarının sınıfını temsil etmektedirler. Kompozit nanoliflerdeki maddelerin dikkatli seçimiyle nanolif iskelelerin doğasındaki sınırlamalar iyileştirilebilir [124].

Biyobozunur iskeleler canlı doku mühendisliği için vazgeçilmez bir unsur olarak kabul edilirler ve hücre ekimi, çoğalması, farklılaşması için dokunun veya doğal ECM biyolojik fonksiyonunu yenilemesine öncülük eden geçici kalıplar olarak kullanılırlar. Buradaki en büyük zorluk insan vücudundaki hasarlı doku veya organın tedavisi için hazırlanan iskele yapısının ECM'ye ait biyolojik fonksiyonları iyi bir şekilde taklit etmesini sağlayabilmektir[43, 58]. Nanolifler kullanılarak oluşturulan doku iskeleleri hücrel davranışı taklit etmek için ECM'ye benzer mekanik ve biyolojik özelliklere sahiptir [58]. Doğal ECM yapısı 10-300 nm arasında değişen nanofibröz mimari yapı ile karakterizedir ve elektro döndürme tekniği ile elde edilen nanoliflerin çapı, ECM içindeki fibrillerle benzer büyüklüktedir. Böylece doğal doku ortamını taklit edebilirler ve hücre büyümesi için bir alt tabaka olarak kullanılabilirler [43, 130]. Doku mühendisliğindeki derinlemesine yapılan çalışmalar hücreler ile nanolifli malzemelerden oluşan ECM'nin in vivo bir etkileşim halinde olduğunu ortaya koymuştur. Böylece kullanılan iskele hücrelere sadece mekanik destek sağlamakla kalmayıp aynı zamanda hücrelerin davranışları üzerinde de önemli bir rol oynar, hücre-hücre ve hücre-malzeme etkileşimini teşvik eder [131]. Nanolifler sahip oldukları yüksek yüzey/hacim oranı ile hem çok sayıda hücre eklenmesine hem de büyüme faktörleri gibi çeşitli yardımcı proteinlerin eklenmesine olanak sağlarlar [132].

İnsan hücreleri kendilerinden daha küçük çaplara sahip olan nanolifler etrafına ekilebilir ve organize edilebilir böylece nano ölçekli lifli doku iskeleleri hücrelerin ekilmesi, çoğalması ve göçü için uygun bir alan sağlayabilir [48]. Nanolif doku iskelelerinin üzerine ekilen hücrelerin yüzeye yapışma genişlikleri ve dayanımları, hücre davranışlarını yöneten hücre apoptozu ve hayatta kalma olgusu ile hücre çoğalması ve farklılaşması arasındaki geçişle ilgilidir. Yüzeyin hidrofiliği de hücrelerin yüzeye tutunmasını doğrudan etkileyen bir diğer faktördür [124]. Genellikle yüksek hidrofilik bir yüzey alanı hücrelerin tutunmasını azaltırken düşük hidrofilik alan büyümeyi ve tutunmayı teşvik eder [133].

Genel anlamda iskele yüzeyindeki hücre davranışları yönlendirmeye ve nanolif yüzeyindeki nano ölçekli düzensizliklerin boyut ve şekli ile kontrol edilebilir [124]. Lif yönlendirmesiyle düzenli veya dağınık lif dağılımları sağlanabilir. Gözeneklilik ve gözenek çapları kontrol ve optimize edilebilir [128]. Nanolif iskelelerdeki liflerin yönlenmesi yapışmayı, yayılmayı, şekli ve çeşitli hücre tiplerinin hücre iskeleti organizasyonunu düzenler [134, 135]. Örneğin, paralel olacak şekilde düzenlenmiş nano yüzey üzerinde büyüyen hücreler liflerin doğrultusunda yönelmiş iğ şeklindedirler ve aktin filamentleri de hücrelerin uzun eksenine paralel olacak şekilde gelişir. Bu şekilde yönlendirilerek gelişen hücreler spesifik bir iletimi teşvik ederek mekanik ve biyokimyasal sinyallerin hücre çekirdeğini, aktinin yeniden düzenlenmesi, hücre çoğalması ve büyümesiyle sonuçlanan spesifik genin sentezlenmesi için uyarmıştır[124].

Elektro döndürme yöntemiyle elde edilen doku iskelelerinin hücrelerin tutunması, çoğalması ve yenilenmesi açısından sağlamış olduğu üstün özellikler sayesinde yara örtüsü olarak kullanılmaları oldukça uygundur. Vücudun en büyük ve en dıştaki dokusu olan deri vücudu dış saldırılardan korumak, ısı kaybını önlemek, vücutta su tutunmasını düzenlemek gibi çok farklı ve önemli fonksiyonlara sahiptir [136]. Deri doku bütünlüğünün sağlanması ve vücudun mikroorganizma istilasından korunması için büyük öneme sahiptir. Bu nedenle hasar gören cilt dokusunun hızlı bir şekilde onarılması gerekir [1]. Herhangi bir şekilde hasar gören derinin iyileşmesi karmaşık bir süreçtir. Bu süreç doğal ECM molekülleri ile arabulucuların karmaşık doku etkileşimlerinden oluşur. Kısaca yara iyileşmesi dermal ve epidermal doku yenileyici bir süreçtir [136]. Yaranın iyileşmesi için oksijen ve neme ihtiyaç vardır. Yaralı bölgenin kendini kısa sürede onarabilmesi için çevresel faktörlerden ve bakteri, virüs gibi mikroorganizmalardan korunması gerekir. Hasarlı dokunun iyileşmesi ve iyileşmesi için gereken sürenin kısalması için yara örtüsü olarak isimlendirilen yapılardan faydalanılır. Yara örtüleri yarayı çevresel tehditlerden, çeşitli mikroorganizmaların temasından korumanın yanı sıra yara bölgesinden fazla vücut sıvılarının dışarı atımını sağlayan, nem ve oksijenin geçmesine olanak sağlayan fiziksel bir bariyerdur [136]. Yara örtüleri birisi yoğun ve bakteri penetrasyonunu engelleyen kalın bir yapıdan ve diğeri yaranın kendi salgılarını emen ve yeni dokuya yer temin eden iki yapıdan oluşur [137]. Yara iyileşmesi çeşitli biyokimyasal basamaklardan oluşan karışık bir süreçtir [132]. Bu süreç çeşitli fazlar altında

gruplandırılmıştır. Bu süreç iltihaplanma, çoğalma, yeniden şekillenme ve epitel oluşumu fazlarından oluşmaktadır [136]. Vücut normalde derin dermal yaralanmalarda iyileşemez örneğin derin yanıklarda ve ülserlerde yara kenarları hariç geriye kalan sağlam hücrelerin rejenerasyon için kaynakları yoktur. Sonuç olarak epitel oluşumunun tamamlanması uzun zaman alır ve karmaşıktır [138]. Nasıl sınıflandırılmış olursa olsun önemli olan yara örtülerinin bu fazlar için gerekli koşulları sağlayabilmesidir. Nanoliflerin yara örtüsü alanındaki kullanımları hızla gelişmektedir. Yara örtüsü olarak kullanılacak olan nanoliflerin antiviral, bakteriyostatik, antifungal, kan durdurucu etkiye sahip olmasının yanı sıra biyouyumlu, alerjik olmayan, emiciliği yüksek, hava ve nem akışına izin veren ve yeterli mekanik mukavemete sahip olmaları istenir [139]. Elektro döndürme aşamasında hasta ihtiyaçlarına, yara karakteristiğine ve iyileşmeye göre antiviral, antikanser, antienflamatuvar ve antioksidan gibi çeşitli ilaçlar eklenebilir [139]. Nanolif içerisinde elektro döndürme aşamasında çeşitli ilaçların katılabilmesi imkanının yanında nanoliflerden elde edilen yara örtülerinin yüzeyleri jelatin, kolajen ve epidermal büyüme faktörleri ile modifiye edilebilir. Böylece yeni doku oluşumunun oluşmasına yardımcı olunur [140].

1.7.2. Kullanılan Polimerler

Elektro döndürme yöntemiyle nanolif eldesinde sentetik ve doğal birçok polimer kullanılmaktadır. Hazırlanan çözelti sadece sentetik veya sadece doğal polimerlerden oluşabileceği gibi kompozit proteinlerin [141, 142], nükleik asitlerin [143] ve hatta polisakkaritlerin [144, 145] karışımlarından da hazırlanabilir. Yıllar boyunca 200'den fazla polimer başarılı bir şekilde elektro döndürme yöntemiyle nanolif eldesinde kullanılmıştır [146]. Elektro döndürme yönteminde kullanılan çeşitli doğal ve sentetik polimerler ve muhtemel kullanım alanları aşağıdaki tabloda verilmiştir. Elde edilecek nanolifin kullanım alanına ve kullanım amacına göre polimer seçimi yapılır. Sentetik polimerler kolay elde edilebilir olmaları, düşük maliyetli olmaları, iyi mekanik özelliklere sahip olmaları (viskoelastisite, dayanım vb...) ve farklı fonksiyonel özelliklere sahip olmaları nedeniyle nanolif elde etmek için kullanılmaktadırlar. Özellikle kopolimer kullanımı arzu edilen fonksiyonlara sahip nanoliflerin elde edilmesi için uygun bir düzendir. Düzgün bir şekilde

uygulama yapıldığında homopolimerlerden elde edilen nanoliflere kıyasla kopolimerlere dayanan nanoliflerin performansı önemli ölçüde arttırılabilmektedir [147]. Nanolif üretmek için kullanılan sentetik polimerlere poli(glikolik asit), poli(vinil asetat), poli(D,L-laktik asit), polikaprolakton ve polietilen oksit örnek olarak verilebilir [148]. Sentetik polimerlerin sunmuş olduğu pek çok üstün özelliğe rağmen biyobozunurluk, biyouyumluluk gibi gereksinimleri karşılayamadıkları için doğal polimer üzerine yapılan çalışmalar gün geçtikçe artış göstermektedir. Doğal polimerler üzerine yapılan çalışmaların artmasına neden olan başlıca özellikler toksik olmamaları, biyobozunur olmaları, yenilebilir ve hidrofilik olmaları şeklinde sıralanabilir [149]. Ancak pek çok doğal polimerden nanolif elde edilmesinin zor ve sentetik polimerlere kıyasla maliyetlerinin yüksek olmasından dolayı kullanım alanları sınırlı kalmaktadır [150]. Proteinlerden jelatin, zein, yumurta albümini, yumurta kabuğu proteinleri, enzimler, serum albümini, kolajen; polisakkaritlerden dekstran, selüloz, selüloz türevleri, aljinat, kitosan ve diğer doğal bileşenlerden DNA, fosfolipidler elektro döndürme yönteminde kullanılan doğal polimerlere örnek olarak verilebilirler [148].

Çizelge 1.2. Elektro döndürme yöntemiyle nanolif eldesinde kullanılan bazı polimerler ve kullanım alanları

Aljinat	Hücre kültürü çalışmaları, doku mühendisliği	[151, 152]
Kitosan	Hücre kültürü çalışmaları, doku mühendisliği	[124, 151, 153]
Fibrinojen	Doku mühendisliği, yara sargısı	[142, 154, 155]
Hyaluronik asit	Yara sargısı	[124]
Elastin	Damar doku mühendisliği	[156]
Selüloz	Kemik ve tendon doku mühendisliği	[157]
Laminin	Sinir doku mühendisliği	[158]
Jelatin	Yara sargısı ve ilaç taşıma sistemleri	[159]
Kollojen	Doku iskelesi, hücre kültürü çalışmaları ve doku mühendisliği	[124, 151, 160, 161]
İpek	Doku mühendisliği	[162, 163]
Polietilenoksit	Mikroelektronik bağlantı	[164, 165]
Poli(vinil fenol)	Antimikrobiyal ajan, ilaç sistemleri, yara örtüsü	[166-168]
Polikaprolakton	Hücre kültürü çalışmaları, doku mühendisliği	[151, 153, 169, 170]
Poli(D,L-laktik asit-ko-glikolikasit) ve kompozitleri	Hücre kültürü çalışmaları, Doku iskelesi	[151, 169]
Poli(glikonik asit)	Doku mühendisliği	[171, 172]
Poli(laktik asit)	Biyomedikal uygulamalar için membran, sensör, filtre ve ilaç salım sistemi, damar doku mühendisliği çalışmaları	[170, 173, 174]
Poli(etilen-ko-vinil asetat)	İlaç salım sistemi	[175]
Selüloz asetat	Membran	[176]

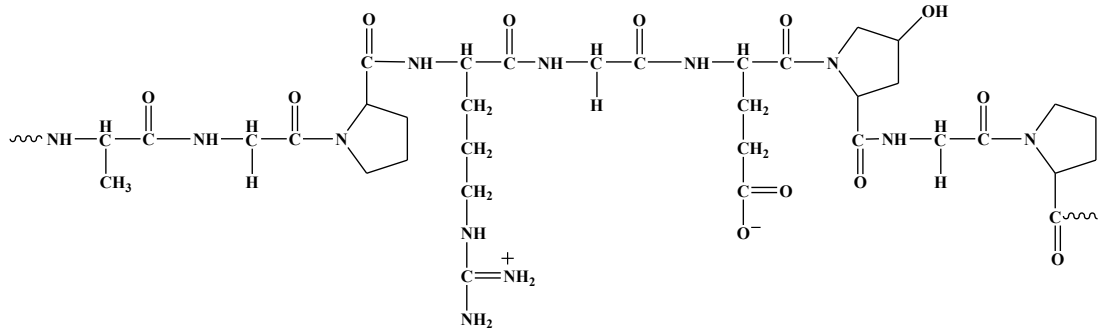
Çizelge 1.2. Devam Elektro döndürme yöntemiyle nanolif eldesinde kullanılan bazı polimerler ve kullanım alanları

Poli(etilen-ko-vinil alkol)	Biyomedikal uygulamalar	[177]
Polistiren	Enzimatik biyotransformasyon,	[178]
Poliamit	Cam elyaf (filtre maddesi)	[179]
Poliüretan	Koruyucu giyisi, damar grefti	[48, 151, 180]
Polibenzimidazol	Koruyucu giyisi	[48, 181]
Polikarbonat	Sensör, filtre	[180]
Poliakrilonitril	Karbon nanolif	[164, 182]
Poli(vinilkarbazol)	Sensör, filtre	[183]
Poli(akrilik asit) poli(pirent metanol)	Optik sensör	[164]
Polianilin /Poli(etilenoksit) karışımı	İletken lif	[184, 185]
Poliakrilonitril / TiO ₂	Fotovoltaik ve iletken polimerler	[173]
Poli(L-laktik asit) ve kompozitleri	Hücre kültürü çalışmaları, damar doku mühendisliği	[151, 186]
Kolajen-Polietilenoksit	Yara iyileşmesi, doku mühendisliği, hemostatik ajanlar	[187, 188]
Fibronektin ile fonksiyonlaştırılmış ipek benzeri polimer	Biyomedikal uygulamalar, implante edilebilir cihazlar	[189]
İpek/Poli(etilen oksit) blend	Biyomalzeme iskeleleri	[190]

1.8. Çalışmada kullanılan temel kimyasal maddeler

1.8.1. Jelatin

Jelatin, kolajen proteininin kısmi asit veya alkalın hidrolizi ile veya termal ve enzimatik bozunması ile elde edilir. Kolajen, tüm omurgalı vücut proteinlerinin % 30'unu ifade eder. Kemikler ve tendondaki hücre dışı proteinlerin %90'ından fazlası ve derideki proteinlerin %50'den fazlası kolajenden oluşur [191-193]. Kolajenler, ECM'de ve hücre-ECM ara yüzünde oluşan üçlü sarmal proteinlerdir. Bu üçlü sarmal diye adlandırılan yapı birbirlerine sarılı üçlü alfa zincirlerinden (polipeptit alt birimlerinden) oluşmaktadır [194]. Kolajen hidroliz yöntemine bağlı olarak iki farklı ticari jelatin türü (A ve B tipi) mevcuttur. Kolajenin asit hidrolizine tabi tutulmasıyla A tipi jelatin (izoelektrik noktası 6-8) elde edilirken, kolajenin bazik veya alkali hidrolizine tabi tutulmasıyla B tipi jelatin (izoelektrik nokta 4,7-5,3) elde edilir [192, 195, 196]. Kolajen yüksek sıcaklıkta, seyreltik asitle veya bazla muamele edilir. Bu aşamada kolajendeki hidrojen bağları koparak polipeptit zincirlerinin birbirinden ayrılmasıyla jelatin elde edilir [197]. Karakteristik olarak yapısında yüksek oranda glisin, pirolin ve hidroksiprolin aminoasitlerini içeren jelatini üretmek çok ucuz ve kolaydır [198]. Yapısındaki üçlü sarmal yapı bu aminoasitlerden oluşmaktadır ve jelleşme özelliği kazanmasında bu yapı oldukça etkilidir [199]. Jelatinin yüksek stabilitesi yine bu benzersiz üçlü sarmal yapıdan kaynaklanmaktadır [192]. Jelatin, genellikle soluk sarı renkli ya da renksizdir. Şekil olarak şeffaf yaprak, toz veya granül halde bulunabilirler. Saf soğuk suda çözünmeyip sadece nem kaparak şişerler. Sıcak suda çözünen jelatinler sıcaklık 40°C'nin üstüne çıktığında tersinir jel oluşturma özelliğine sahip oldukları için çözelti haline geçerler. Böylece jelatin çözeltisi tekrar soğutulduğunda yine jelleşme meydana gelir [195] Jelatin kimyasal yapısı Şekil 1.7'de gösterilmiştir [192].



Şekil 1.7. Jelatinin kimyasal yapısı

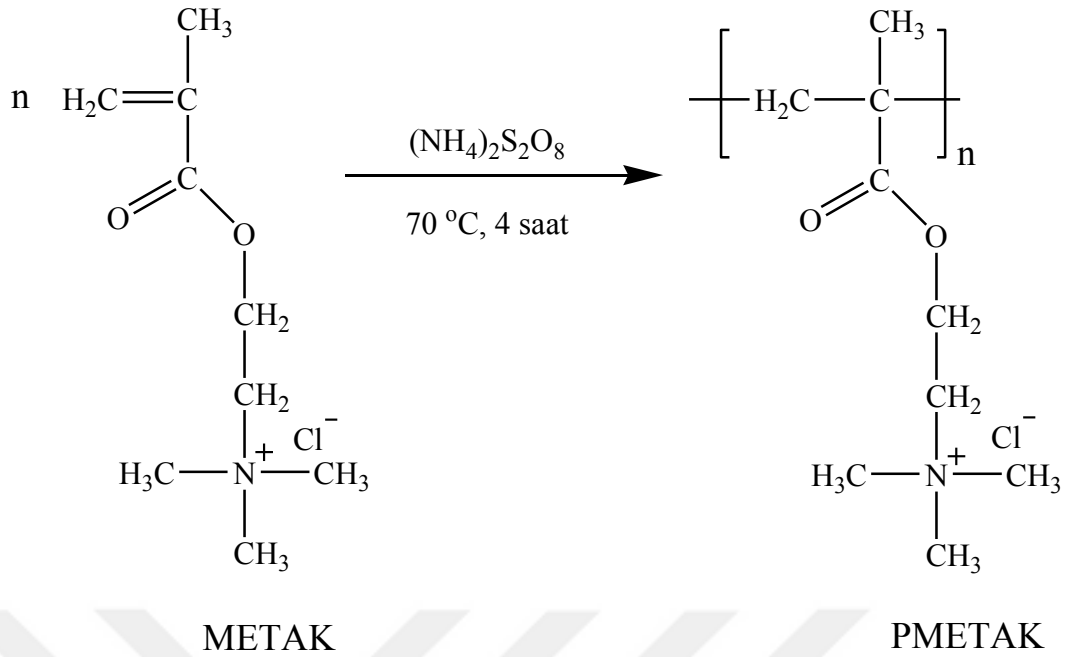
Jelatin biyobozunur olmasının yanısıra toksik ve tahriş edici olmayan son derece biyoyumlu bir polimerdir. İmmunojenik değildir ve antijenik özellik taşımaz [200]. Jelatin, gıda endüstrisinden, tıpa ve farmasötik işletmelere kadar oldukça geniş bir alanda kullanılmaktadır. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta, ilaç salım sistemlerinde özellikle kolay jelleşme yeteneğine sahip olduğundan akıllı hidrojel üretimi için ilgi çekici bir temel malzemedir ve hidrojel hazırlanmasında çok yaygın kullanılır [191, 200]. Bu alanlarda jelatin kullanımına olan ilginin artması, biyoyumluluk, biyolojik parçalanabilirlik ve düşük maliyet gibi çeşitli istenen özelliklerden kaynaklanmaktadır [19, 191, 192, 201]. Biyomalzeme olarak kullanılan jelatin pek çok avantaj sağlamaktadır. Ancak düşük mekanik özelliği kullanım alanını kısıtlamaktadır. Yapısında bulundurduğu fonksiyonel gruplar kolaylıkla modifiye edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu sayede mekanik özelliklerinde iyileştirme yapılabilmektedir. Jelatinin çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlerle çapraz bağlanmasıyla termal ve mekanik kararlılığı artırılabilir. Fiziksel yöntemlerle çapraz bağlamak için ultraviyole ve gama ışınlanması kullanılırken kimyasal olarak çapraz bağlamak için bifonksiyonel ajanlar olarak bilinen diizosiyanat, gluteraldehit, karbodiimidler, poliepoksi bileşikler kullanılabılır [195, 198].

1.8.2. [2-(Metakriloiloksi)etil]trimetilamonyum klorür (METAK)

[2-(Metakriloiloksi)etil]trimetilamonyum klorür (METAK), yükü çevresel pH değerine bağlı olmayan, güçlü katyonik bir monomerdur [202-204]. Bu monomerin polimerleşmesiyle oluşan Poli(2-[(metakriloiloksi) etil] trimetilamonyum klorür)

(PMETAK), her temel ünite de hem hidrofobik gruplar (metil grupları ve omurga zinciri) hem de hidrofilik pozitif yüklü tersiyer amin grupları içeren bir amfifilik katyonik polielektrolittir [205]. Suda çözünen ve zayıf çapraz bağlanmış katyonik polielektrolitler, çeşitli büyük ve küçük moleküllü polipeptitler oluşturabilme yetenekleri nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Suda çözünen, organik polielektrolit, çeşitli teknoloji dallarında işlemeyi veya uygulanabilirliği kolaylaştırmak veya iyileştirmek için "polimerik aktif maddeler" olarak kullanılır. Bu karmaşık oluşum reaksiyonları ile katyonik polielektrolitler, kağıt endüstrisinde, katı/sıvı ayırımı, kanalizasyon ve atık su arıtımı ve korunması gibi çeşitli endüstri dallarında başarılı bir şekilde kullanılabilir [206-208]. Bu bileşikler yüksek pH koşullarında sergiledikleri yüksek stabilite nedeniyle organik polimer esaslı monolitik kolonların farklı türleri arasında, metakrilat ester esaslı olarak en çok kullanılanlardır [209].

Günümüzde birçok alanda ve malzemelerin yüzeyde antimikrobiyal özelliğe ihtiyaç duyulmaktadır. Antibakteriyel ajanlar arasında DAB, iyi antibakteriyel özellikleri, düşük toksisitesi, cilt tahrişi olmaması, düşük toksik özelliği, cilt tahrişi olmaması, düşük korozyan özellikleri, çevreyle ilgili iyi çevre dayanıklılıkları ve mükemmel hücre zar geçirgenlik özellikleri nedeniyle en yaygın kullanılan ajanlardır [23]. Özellikle sağlık alanında antimikrobiyal özellik sağlarken yüzeyin ökaryotik hücrelerin ya da dokuların büyümesi ile uyumluyken (biyouyumlu) ve prokaryotik enfeksiyonun baskılanmasını sağlıyor olması istenir. Ancak bu kombinasyonun gerçekleştirilmesi zordur. Bu aşamada pozitif yüklü dördüncül amonyum bileşikleri bu kriterleri karşılayabilir [210]. Bu nedenle, bir dördüncül amonyum fonksiyonlu metakrilat polimeri olan ve antimikrobiyal olarak işlev görebilen METAK büyük önem taşımaktadır [211]. Sahip olduğu özellikler bu yeni katyonik monomerler üzerine yapılan araştırmalarda artan bir ilgi yaratmaktadır [208]. METAK monomerinin ve PMETAK'ın kimyasal yapısı ve sentezi Şekil 1.8 'de gösterilmiştir [212] .



Şekil 1.8. METAK ve PMETAK'ın kimyasal yapısı

1.9. Literatür Özeti

L. Pandolfi ve arkadaşları doku iyileşmesindeki önemli rolleri nedeniyle rejeneratif tıpta yoğun şekilde incelenen insan mezenkimal kök hücrelerinin tutunabilecekleri, çoğalabilecekleri ve köklerini koruyabilecekleri elektro döndürme yöntemi ile jelatin nanoliflerden üç boyutlu uygun bir ortam elde edilmesi üzerine çalışmışlardır. Elektro döndürme yöntemiyle üretilen üç boyutlu yapının mekanik özelliklerini belirlemek için gerilme ve basınç testleri yapılmış ve yapının morfolojik özellikleri SEM ile incelenmiştir. PBS içerisindeki parçalanması yine SEM kullanılarak görüntülenmiştir. Elde edilen nanolifli yapı doğrusal olmayan elastik malzeme özelliği sergilemiş ve bozunmaya karşı 4 hafta kadar dayanmıştır. Bu üç boyutlu nanolifli yapıdaki kültür ortamı iki boyutlu kültür ortamlarıyla kıyaslandığında hücrelerin benzer yoğunlukta çoğalma gösterdikleri ve öncü hücre özelliklerini daha iyi muhafaza ettikleri görülmüştür. Ayrıca yapılan immünohistokimyasal analizler sonucu 3 hafta boyunca yabancı cisim reaksiyon belirtisi görülmediği bildirilmiştir [213].

Khaow Tonsomboon ve arkadaşları jelatin ve aljinat kullanarak, elektro döndürme yönteminden faydalanarak yumuşak doku olan kolajen ECM'sinin mikro yapısını ve kompozisyonunu taklit edecek nanolif takviyeli hidrojel üretmişlerdir. Yapılan çalışmada jelatin ve aljinat aynı zamanda, tekli polimer hidrojel kontrolleri oluşturmak için fiber takviyesiz olarak da üretilmiştir. Çeşitli lif düzenlemeleri ve değişik açılarda yapılan lif yönlendirmeleri ile beş farklı hidrojel türü oluşturuldu. Elde edilen kompozit nanoliflerin ve tekli polimer hidrojellerin gerilme ve kırılma noktalarını belirlemek için mekanik testleri yapıldı. Yapılan mekanik testler sonucu nanolif takviyeli hidrojellerin farklı mekanik ve biyomedikal ihtiyaçları karşılayabilecek şekilde tekli polimer hidrojlardan daha güçlü ve sert olduğu bildirilmiştir [214].

O. Chaisiri ve arkadaşları polikaprolakton ve jelatin kullanarak elektro döndürme yöntemiyle cilt dokusunda kullanılmak üzere doku iskelesi elde etmişlerdir. Yapılan çalışmada polikaprolakton ve jelatin tetrafloroetanol çözücüsü içinde karıştırılmıştır. Bu karışımdan elektro döndürme işlemiyle doku iskelesi üretilmiştir. Hücre çoğalmasını destekleyen gözenek boyutunu geliştirmek üzere zemin yüzeyi, uygun dokunmuş lifli yapı eldesi için kauçuk kullanılarak modifiye edilmiştir. Jelatin liflerin bu kauçuklu yapı içerisinde jelleştirilmesi ile verimli zemin oluşturulmuştur. SEM ile yapılan morfolojik gözlem, zemin maddesi oluşumunun başarısını ve iskele yapısının lifleri arasındaki jel infiltrasyonunun oluştuğunu göstermiştir. %98-99 gözenekli ve 40-70 mikron gözenek boyutlarına sahip doku iskelesi elde edilmiştir. Bu doku iskelesi üzerinde insan fibroblast hücreleri kullanılarak yapılan sitotoksitesite test sonuçlarında hücrelerin %90'dan fazlasının canlı kaldığı gösterilmiştir. Ortam ile uzun süreli etkileşimin biyo parçalanmada önemli bir artışa neden olduğu bulunmuştur. Hücresel biyouyumluluk testleri için yine insan fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Sonuçlar üretilen doku iskelesi içerisinde bu hücrelerin çoğaldığını ve göç edebildiklerini gösterdi [215].

Yapılan bir başka çalışmada ise Masumeh Safdari ve arkadaşları çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan Cettazidime antibiyotikinin yapı ve biyoaktivite özellikleri bozulmadan kontrollü ilaç salımında kullanılmak üzere elektro döndürme yöntemi yardımıyla ipek/jelatinden oluşan nanoliflere yüklenebileceğini göstermişlerdir. Bombyx mori ipek kurdu kauçuklarının

işlenmesiyle elde edilen ipek ve jelatin uygun oranlarda formik asit içinde çözülerek ana çözelti elde edilmiş ve Cettazidime antibiyotiği bu çözeltiye ilave edilmiştir. Oluşturulan çözeltiden elektro döndürme yöntemi ile Cettazidime yüklü nanolifler üretmişlerdir. Üretilen bu ilaç ile yüklü ipek/jelatin nanoliflerinin morfolojik ve mekanik özellikleri FTIR, SEM ve DSC kullanılarak karakterize edilmiştir. Nanoliflerin ilaç salım profilleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak analiz edilmiş ve nano liflerin antibakteriyel etkisini değerlendirmek için difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Hücre canlılığının kontrolü MTT ile değerlendirilmiş olup uygunluğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda ilaç yüklü nanoliflerin *Pseudomonas aeruginosa* kültür ortamındaki antibakteriyel etkisi açıkça gösterilmiştir [216].

Kontrollü ilaç salınımı üzerine yapılan bir başka çalışmada ise Ahmed A. Nada ve arkadaşları hastalık yapıcı bir çok bakteriye karşı etkili Kloramfenikol isimli antibiyotiği elektro döndürme yöntemiyle elde ettikleri nanolifler içerisine yüklemişlerdir. Elde edilen nanoliflerin karakterizasyonu FTIR ve SEM kullanılarak yapılmıştır ve ilaç yüklü nanolifin PBS içerisindeki ilaç salınımı spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Yapılan çalışmada kullanılan çapraz bağlayıcı, ilaç, jelatin konsantrasyonlarının ve uygulanan voltaj, iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe gibi parametrelerin elektro döndürme işleminde elde edilen nanolifler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen yapıların MTT ile sitotoksitesine bakılmıştır ve yapılan antimikrobiyal testler sonucunda *Staphylococcus aureus* (gram pozitif) ve *Pseudomonas aeruginosa* (gram negatif bakteri) ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuçlar, numunelerin, kullanılan tüm patojen mikroorganizmalara karşı güçlü bir antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir [217].

Jianchao Zhan ve arkadaşları biyomedikal ve doku mühendisliği alanında sıkça kullanılan jelatin nanoliflerin mekanik özelliklerinin ve dayanımlarının artırılması için yapılan klasik çapraz bağlama yöntemleri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada standart glutaraldehit buharıyla yapılan çapraz bağlamada karşılaşılan homojen olmayan bağlanma ve çapraz bağlanma esnasında ortaya çıkan ve yüzey gözenekliliğinin azalmasına neden olan liflerin kaynaşması gibi sorunları indirmek amacıyla jelatin-glutaraldehit çözeltisi hazırlayarak doğrudan elektro döndürme yöntemi kullanarak nanolifler elde etmişlerdir. Elde ettikleri nanolifli yapının

morfolojik ve termal özelliği, gözenekliliği, nem emme ve nem tutma performansı, hidrolitik direnci, mekanik özellikleri ve biyouyumluluğu test ve karakterize edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde; nanoliflerin homojen çap dağılımına, %80 üzerinde gözenekli yapıya sahip oldukları ve jelatin nanoliflerle karşılaştırıldıklarında sahip oldukları hidrolitik direncin ve mekanik özelliklerin büyük ölçüde gelişmiş olduğunu göstermişlerdir [218].

Kaido Siimon ve arkadaşları ise çapraz bağlama ajanı olarak kullanılan glikoz miktarının jelatin nanoliflerinin mekanik özelliklerine etkisini araştırmışlardır. Bunun için jelatin nanolifler sulu asetik asitten elektro döndürme ile hazırlandı ve glikoz ile termal olarak çapraz bağlandı. Hazırlanan doku iskelesi FTIR, SEM kullanılarak karakterize edilmiştir. Glikoz ile çapraz bağlanan jelatin nanoliflerin elastik modülü kafeslerin davranış modellemesi yapılarak çekme testi ile belirlenmiştir. Glikoz ile çapraz bağlanan jelatin nanoliflerin elastik modülünün 0,3 GPa'dan 1,1 GPa'a arttığı bulunmuştur. Elastik modülündeki bu artış ile çapraz bağlama için glikoz kullanımının nanolifli yapıdaki jelatin doku iskelelerinin biyomedikal uygulamaları için umut verici olduğu bildirilmiştir [219].

P. Rujitanaroj ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gümüş iyonları yüklenen biyopolimerlerden elde edilen nanolif yara örtülerinin çeşitli bakterilere karşı etkin koruma sağladığı gösterilmiştir. Gümüş iyonları içeren jelatin çözeltisinden, yanık yaralarında yaygın olarak bulunan bazı bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip, ultra ince (~230~280 nm) nanoliflerden oluşan yara örtüsü elektro döndürme yöntemi ile elde edildi. Gümüş iyonları yüklenen jelatinlerden oluşan yara örtüsünün dayanaklılığını sağlamak ve sulu ortamlardaki kararlılığını arttırmak için gluteraldehit buharıyla çapraz bağlama yapılmıştır. Elde edilen yara örtüsünün antibakteriyel aktivitesi yapılan deneyler sonucu *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı büyük etki göstermiştir. Bu bakteriyi takiben sırasıyla *Escherichia coli*'ye ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı da antibakteriyel etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [12].

S. J. Lee ve arkadaşları da gümüş iyonlarının antibakteriyel özelliği üzerine bir çalışma yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada antibakteriyel özellikte yeni bir yara örtüsü tasarlamak için elektro döndürme yöntemini kullanmışlardır. Çeşitli oranlarda

gümüş nano partikülleri (AgNPs) içeren kitosan nanolifler elde etmişlerdir. AgNPs kimyasal indirgeme yöntemi kullanılarak doğrudan kitosan çözeltisi içerisine karıştırılarak oluşturmuşlardır. XRD, morötesi spektroskopi (UV) ve TGA ile AgNPs'nin oluşumu ve varlığı teyit edilmiştir. Kitosan/AgNPs nanoliflerinin morfolojisi ise SEM ve TEM kullanılarak karakterize edilmiştir. Daha sonra elde edilen nanoliflerin gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* ile gram pozitif ve metisiline(bir çeşit antibiyotik) dirençli *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel etkinliğini değerlendirilmiştir. Yapılan antibakteriyel test sonuçları kitosan/ AgNPs nanoliflerin yaraların tedavisinde etkili antibakteriyel yara örtüleri olabileceğini bildirilmiştir. [220].

R. Zhao ve arkadaşları ise doğal ve düşük maliyetli kitosan ve serisin biyomateryalleri ile çalışma yapmışlardır. Kullandıkları her iki biyomalzeme de insan dokusuyla iyi biyoyumluluğa sahiptir ve biyomedikal uygulamalar için de antibakteriyel özellik gösterir. Bu çalışmada kitosan/serisin kullanılarak elektro döndürme yöntemi ile başarılı bir şekilde kompozit nanolifler üretmiştir. Bu kompozit nanolifler SEM, FTIR, XRD ve TGA kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen kompozit nanoliflerin çapları 240-380nm arasında değiştiğini ve düzgün morfolojiye sahip olduklarını belirlemişlerdir. İn vitro MTT deneyleri kitosan/serisin nanoliflerinin biyoyumlu olduğunu ve hücre çoğalmasını teşvik edebileceğini gösterdi. Dahası bu kompozit nanolifler hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı yüksek antibakteriyel etki göstermişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucu kitosan/serisin kompozit nanoliflerin yara örtüsü uygulamalarında kullanılabileceği bildirilmiştir [9].

Bir başka çalışmada ise jelatin/glikozaminoglikan nanofibröz yapıları üretilerek incelendi ve elektro döndürme prosesinin optimizasyonu yüzey metodolojisi kullanılarak yapılmıştır. Optimizasyon kısmında jelatin/glikozaminoglikan karışım oranı, uygulanan voltaj ve besleme hızının ortalama lif çapına etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada jelatin/glikozaminoglikan çözeltisinin elektro döndürme yönteminde kullanılabilmesi için optimum koşullar belirlendi. Optimize edilen elektro döndürme yöntemiyle elde edilen nanoliflerinin cilt doku mühendisliği için potansiyel kullanımı insan dermal fibroblast hücreleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Nanofibröz yapı üzerindeki insan dermal fibroblast hücrelerinin

SEM görüntüleri, bu fibroblast hücrelerinin jelatin/glikozaminoglikan çözeltisinden imal edilen iskele yüzeyi üzerine yüksek tutunma, büyüme ve doldurma yaptığı bildirilmiştir [221].



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Jelatin (from porcine skin type A) (Sigma, Amerika)

[2-(Metakriloiloksi)etil]trimetilamonyum klorür, %75'lik sulu çözeltisi (Sigma, Amerika)

Amonyum Peroksi Disülfat (Merck, Almanya)

Bazik Alüminyum Oksit

Gluteraldehit (Merck, Almanya)

Asetik asit (Sigma, Amerika)

Aseton (Sigma, Amerika)

Formik Asit (Carlo Erba)

Alüminyum Folyo (Horeca 12 µm)

Sodyum Klorür (Sigma, Amerika)

Potasyum Klorür (Merck, Almanya)

Disodyumhidrojenfosfat (Merck, Almanya)

Potasyumdihidrojenfosfat (Merck, Almanya)

Staphylococcus aureus (Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi)

Escherichia coli (Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi)

Nutrient Broth (Scharlau, İspanya)

L929 fibroblast hücre (Şap enstitüsünden temin edildi)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Biological Industries)

Fetal Bovine Serum (Biological Industries)

Penicilin streptomycin (Biological Industries)

Ribonuklease-A (Serva, İsrail)

Hoecht (Serva, İsrail)

Propidium iodide (Serva, İsrail)

Trypsin (Biological Industrie)

Tripan Mavisi (Biological Industries)

L-glutamin (Biological Industries)

Flasklar ve diğer plastik malzemeler (Serva, İsrail) firmasından temin edilmiştir.

2.2. Cihazlar

UV-VIS spektrofotometre (Libra S-70 model, Biochrom marka, İngiltere)

Çalkalamalı su banyosu (BS-21 model, Jieiotech marka, Kore)

Analitik terazi (CP2245 model, Sartorius marka, Almanya)

Isıticılı manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica marka, İspanya)

Etüv (FN055 model, Nüve marka, Türkiye)

Şırınga Pompası (NE-300 model, New Era marka, Amerika)

Güç kaynağı (25 kv'a kadar, Phywe marka, Almanya)

FTIR (Vertex 70V, Bruker marka, Amerika)

TGA (Q500 model, TA marka, Amerika)

SEM (JSM5600 model, Jeol marka, Japonya)

ELISA okuyucu Power wave XS2 model, Biotek marka, Amerikan)

Elementel Analiz Cihazı (Vario Micro Cube model, Elementar marka, Almanya)

2.3. Yöntem

2.3.1. Antibakteriyel Poli([2-(Metakriloiloksi)etil]trimetilamonyum klorür)'ün Sentezi

İlk olarak METAK monomeri bazık alümina ile doldurulmuş cam kolondan geçirilerek durdurucusundan uzaklaştırılmıştır. Yaklaşık 20 gram monomer 3 boyunlu balona alınıp su ile 100 mL'ye seyreltilmiştir, bu karışımdan 30 dakika boyunca azot gazı geçirilmiştir. Daha sonra monomere kütlece %2 olacak şekilde amonyum peroksi disülfat ilave edilerek 70 °C'de 4 saat süre ile geri soğutucu altında polimerleştirilmiştir. Sonra bu karışım 200 mL soğuk asetonda çöktürülerek ayrılmış ve 35 °C'de vakum etüvünde kurutulmuştur [222, 223]. METAK monomeri kullanılarak elde edilen polimer moleküler ağırlığının tayini için ODTÜ Merkezi Araştırma Laboratuvarına gönderilmiştir. Burada Dinamik Işık Spektrometresi (DLS) kullanılarak polimerin kırılma indis aralığı ölçülmüştür. Daha sonra polimer, dört farklı derişimde seyreltilerek, Statik Işık Saçılımı (SLS) yöntemi kullanılarak moleköl ağırlığı belirlenmiştir [202]. Bütün bu deneyler polimerin 1 M NaCl ile hazırlanmış çözeltileri ile yapılmıştır [224].

2.3.2. Nanoliflerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Jelatin ve jelatin/PMETAK nanolifleri üretildi. İlk olarak jelatin polimeri bir balon jojeye alınarak ve üzerine hacimce 3/1 oranında formik asit/asetik asit karışımı eklenerek kütlece %25 olacak şekilde homojen bir çözelti oluşturana kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Jelatin/PMETAK nanoliflerinin hazırlanmasında da jelatin çözeltisi hazırlandıktan sonra bu karışıma kütlece %20-80 aralığında PMETAK ilave edilmiştir. Daha sonra çözelti çözünmemiş parçaların olma ihtimaline karşı 5 dakika süre boyunca sonikatörde sonike edilmiştir. Çözeltiler elde edildikten sonra karışım 10 mL'lik cam şırınga içine alınmıştır. Nanoliflerin toplanacağı alüminyum tabaka boyutu 10x15 (boy x en) cm olarak sabit tutulmuştur. Nanolif oluşumuna uzaklığın, uygulanan voltajın, akış hızının etkisi incelenmiştir.

Farklı gerilimler, yüksek gerilim güç kaynağı tarafından cam şırıngaya takılı sarı kör uçlu iğne ile alüminyum tabaka arasına uygulanmıştır. Nanoliflerin elde edildiği düzenek ve elde edilen nanoliflerden bir kaçı şekil 2.1'de ve 2.2'de gösterilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalara ait parametreler aşağıda çizelge halinde verilmiştir.



Şekil 2.1. Elektro döndürme düzeneği



Şekil 2.2. %40 METAK polimeri içeren çözeltiden elde edilen nanolif

Çizelge 2.1. Yapılan deneysel çalışmalara ait parametreler

Deney No	METAK yüzdesi (w/w)	Akış Hızı (µL/dak)	Uzaklık (cm)	Voltaj (KV)
1	0	120	10	25
2	20	30	10	10
3	20	30	10	15
4	20	30	10	20
5	20	30	10	25
6	20	30	8	25
7	20	30	12	25
8	20	30	14	25
9	20	30	18	25
10	20	10	10	25
11	20	20	10	25
12	20	40	10	25
13	20	60	10	25
14	20	80	10	25
16	20	120	10	25
17	40	120	10	25
18	60	120	10	25
19	80	120	10	25

Elde edilen nanolifler, kullanım alanını genişletmek amacıyla, içerisinde 5 mL gluteraldehit bulunan bir desikatör içine alınmış ve gluteraldehit buharına maruz bırakılarak 24 saat süre ile çapraz bağlanmıştır. Üzerlerinde gluteraldehit kalıntısı olma ihtimaline karşı nanolifler 0,1 M glisin çözeltisi ile yıkanarak gluteraldehit kalıntılarından arındırılmıştır [12]. Hazırlanan nanoliflerin yüzey morfolojisini ve çaplarını belirlemek amacıyla SEM görüntüleri alınmıştır. Nanoliflerin yapısını aydınlatmak ve METAK polimerinin yapıda bulunduğunu kanıtlamak amacıyla FTIR, elementel analiz ve TGA çalışmaları yapılmıştır.

2.3.3. İn Vitro Parçalanma Testi

Parçalanma testleri her bir nanolifin biyolojik parçalanabilirliğini test etmek amacıyla yapılmıştır. Her bir numuneden yaklaşık 30 mg alındı ve 5 mL fosfat tamponu içine (pH 7,4; 1 L distile suda 0,8 g NaCl; 0,2 g KCl; 2,9 g Na₂HPO₄ x12H₂O ve 0,2 g KH₂PO₄ içerecek şekilde çözülerek hazırlanmıştır) atılmıştır [225]. 24 saat 37 °C su banyosunda bekletilen nanoliflerin ilk ağırlıkları alınmıştır. Sonra gün aşırı örneklerin üzerlerindeki fazla sıvı filtre kağıdı yardımıyla alınarak tartımları yapılmış ve ortama 5 mL taze fosfat tamponu ilave edilerek örnekler tekrar su banyosuna konulmuştur. Aşağıdaki eşitlik kullanılarak % parçalanma belirlenmiştir. Ayrıca parçalanmayı doğrulamak amacıyla nanoliflerin SEM görüntüleri alınmıştır.

$$\% \text{Parçalanma} = \frac{\text{İlk ağırlık} - \text{Son ağırlık}}{\text{İlk ağırlık}} \times 100 \quad [2.1.]$$

2.3.4. Antimikrobiyal Etki Testi

Mikrobiyal etki testi için gram pozitif olarak *Staphylococcus aureus* ve gram negatif olarak *Escherichia coli* bakterileri seçilmiştir. İlk olarak 24 saat süreyle sıvı kültür ortamında bakteriler büyütülmüştür ve antimikrobiyal etki testlerinin yapılması amacıyla bundan alınan 40 µL çözelti 10 mL kültür ortamına ilave edilmiştir. Çapraz bağlanan lifler 12 kuyucuklu wellplate içine alınmış ve yukarıda hazırlanan bakteri aşılantı kültür ortamından her bir kuyucuğa 2 mL olacak şekilde eklenmiştir. Bakterilerin 24 saat büyümesi beklenmiş ve hücre yoğunlukları 600 nm dalga boyunda UV-VIS spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir.

2.3.5. Sitotoksikite Testleri

2.3.5.1. WST-1 Sitotoksikite Testi

48 kuyucuklu plate kullanarak yapılmıştır. Her kuyucuğa 1x10⁴ adet insan fibroblast, hücre hattı ekilmiştir. Üzerlerine %10 fetal buzağı serumu, %1 penisilin streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) eklendi. Hücreler 37°C de

%5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından nanoliflerden 1mg/mL olarak hazırlandı ve derişimleri 6,5-100µg/mL olarak uygulanmıştır. Kontrol grubuna sadece kültür ortamı ilave edilmiştir. Her örnek 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Uygulamanın ardından 24 saatlik inkübasyon yapıldı. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki hücrelerin vasatları atıldı yerine 200 µL fenol red içermeyen besiyeri eklendi. Her kuyucuğa 7,5 µL WST-1 solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 440 nm dalga boyunda ELİSA okuyucuda absorbans ölçümü yapılmıştır.

2.3.5.2. İkili Boyama Testi

48 kuyucuklu platete, kuyucukların her birine 100 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin üzerine %10 fetal buzağı serumu, %1 pensilinli-streptomisin antibiyotik ve L-glutamin içeren DMEM ilave edilerek 37 °C'de karbondioksitli inkübatörde inkübe edilmiştir. 24 saat sonra kültürler değiştirilerek kültür ortamı içerisinde hazırlanan 1mg/mL nanolif çözeltisinden 6,5-100 µg/mL olacak şekilde nanolifler (farklı oranlarda %20-%80) hücrelere uygulandı. Kontrol grubuna ise sadece kültür ortamı ilave edildi. İkili boyama metodu çekirdeği boyamakta ve bu sayede apoptozu ve nekrozu göstermektedir. Ribonükleaz A kullanılır. – 20 °C'de saklanır (Sigma R-500). Ribonükleaz A RNA'yı boyamaz. Bu sayede sitoplazmik RNA'yı yok eder. Hoechst (33342). boyası +4 °C'da saklanır, apoptotik hücreleri boyar. Bu sayede gerçek apoptotik hücreler belirlenir. Propidium Iodide: +4 °C'de saklanır. DNA'yı ve RNA'yı boyar ve kırmızıya boyayarak sekonder nekrozu gösterir. Uygulama sonrasında vasat atılarak her bir kuyucuğa 70 µL ikili boyama çözeltisi damlatılır. 15 dakika etüvde hiç ışık almayacak şekilde bekletilir. DAPI ve FITC filtresi kullanılarak apoptoz-nekroz fotoğrafları 200x büyütmede çekilmiştir. Ortalama bin hücre sayılarak apoptotik ve nekrotik oranlar yüzde olarak hesaplanmıştır.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

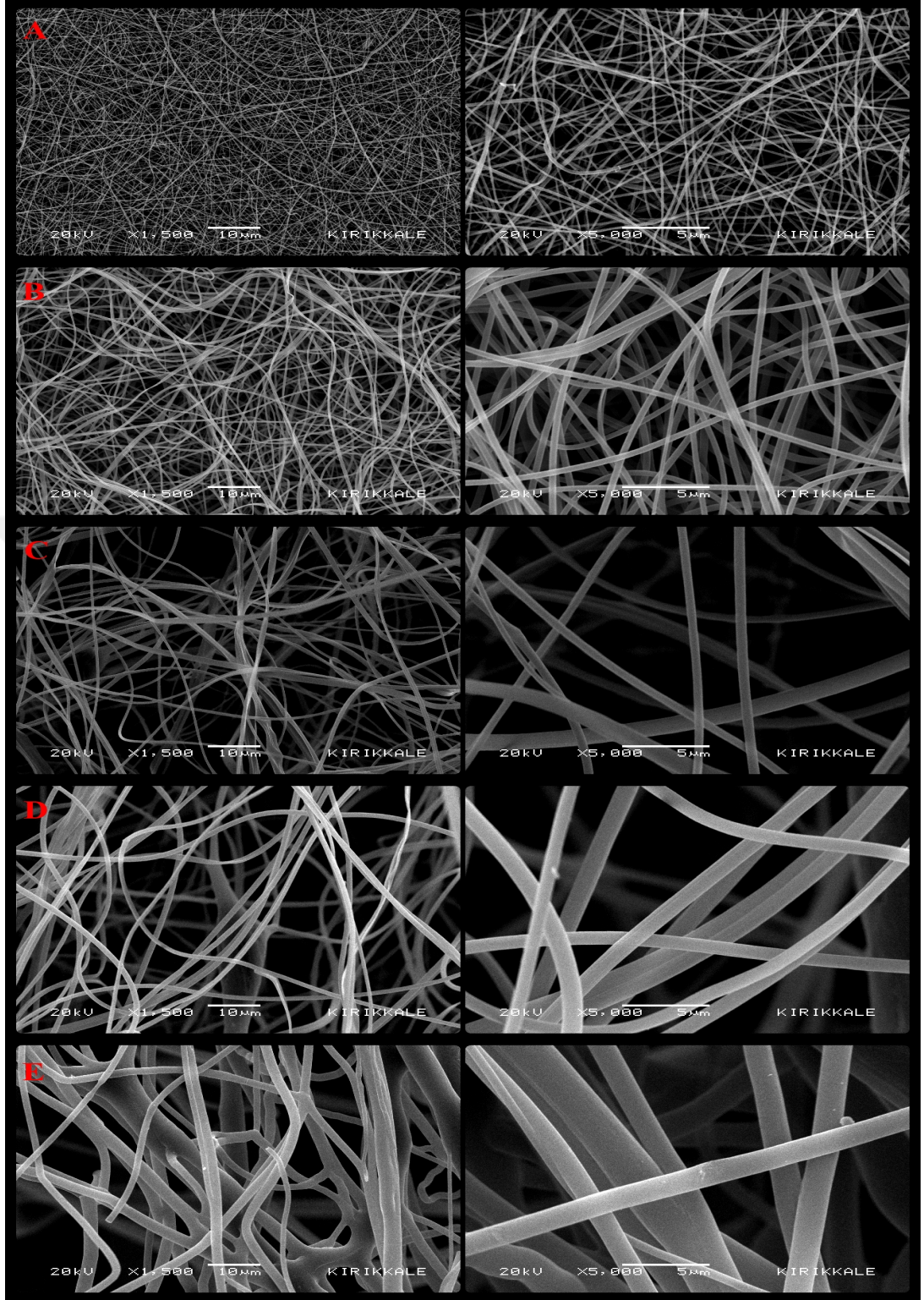
3.1. Moleküler Ağırlık Analizi Sonuçları

Elde edilen PMETAK'ın moleküler ağırlığının tayini ODTÜ Merkezi Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Yapılan analiz sonucu polimerin moleküler ağırlığı $2,643 \times 10^5$ g/mol olarak tespit edilmiştir.

3.2. Nanoliflerin Karakterizasyonu

3.2.1. SEM Analizi

Elde edilen nanoliflerin ve gluteraldehit ile çapraz bağlanan liflerin yapı, şekil ve çaplarını incelemek amacıyla SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.1 ve 3.2). SEM görüntüleri incelendiğinde nanoliflerin boyut dağılımı hakkında bilgi edinilmiş, ayrıca üretim sırasında değiştirilen parametrelerin nanolif çaplarını etkilediği görülmüş ve sonuçlar Çizelge 3.1’de verilmiştir. Şekil 3.1’deki SEM görüntülerinden elde edilen nanoliflerin homojen boyut dağılımına sahip oldukları, düzgün, pürüzsüz ve boncuksuz yapıda oldukları görülmektedir. Nanoliflerin boyut dağılımları 201,16 ile 2410,12 nm arasında değişmektedir. Polimerlerden elektro döndürme yöntemiyle nanolif üretiminde en önemli parametreler; uygulanan voltaj, iğne ile toplayıcı arasındaki mesafe ve polimerin akış hızıdır. Ayrıca bizim çalışmamızda nanolif içindeki PMETAK yüzdesinin de nanoliflerin çaplarını çok fazla etkilediği belirlenmiştir. Sadece jelatin kullanılarak elde edilen nanoliflerin $201,16 \pm 29,95$ nm çap dağılımına sahip olduğu belirlenmiştir. Jelatin içerisine sırasıyla kütlece %20, 40, 60 ve 80 PMETAK ilave ettiğimizde ise nanoliflerin çaplarının $421,61 \pm 32,63$; $622,02 \pm 59,41$; $1151,82 \pm 164,41$; $2410,12 \pm 258,65$ nm sırasında değiştiği görülmüştür. Jelatin içine PMETAK ilave edilmesi ile polimer çözeltisinin derişiminin ve buna bağlı olarak ta viskozitesinin arttırdığı görülmüştür. Polimer çözeltisinin viskozitesinin artmasının üretilen nanoliflerin çaplarını arttırdığı çeşitli çalışmalarda verilmiştir [226-228].



Şekil 3.1. A: Jelatin nanoliflere ait, B:%20 PMETAK polimeri içeren nanoliflere ait, C: %40 PMETAK içeren nanoliflere ait, D: %60 PMETAK içeren nanoliflere ait, E: %80 PMETAK içeren nanoliflere ait SEM görüntüleri

Çizelge 3.1. Elektro döndürme işleminde değişen parametreler ile elde edilen nanoliflerin ortalama çaplarının değişimi

METAK yüzdesi (%w)	Akış Hızı (μL/dak)	Uzaklık (cm)	Voltaj (kV)	Ortalama Lif Çapı (μm)
0	120	10	25	201,16 $\pm$ 29,95
20	30	10	15	349,93 $\pm$ 19,50
20	30	10	20	449,10 $\pm$ 41,65
20	30	10	25	485,56 $\pm$ 42,58
20	30	8	25	475,60 $\pm$ 38,61
20	30	12	25	464,51 $\pm$ 31,16
20	30	14	25	480,80 $\pm$ 48,37
20	30	18	25	452,08 $\pm$ 41,05
20	40	10	25	477,91 $\pm$ 33,11
20	60	10	25	431,30 $\pm$ 34,45
20	80	10	25	434,72 $\pm$ 32,81
20	120	10	25	421,61 $\pm$ 32,63
40	120	10	25	622,02 $\pm$ 59,41
60	120	10	25	1151,82 $\pm$ 164,41
80	120	10	25	2410,12 $\pm$ 258,65

Tarus ve arkadaşlarının [226] selüloz asetat ve poli(vinil klorür) nanolifler üzerine yaptıkları çalışma da benzer sonuçlar görülmektedir. Aseton/N,N-dimetilasetamit içerisinde çözdükleri selüloz asetat derişiminin %10'dan %16'ya arttırılması dolayısıyla viskozitesinin artması ile nanolif çaplarının 60 nm'den 122 nm'ye kadar arttığı belirlenmiştir. N,N-dimetilformamit/tetrahidrofuran karışımı içinde çözdükleri poli(vinil klorür) derişiminin %12'den %16'ya arttırılması dolayısıyla viskozitesinin artması ile nanolif çaplarının 121 nm'den 275 nm'ye kadar arttığı belirlenmiştir.

Değiştirilen diğer parametrelerin nanolif çaplarına üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla kütlece %20 PMETAK içeren polimer karışımından nanolifler

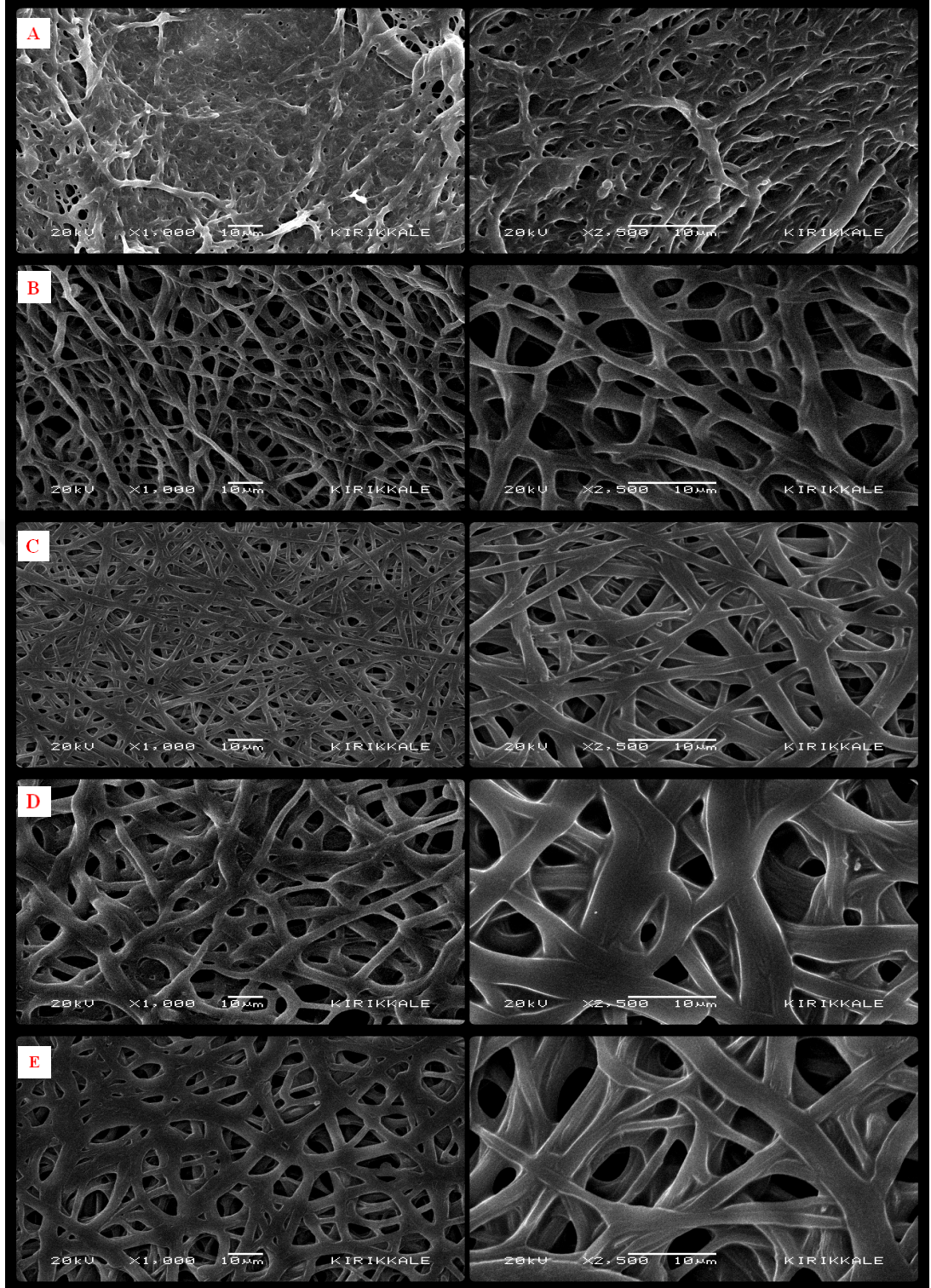
hazırlanmıştır. Uygulanan voltaj değerinin etkisinin incelenmesi amacıyla, iğne ile toplayıcı arasındaki mesafe 10 cm ve polimerin akış hızı 30 $\mu\text{L}/\text{dakika}$ olarak sabit tutulmuştur. Voltaj değerinin artırılması da ortalama nanolif çapı üzerinde PMETAK'ta olduğuna benzer bir etkiye neden olmuştur. Sırasıyla 15, 20 ve 25 kV şeklinde arttırılan voltaj ile ortalama çapların sırasıyla $349,93 \pm 19,50$; $449,10 \pm 41,65$; $485,56 \pm 42,58$ nm şeklinde değiştiği görülmüştür. Benzer sonuçlar ipek lifleri ve polikaprolakton–insan serum albümini üzerine yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [227, 229]. Tiwari ve arkadaşlarının [229] polikaprolakton–insan serum albümini üzerine yaptıkları çalışma da voltaj değerinin 12'den 20 kV'ya arttırılması ile nanolif çaplarının 356 nm'den 1280 nm'ye kadar arttığı belirlenmiştir.

Ortalama nanolif çapı üzerinde etkili olan bir diğer etken ise iğne ile toplayıcı arasındaki mesafedir. İğne ile toplayıcı arasındaki mesafenin etkisinin incelenmesi amacıyla, uygulanan voltaj 25 kV ve polimerin akış hızı 30 $\mu\text{L}/\text{dakika}$ olarak sabit tutulmuştur. İğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafenin 8, 10, 12, 14 ve 18 cm şeklinde arttırılmasıyla elde edilen nanoliflerin ortalama çapları $475,60 \pm 38,61$; $485,56 \pm 42,58$; $464,51 \pm 31,16$; $480,80 \pm 48,37$; $452,08 \pm 41,05$ nm şeklinde değişim göstermiştir. Değerler incelendiğinde mesafenin arttırılması ile nanolif çaplarının çok fazla etkilenmediği gözlemlenmiştir. İğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe 18 cm'ye çıkarıldığında ise ortalama nanolif çapı azalmıştır [229-231].

Son olarak polimerin şırıngadan akış hızının ortalama çap üzerindeki etkisi incelenmiştir. Polimerin şırıngadan akış hızının etkisinin incelenmesi amacıyla, uygulanan voltaj 25 kV ve iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe 10 cm olarak sabit tutulmuştur. Polimerin akış hızının sırasıyla 30, 40, 60, 80 ve 120 $\mu\text{L}/\text{dakika}$ şeklinde arttırılmasıyla elde edilen nanoliflerin ortalama çapları sırasıyla $485,56 \pm 42,58$; $477,91 \pm 33,11$; $431,30 \pm 34,45$; $434,72 \pm 32,81$; $421,61 \pm 32,63$ nm olarak elde edilmiştir. Bu çalışmada artan akış hızı ortalama nanolif çapının azalmasına neden olmuştur, benzer sonuçlar Moutsatsou ve arkadaşlarının polianilin katkılı kamfor-sülfonik asit/polietilen oksit iletken nanolifleri üzerine yaptıkları çalışmada gösterilmiştir [232]. Bundan sonraki çalışmalarda voltaj 25kV, toplayıcı mesafesi 10 cm, akış hızı 120 $\mu\text{L}/\text{dakika}$ olacak şekilde hazırlanan nanolifler kullanılmıştır.

Elektro döndürme işlemi ile elde edilen nanoliflerin çapraz bağlama işlemi gluteraldehit buharına maruz bırakılması ile gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlanan nanoliflerin SEM görüntüleri Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



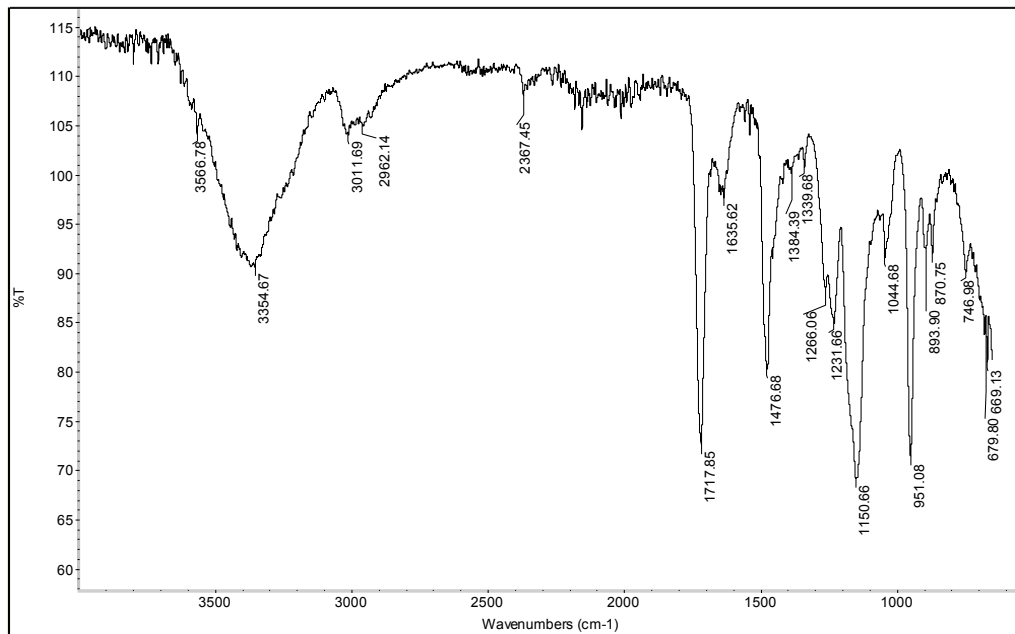


Şekil 3.2. Glutaraldehit buharına maruz bırakılan A: Jelatin nanoliflere ait, B: %20 PMETAK içeren nanoliflere ait, C: %40 PMETAK içeren nanoliflere ait, D: %60 PMETAK içeren nanoliflere ait; E: %80 PMETAK içeren nanoliflere ait SEM görüntüleri

Çapraz bağlama işleminden sonra başlangıçta düz olan nanoliflerin çoğunlukla kesişme noktalarından kuvvetli bir şekilde birbirine bağlandığı ve görünüşte sağlam ve sert bir ağ yapısı meydana getirdikleri görülmektedir. Jelatin nanolifler ile yapılan çeşitli çalışmalar da benzer sonuçların elde edildiği bulunmuştur [19, 233]. Weipeng Lu ve arkadaşlarının [19] spiral elektro döndürme yöntemi ile elde ettikleri nanolifleri sıvı ve buhar fazında gluteraldehit ile çapraz bağlamışlar ve elde ettikleri nanolifleri karakterize etmişlerdir. Nanoliflerin her iki yöntemle de başarılı bir şekilde çapraz bağlandıklarını ve sıvı fazda çapraz bağlanan nanoliflerin daha sağlam bir ağ yapısı oluşturduklarını belirlenmişlerdir. Fakat buhar fazında çapraz bağlanan nanoliflerin bile gerilme direncinin yaklaşık 2 kat arttığını bulmuşlardır.

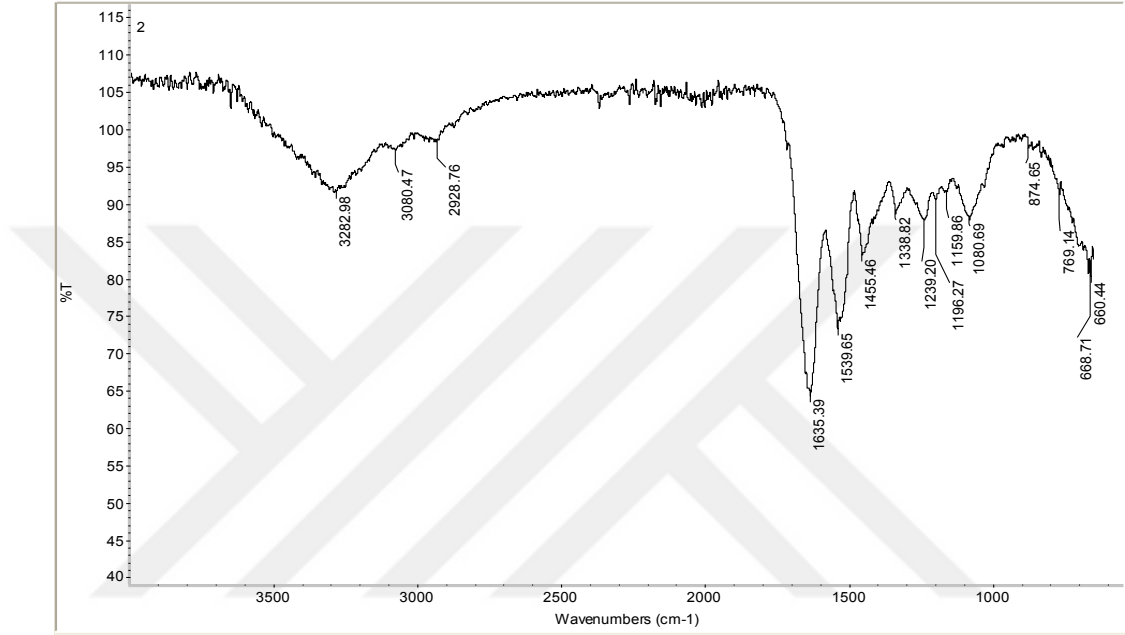
3.2.2 FTIR Analiz Sonuçları

PMETAK'ın sentezini doğrulamak ve üretilen nanoliflerin kimyasal yapısının aydınlatılması amacıyla FTIR çalışmaları ile yapılar incelenmiştir.



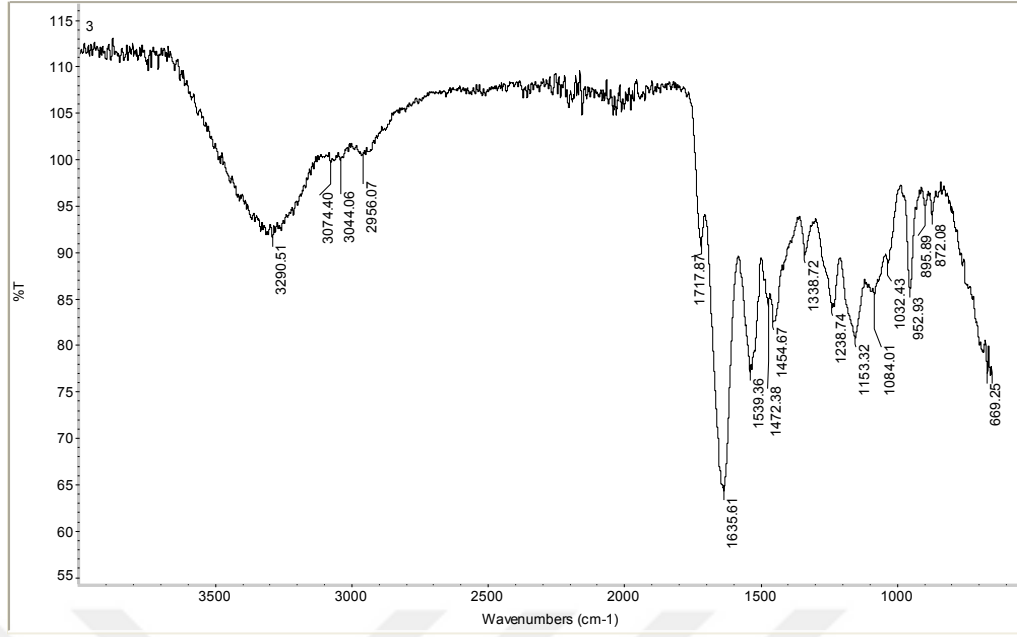
Şekil 3.3. METAK polimerine ait FTIR spektrumu

Şekil 3.3.'de sentezlenen METAK polimerinin FTIR spektrumu görülmektedir. Spektrum incelendiğinde burada 1717 cm^{-1} 'deki pik ester grubuna ait C=O gerilme titreşim bandını, 1476 cm^{-1} 'deki pik amin grupları içindeki C-N gerilme bandını ve 951 cm^{-1} 'deki pik ise PMETAK içindeki dördüncül amonyum grubuna ait titreşim bandını göstermektedir [234, 235].



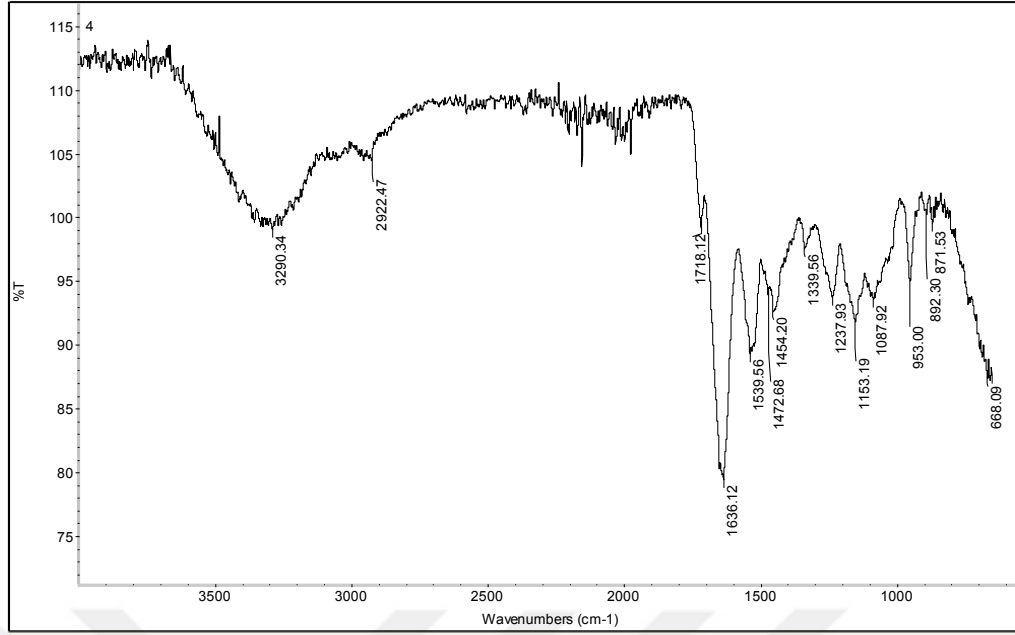
Şekil 3.4. Jelatin nanoliflerin FTIR spektrumu

Şekil 3.4'te jelatin nanoliflerin FTIR spektrumu sunulmuştur. Spektrum incelendiğinde 1635 cm^{-1} 'deki pik amid I için (C=O) gerilme titreşimine, 1539 cm^{-1} 'deki pik amid II için N-H gerilmesine, 1239 cm^{-1} 'deki pik amid III için C-N gerilme titreşimine ve 1455 cm^{-1} 'deki pik ($-\text{CH}_2$) grupları için asimetrik C-H gerilme titreşimine karşılık geldiği düşünülmektedir [236].



Şekil 3.5. Kütlece %60 METAK polimeri içeren jelatin/PMETAK nanoliflerin FTIR spektrumu

Şekil 3.5'te kütlece %60 METAK polimeri içeren jelatin/PMETAK nanoliflerin FTIR spektrumu görülmektedir. Spektrum incelendiğinde 1717, 1472 ve 952 cm^{-1} 'deki piklerin METAK polimerine, 1635, 1539, 1454 ve 1238 cm^{-1} 'deki piklerin ise jelatine ait gerilme titreşim bantları olduğu düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre jelatin ve PMETAK'ın başarılı bir şekilde nanolif eldesinde birlikte kullanılabileceği belirlenmiştir.



Şekil 3.6. Gluteraldehit buharına maruz bırakılan kütlece %60 METAK polimeri içeren jelatin/PMETAK nanoliflerin FTIR spektrumu

Şekil 3.6'da desikatör içinde gluteraldehit buharına maruz bırakılarak çapraz bağlanan kütlece %60 METAK polimeri içeren jelatin/PMETAK nanoliflerin FTIR spektrumu görülmektedir. FTIR spektrumu Şekil 3.5 ile kıyaslandığında bazı pik şiddetlerinin ve dalga yoğunluğunun çapraz bağlanmadan dolayı nispeten azaldığı görülmektedir [19]. Fakat piklerin dalga boylarında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir, bu sonuç bize çapraz bağlanmanın elde edilen nanoliflerin fonksiyonel gruplarını etkilemediğini göstermiştir.

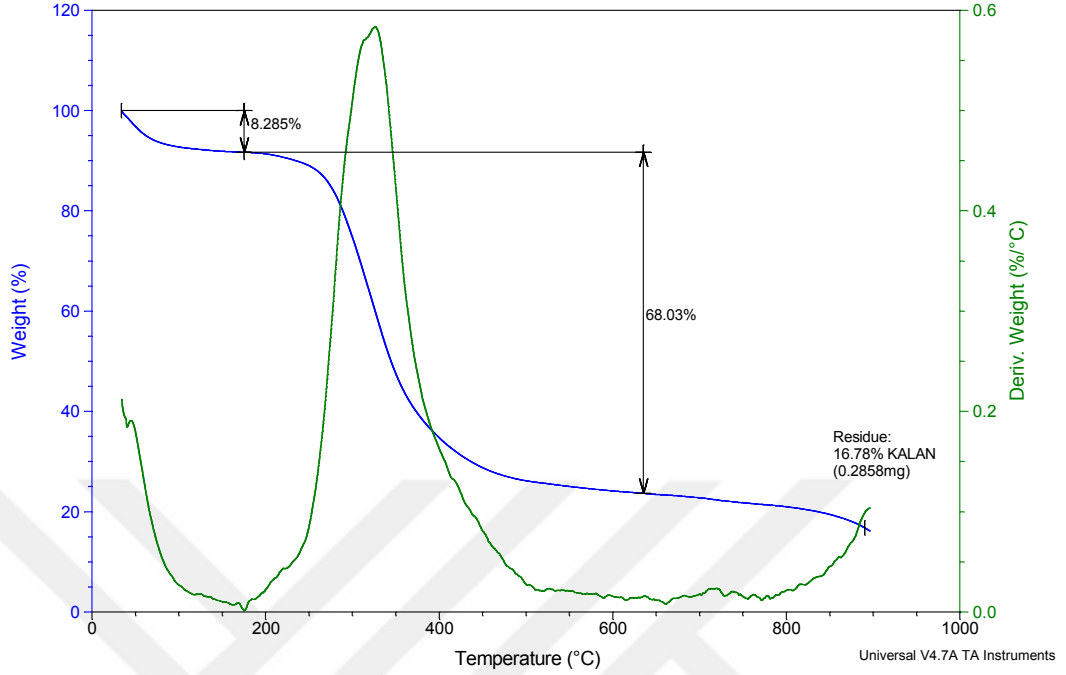
3.2.3. TGA Test Sonuçları

TGA analizi üretilen nanoliflerin termal kararlılığını belirlemek amacıyla 0-900 °C aralığında yapılmıştır.

Sample: 2
Size: 1.7030 mg
Method: Hi-Res - Dynamic

TGA

File: C:\...TGA\Analiz\Murat İnal\08.07.2014\2
Operator: ogün
Run Date: 09-Jul-2014 12:39
Instrument: TGA Q500 V20.10 Build 36



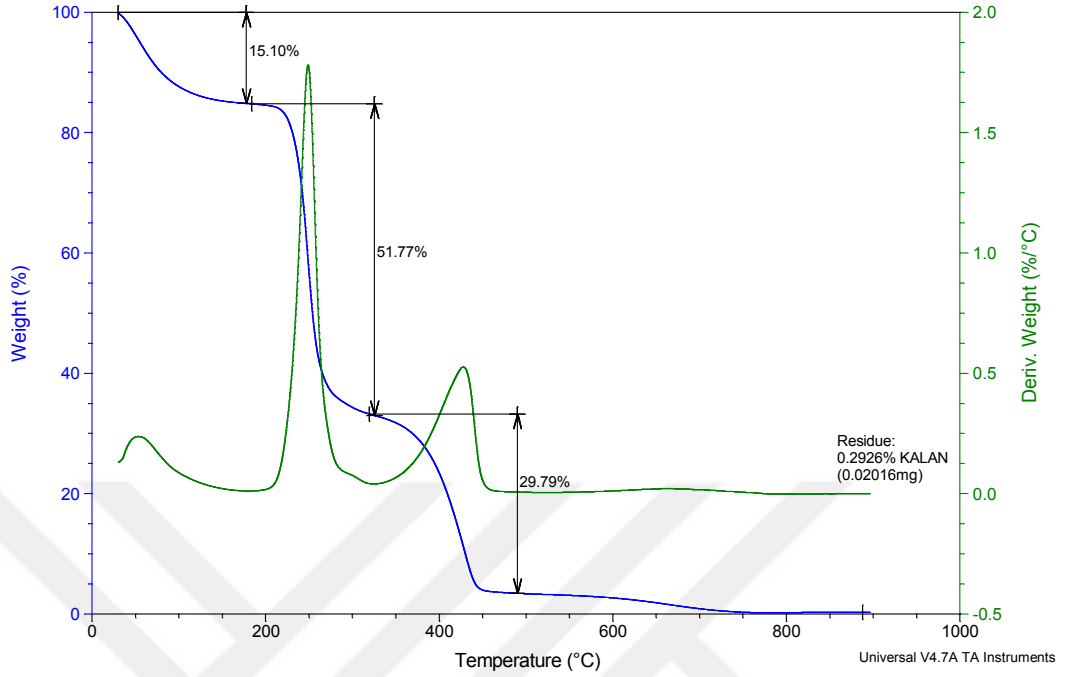
Şekil 3.7. Jelatin nanoliflerden oluşan numuneye ait TGA termogramı

Jelatin nanoliflerden oluşan numuneye ait Şekil 3.7'deki TGA termogramı incelendiğinde bozulmanın iki basamakta gerçekleştiği görülmektedir. Bozulmanın ilk basamağının 40-175 °C arasında gerçekleştiği, nanolifin kütlesinin %8,285'ini kaybettiğini ve bu kaybın yapıdaki suyun uzaklaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bozulmanın ikinci basamağının ise 250-375 °C arasında gerçekleştiği, maksimum bozunma sıcaklığının 325 °C olduğu ve nanolifin kütlesinin yaklaşık %60'ını kaybettiği görülmektedir. Bu basamaktaki kütle kaybının nedenin jelatinin polimer zincirlerinin termal olarak parçalanmasından dolayı gerçekleştiği düşünülmüştür [12].

Sample: 1
Size: 6.8890 mg
Method: Hi-Res - Dynamic

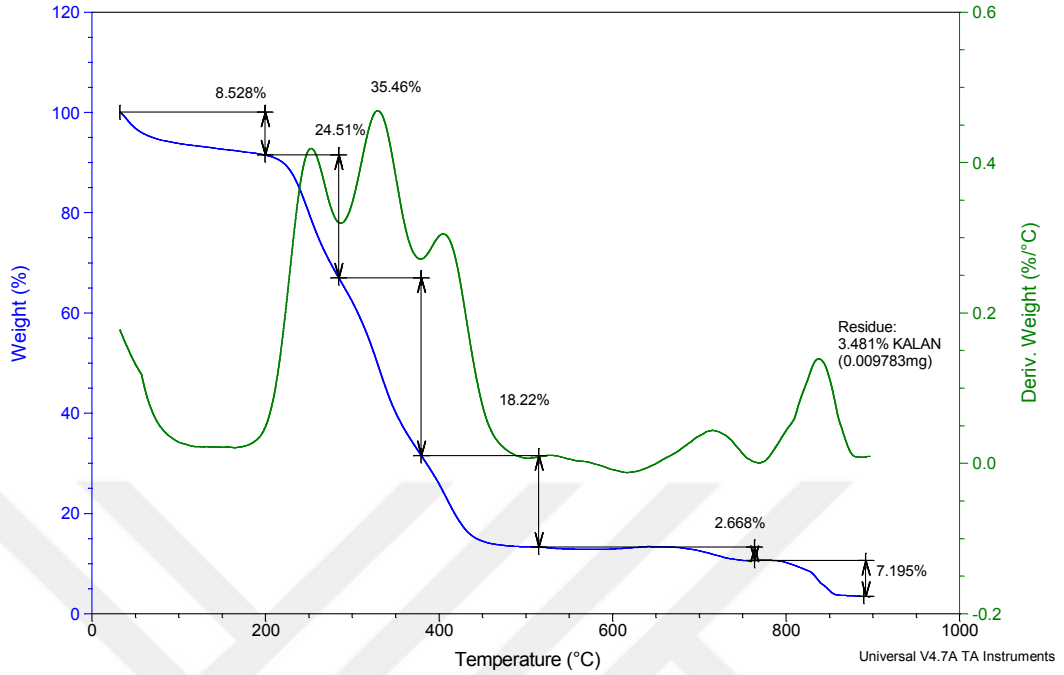
TGA

File: C:\...TGA\Analiz\Murat İnal\08.07.2014\1
Operator: ogün
Run Date: 09-Jul-2014 10:29
Instrument: TGA Q500 V20.10 Build 36



Şekil 3.8. PMETAK'tan oluşan numuneye ait TGA termogramı

PMETAK'tan oluşan numuneye ait Şekil 3.8 'de TGA termogramı incelendiğinde bozulma 3 basamakta gerçekleşmiştir [237]. İlk basamak 30-175 °C arasında gerçekleşmiş olup burada kütesinin yaklaşık %15'ini kaybetmiştir. Bu kütle kaybının yapıdaki suyun uzaklaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. İkinci basamakta 210-275 °C arasında gerçekleştiği ve maksimum bozunma sıcaklığının 250 °C olduğu belirlenmiştir. Bu kütle kaybının dördüncül amonyum gruplarının parçalanması ve polimer zincirlerinin kırılması nedeniyle kütle kaybının yaklaşık %52 ile en çok bu aşamada olduğu görülmektedir. Bozulmanın son basamağı ise 375-450 °C arasında gerçekleşmiş ve maksimum bozunma sıcaklığının 430 °C olduğu tespit edilmiştir. Bu basamakta polimer zincirlerinin kırılması nedeniyle polimerin kütesinin yaklaşık %30'unu kaybettiği görülmektedir [238, 239].



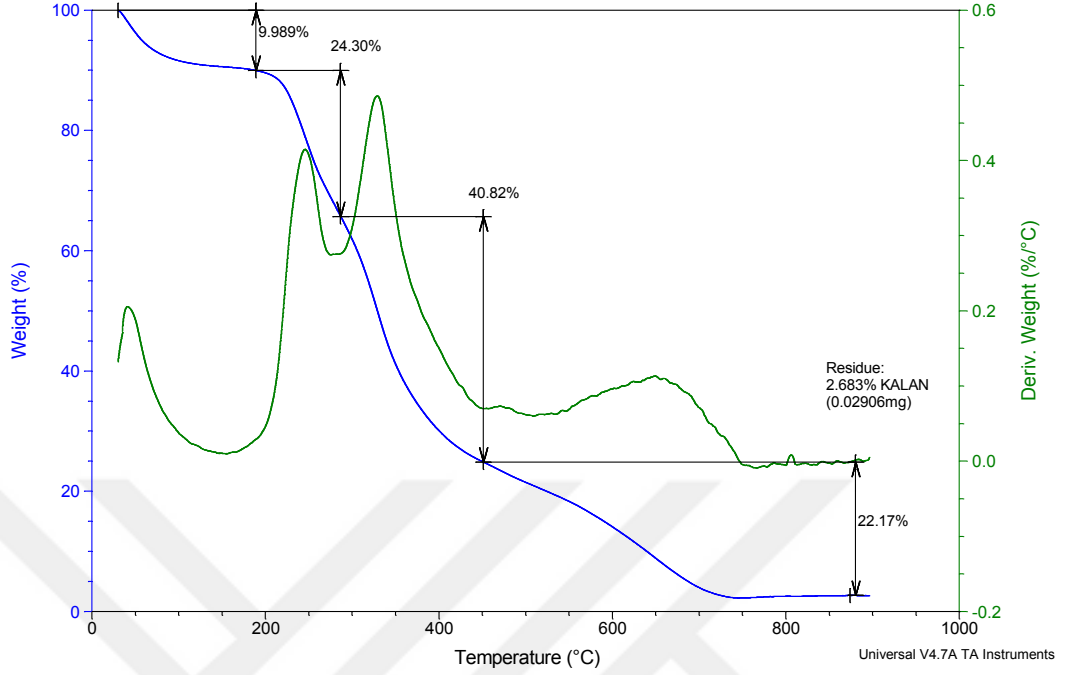
Şekil 3.9. %60 METAK polimeri içeren jelatin/PMETAK numunesine ait TGA termogramı

Şekil 3.9 'da kütlece %60 METAK polimeri içeren jelatin/PMETAK numunesine ait TGA termogramı görülmektedir. Termogram incelendiğinde bozulmanın temel 4 basamaktan oluştuğu belirlenmiştir. İlk basamak %8,5 kütle kaybı ile hidrofilik nanoliflerden suyun uzaklaşmasına atfedilebilir. 210-275 °C (%24,5 kütle kaybı) ve 375-450 °C (%18,2 kütle kaybı) arasında gerçekleşmiş olan İkinci ve dördüncü basamakta ki bozulmaların yapıdaki PMETAK'ın polimer zincirlerinin termal parçalanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu basamaktaki maksimum bozulma sıcaklıkları da sırasıyla 250 ve 410 °C olarak bulunmuştur. Bu sonuçta yine PMETAK'ın maksimum bozulma sıcaklıkları ile çok iyi örtüşmektedir. Üçüncü basamaktaki 275-375 °C (%35,5 kütle kaybı) aralığındaki kütle kaybının ise jelatinin termal parçalanmasından ileri geldiği düşünülmüştür. Aynı şekilde maksimum bozulma sıcaklığı olan 325 °C, jelatin nanoliflerinin termogramı ile uyduğu görülmektedir.

Sample: 4
Size: 1.0830 mg
Method: Hi-Res - Dynamic

TGA

File: C:\...TGA\Analiz\Murat İnal\08.07.2014\4
Operator: ogün
Run Date: 10-Jul-2014 09:44
Instrument: TGA Q500 V20.10 Build 36



Şekil 3.10. Gluteraldehit ile çapraz bağlanan %60 METAK polimeri içeren jelatin/PMETAK numunesine ait TGA termogramı

Desikatörde gluteraldehit buharına maruz bırakılan kütlece %60 METAK polimeri içeren jelatin/PMETAK numunesine ait TGA termogramı Şekil 3.10'da görülmektedir. TGA termogramı incelendiğinde bozulma basamak sayısının yine 4 olduğu görülmektedir. İlk basamak yaklaşık %10 kütle kaybı ile hidrofilik nanoliflerden suyun uzaklaşmasına atfedilebilir. İkinci basamak değişmeden 210-280 °C arasında %24,5 kütle kaybı ile maksimum bozulma sıcaklığıda 250 °C olarak karşımıza çıkmıştır. Bozulmanın ilk iki basamağının başlangıç ve bitiş sıcaklıkları ve kaybedilen kütle miktarları yaklaşık olarak aynı kalmıştır. Çapraz bağlanmanın etkisi 3. basamakta ortaya çıkmaya başlamıştır. Üçüncü basamaktaki bozulma 280-450 °C aralığında %40,8 kütle kaybı ile ve maksimum bozulma sıcaklığı 325 °C olarak görülmektedir. Çapraz bağlanmayan liflerin 210–450 °C aralığında toplamda %53 kütle kaybına uğradığı, gluteraldehit ile çapraz bağlandıktan sonra nanoliflerin yaklaşık %40'ının parçalandığı termogramlardan görülmektedir. Çapraz bağlanmamış lifler ile karşılaştırıldığında çapraz bağlanma ile 450 °C'ye

gelindiğinde nanoliflerin yaklaşık %12 daha az kütle kaybına uğradığı görülmektedir. Bu kalan kütle de 450–720 °C aralığında termal parçalanmaya uğramıştır. Bu sonuçlar bize çapraz bağlanan nanoliflerin termal kararlılığını arttığını göstermiştir. Buda beklenen bir sonuçtur [12].

3.2.4. Element Analizi

Element analizi METAK polimerinin yapıya hangi oranda katıldığını kanıtlamak amacı ile yapılmıştır. Nanolifler hazırlanırken jelatin kütlece %25’lik olacak şekilde miktarı hiç değiştirilmemiş, jelatin kütlesine göre oranca %20-80 aralığında PMETAK ilave edilmiştir. Element analizi sonuçları ve normalde nanolif içerisinde olması gereken ve element analizinden hesaplanan PMETAK içerikleri Çizelge 3.2 ve 3.3’te sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Farklı PMETAK içerikleri ile hazırlanan nanoliflerin element analizi sonuçları

Numune İçeriği	% N	% C	%H
Jelatin	16,39	43,91	6,592
%20 PMETAK içeren nanolif	13,86	43,58	7,040
%40 PMETAK içeren nanolif	13,14	44,17	7,576
%60 PMETAK içeren nanolif	12,21	42,96	6,925
%80 PMETAK içeren Jelatin	10,80	42,61	7,150

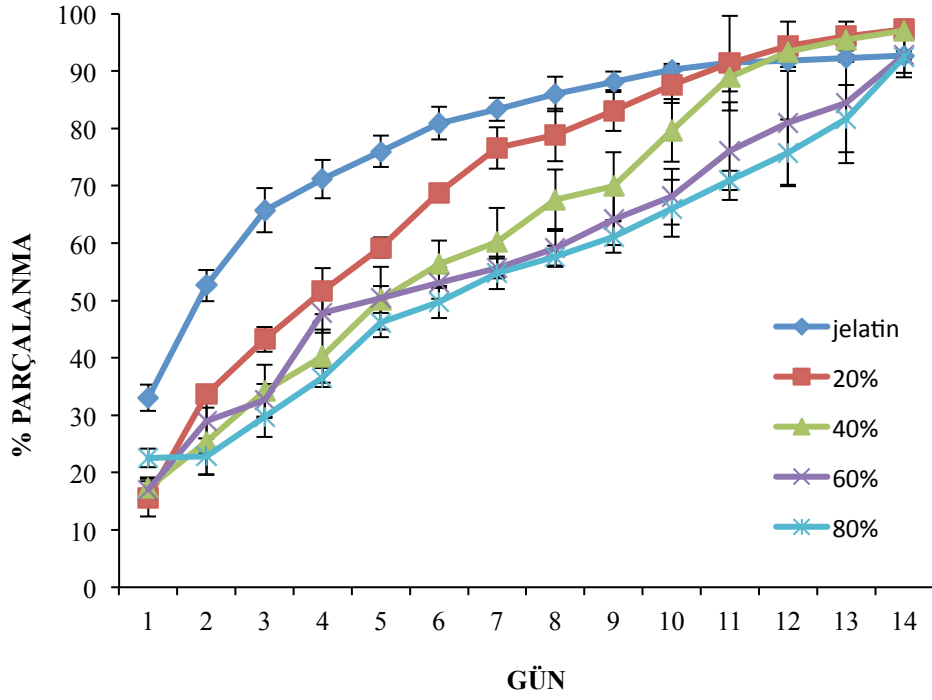
Çizelge 3.3. Farklı PMETAK içerikleri ile hazırlanan nanoliflerin olması gereken ve hesaplanan %PMETAK miktarları

Numune Kodu	Nanolif içerisinde olması gereken %PMETAK	Nanolif içerisinde hesaplanan %PMETAK
%20 PMETAK içeren nanolif	16,67	26,22
%40 PMETAK içeren nanolif	28,57	33,68
%60 PMETAK içeren nanolif	37,50	43,32
%80 PMETAK içeren nanolif	44,40	57,93

Nanoliflerin hesaplanan PMETAK içeriklerinin, olması gerekenden daha yüksek çıktığı bulunmuştur. Bu sonuç bize (+) net bir iyonik yüke sahip olan PMETAK polimerinin jelatine oranla elektro döndürme yoluyla daha iyi spinlendiği göstermektedir.

3.2.5. Parçalanma Testi Deney Sonuçları

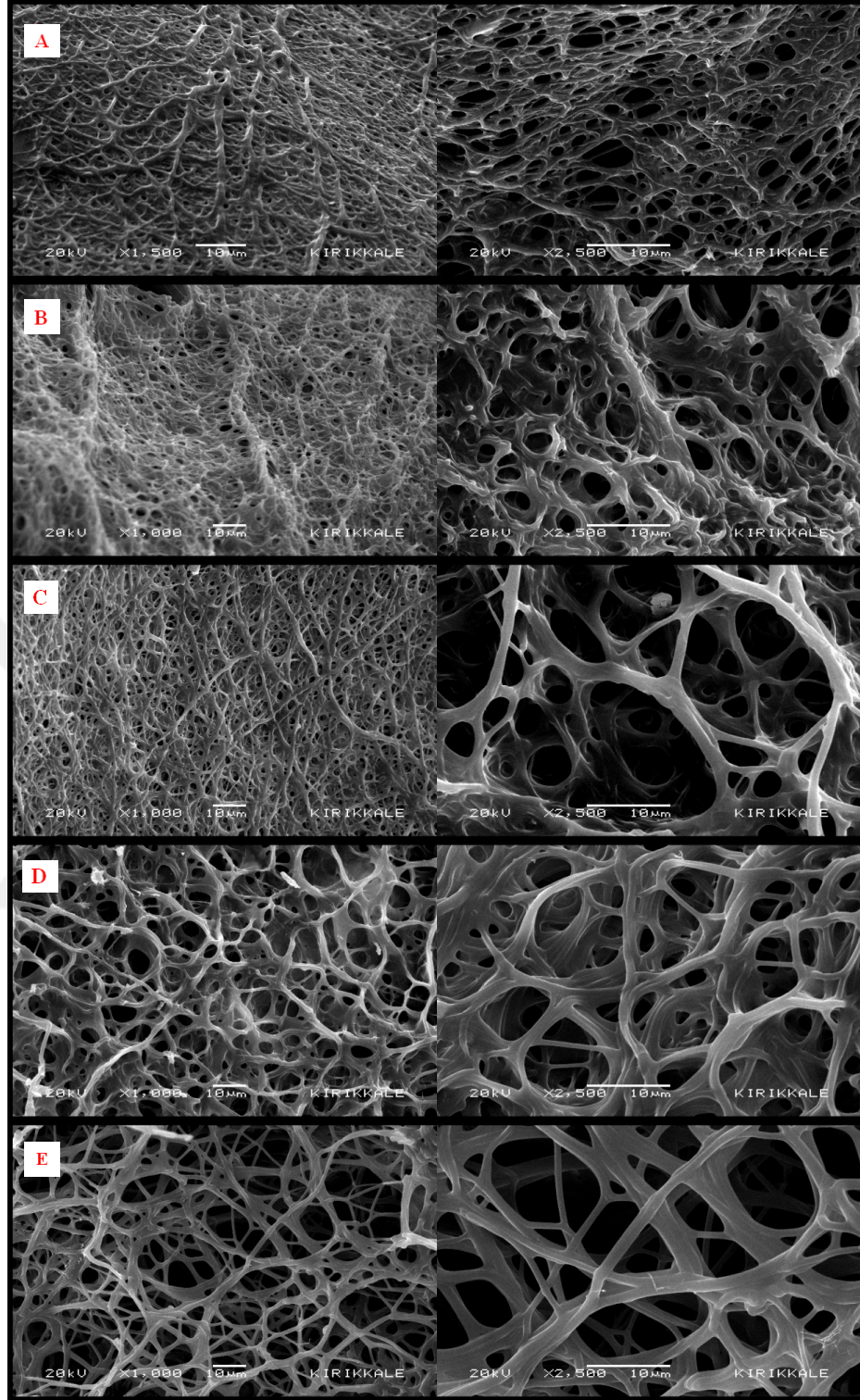
Yara örtü malzemesi veya implant olarak kullanılacak bir biyoteknolojik materyalin hasarlı organ veya dokuya yerleştirildikten sonra hiçbir işlem gerektirmeden o bölgede kendi kendine belirlenen süre içerisinde parçalanarak yok olması istenir. Bu sebeple hazırladığımız yara örtü malzemesinin vücut üzerindeki deri tabakasına benzer bir ortamda parçalanması test edilmiştir. Parçalanma testleri Yihong Gong ve arkadaşlarının [225] hazırladığı şekilde oluşturulan fosfat parçalanma çözeltisi içerisine alınan gluteralehit ile çapraz bağlanmış nanolif örneklerinin 14 gün boyunca gün aşırı kütle ölçümleri alınarak gerçekleştirilmiş ve parçalanma sonuçları Şekil 3.11.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. Numunelerin fosfat tamponu içerisinde güne bağlı kütle kayıpları

Genel itibarı ile kütle kaybının ilk hafta oldukça hızlı olduğu ve yüksek bir ivmeyle gerçekleştiği görülürken ikinci hafta jelatinden oluşan nanolif örneğinde bu ivmelenmenin azaldığı görülmektedir. Elde edilen değerler incelendiğinde 7 gün sonunda bütün örneklerin kütlelerinin %50'sinden fazlasını kayb ettikleri görülmektedir. Diğer nanolifler ile karşılaştırıldığında özellikle ilk 7 günlük sürede jelatin nanoliflerin daha yüksek bir hızla parçalandıkları sonuçlardan açıkça görülmektedir. İlk 7 gün içerisinde %20 METAK polimeri içeren lifler yine jelatine yakın bir parçalanma seyri izlerken diğer nanoliflerin parçalanmasının düşük olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuçlar yapıya PMETAK katılmasının en azından 7 günlük süreçte nanoliflerin dayanımını arttırdığını göstermektedir. 14 gün sonunda ise bütün nanoliflerin kütlelerinin %90'ından fazlasını kayb ettikleri grafikten açıkça anlaşılmaktadır.

Yüksek parçalanma gösteren nanoliflerden 7. gün sonunda örnekler alınmış, bu örneklerin SEM görüntüleri çekilmiş ve sonuçlar Şekil 3.12 'de verilmiştir. Çapraz bağlanmış nanoliflerin morfolojisindeki değişimler ve çapraz bağlanmış yapıların arasındaki gözeneklerin parçalanma sürecinde bariz bir şekilde genişlediği ve büyük bir delik halini aldığı SEM görüntülerinden açıkça görülmektedir [240].

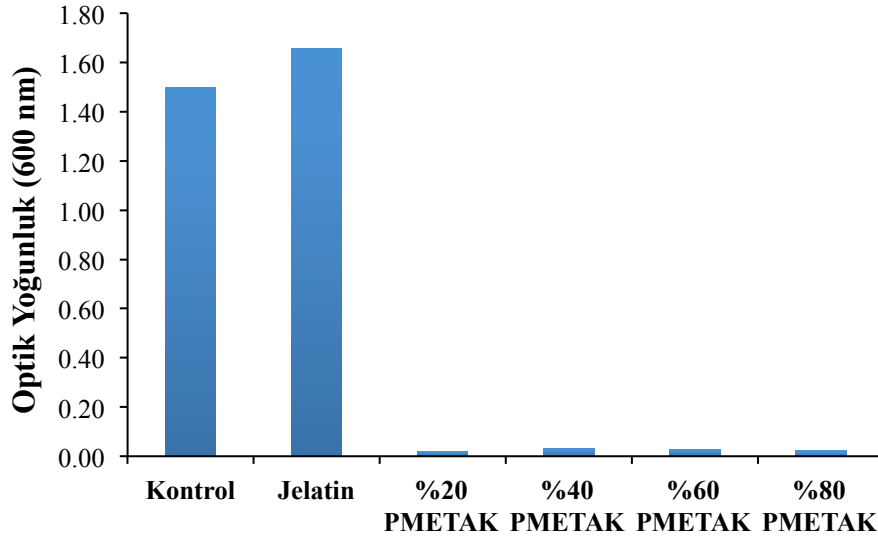


Şekil 3.12. Fosfat tamponu içinde 24 saat bekletildikten sonra alınan A: jelatinden oluşan nanolif numunesine, B: %20 PMETAK içeren nanolif numunesine, C: %40 PMETAK içeren nanolif numunesine, D: %60 PMETAK içeren nanolif numunesine, E: %80 PMETAK içeren nanolif numunesine ait SEM görüntüleri

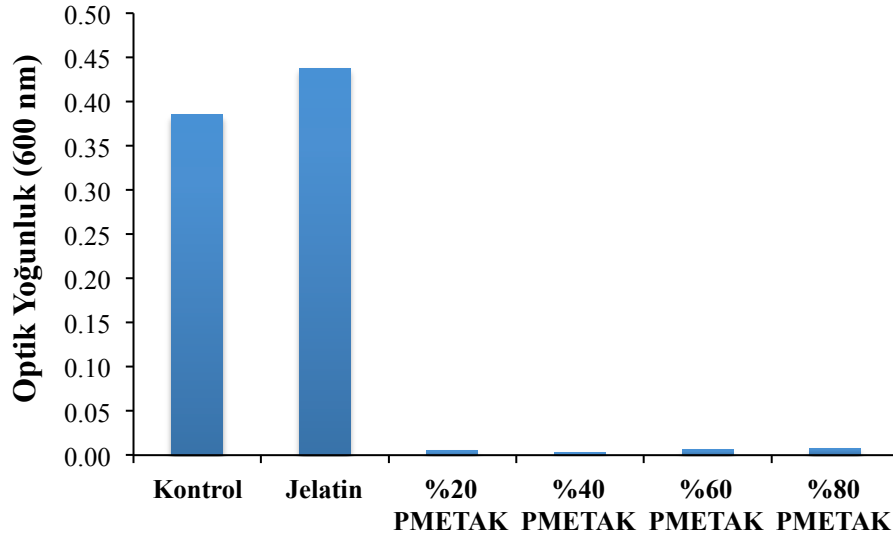
3.3. Antimikrobiyal Etki Testi Deney Sonuçları

Açık yaralar, bakterilerin koloni oluşturmaları ve enfeksiyon için uygun ortamlar oluşturmaktadır. Açık yaraların tedavisinde kullanılan klasik örtü malzemeleri, yaranın yüzeyinde mikroorganizmaların rahatlıkla çoğalabilecekleri nemli, sıcak ve besleyici bir ortam sağlayarak bu bölgede enfeksiyona sebep olabilmektedir. Bu enfeksiyonlar beklenen tedavinin ve yara iyileşme sürecinin uzamasına neden olabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı cilt yaralarının acil bakımında yara iyileşmesinin hızlanmasını sağlamak için mikrobiyal enfeksiyonun önlenmesi çok önemlidir. Bundan dolayı da ideal bir yara örtü malzemesinin antimikrobiyal bir özellikte olması gerekmektedir [4, 21-23]. Jelatin yara örtü malzemesi olarak istenilen bütün gereksinimleri karşılarsa da en büyük eksikliklerinden biri antimikrobiyal özellikte olmamasıdır. Jelatine antimikrobiyal özellik kazandırmak bizim de çalışmamızın temelini oluşturmaktadır.

Hazırlanan çapraz bağlı nanoliflerin antimikrobiyal etkisini araştırmak amacıyla iki adet kontrol grubu oluşturulmuştur; ilk olarak hiç lif içermeyen sadece bakteri ekimi yapılmış kültür ortamı, ikinci olarak sadece jelatin nanofiber ilave edilmiş bakteri ekimi yapılmış kültür ortamı kullanılmıştır. Nanolifler 24 saat ön büyütmeden alınarak ekim yapılmış bakteri kültürleri içine alınmış, kültür ortamları içindeki bakteri büyümeleri UV-VIS spektrofotometre kullanılarak 600 nm’de optik yoğunluk olarak ölçülmüş ve sonuçlar her iki bakteri için ayrı ayrı Şekil 3.13 ve 3.14’te verilmiştir.



Şekil 3.13. *Escherichia coli* için nanoliflerin antimikrobiyal etkisinin optik yoğunlukla değişimi (Kontrol: Sadece bakteri ekilmiş kültür ortamı; Jelatin: Jelatin nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %20 PMETAK: %20 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %40 PMETAK: %40 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %60 PMETAK: %60 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %80 PMETAK: %80 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı)



Şekil 3.14. *Staphylococcus aureus* için nanoliflerin antimikrobiyal etkisinin optik yoğunlukla değişimi (Kontrol: Sadece bakteri ekilmiş kültür ortamı; Jelatin: Jelatin nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %20 PMETAK: %20 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %40 PMETAK: %40 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %60 PMETAK: %60 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı; %80 PMETAK: %80 PMETAK içeren nanofiber ilave edilmiş kültür ortamı)

Antibakteriyel testlerin sonuçları incelendiğinde, jelatin nanolif içeren kültür ortamlarının sadece bakteri içeren büyüme ortamlarından bile daha fazla çoğaldıkları optik yoğunluklardan görülebilmektedir. Fakat PMETAK ile modifiye edilmiş nanoliflerin hiçbirisinde üreme olmadığı grafiklerden açıkça anlaşılmaktadır. Bu sonuç bize METAK polimeri karıştırılarak hazırlanan jelatin nanoliflerin antimikrobiyal yara örtü materyali olarak etkili bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

3.4. Sitotoksosite Testleri Deney Sonuçları

3.4.1. WST-1 Sitotoksosite Test Sonuçları

Elde edilen jelatin ve farklı oranlarda METAK polimeri içeren nanoliflerin fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi WST-1 testi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4’te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Jelatin ve farklı %PMETAK içeriğine sahip nanoliflerin fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi (% Hücre Canlılığı) (Jelatin: jelatinden oluşan nanolif numunesine; %20: %20 PMETAK içeren nanolif numunesine; %40: %40 PMETAK içeren nanolif numunesine; %60: %60 PMETAK içeren nanolif numunesine; %80: %80 PMETAK içeren nanolif numunesine ait sonuçlar)

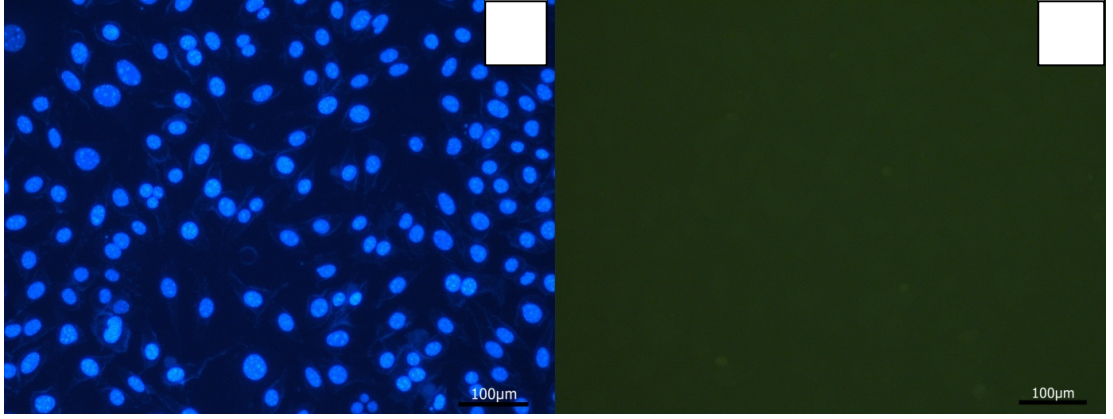
Derişim (µg/mL)	% Hücre Canlılığı				
	Jelatin	%20	%40	%60	%80
100µL	73±2,34	75±1,4	69±2,2	62±4,3	52±3,7
50µL	78±4,60	83,7±0,81	77±4,7	72±3,5	64±1,7
25µL	84±2,53	87±1,1	81±2,4	86±1,2	75±1,2
12,5µL	95±1,87	90±3,02	85±1,4	90±4,08	79±3,8
6,25µL	97±0,5	92±1,2	87±0,7	97±0,39	85±3,5
0	98±0,5	98±1,3	97±1,9	96±1,7	99±2,5

Elde edilen sonuçlara göre METAK yüzdesinin değişimine bağlı olarak toksisitenin değiştiği gözlenmektedir. Ayrıca maddelerin uygulanan miktarı arttıkça toksik etkinin de arttığı gözlenmiş olmakla birlikte sadece %60 ve % 80 PMETAK içeren nanoliflerin 100µg/mL derişimde toksik etkisinin yüksek olduğu belirlenirken, elde edilen diğer derişimlerde ve kullanılan oranlarda toksik etkinin kabul edilebilir aralıkta olduğu görülmektedir. Özellikle %20 ve %40 PMETAK içeren nanoliflerin

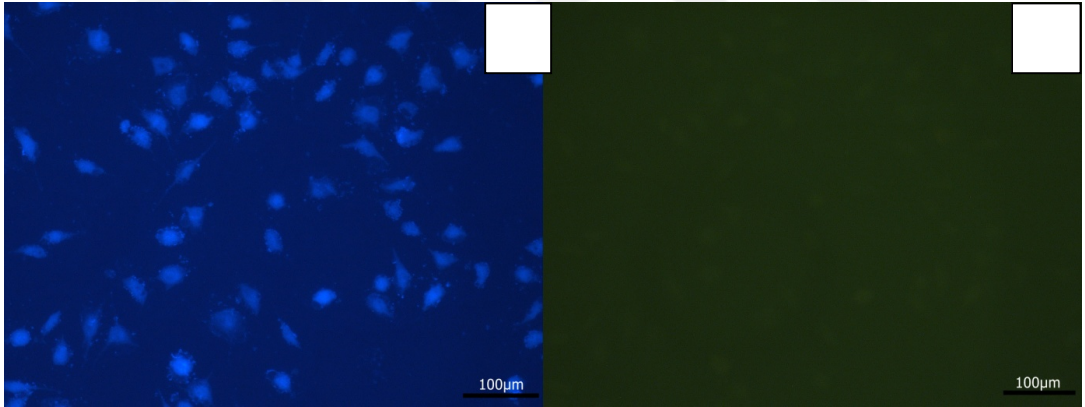
kullanılan tüm konsantrasyonlarda hücrelere karşı düşük toksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Benzer bir çalışma yapan Mohammad Mehrasa ve arkadaşları jelatin ve Poli(laktik-ko-glikolik asit)'ten elektro döndürme yöntemiyle elde ettikleri nanoliflerin sitotoksitesini MTT testi kullanarak kontrol etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada jelatine ve poli(laktik-ko-glikolik asit)'e ait herhangi bir toksik etkiyle karşılaşmamış olup hücrelerin çoğalma hızını ve hücrelerin tutunma oranını arttırdığını bulmuşlardır [241]. Çalışmamızda METAK polimeri jelatin nanoliflerin yapısına antimikrobiyal özellik kazandırmak amacı ile eklenmiştir. Sitotoksite testi yapılmasının amacı biyouyumlu olup olmadığını tam olarak bilmediğimiz METAK polimerini yapıya katmanın nanoliflerin sitotoksitesini etkileyip etkilemediğini görmek içindir. %20 PMETAK katılmış nanolifler bile çok iyi antimikrobiyal özellik göstermektedir. Sonuçlar bize %20 ve %40 PMETAK katılanmış jelatin nanoliflerin, biyouyumlu bir polimer olan jelatinin nanolifleri ile hemen hemen aynı hücre canlılığına sahip olduğunu ve hiçbir sitotoksik etkisinin görülmediğini kanıtlamaktadır.

3.4.2. İkili Boyama Sonuçları

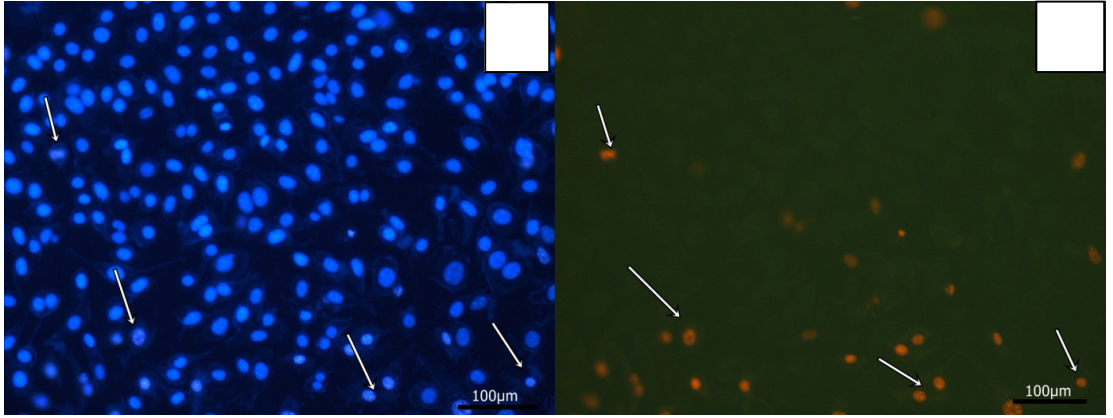
Nanoliflerin apoptotik ve nekrotik etkisi ikili boyama metoduna göre belirlenmiştir. Floresan mikroskop görüntüleri Şekil 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21 ve 3.22'de verilmiştir. Yüzde nekrotik indeks sonuçları ise Çizelge 3.5'te verilmiştir.



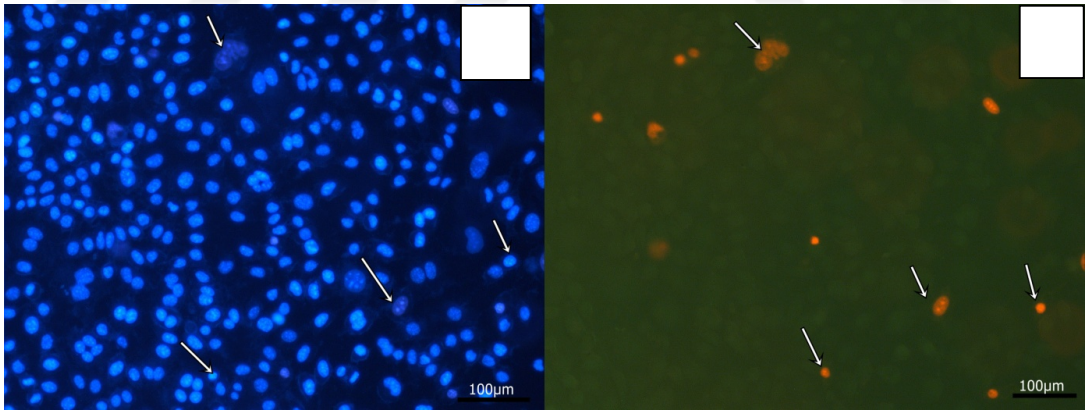
Şekil 3.15. Kontrol grubu (ortamda hiç nanolif bulunmazken) için; A: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, B: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek, 100 µm mesafeyi göstermektedir.



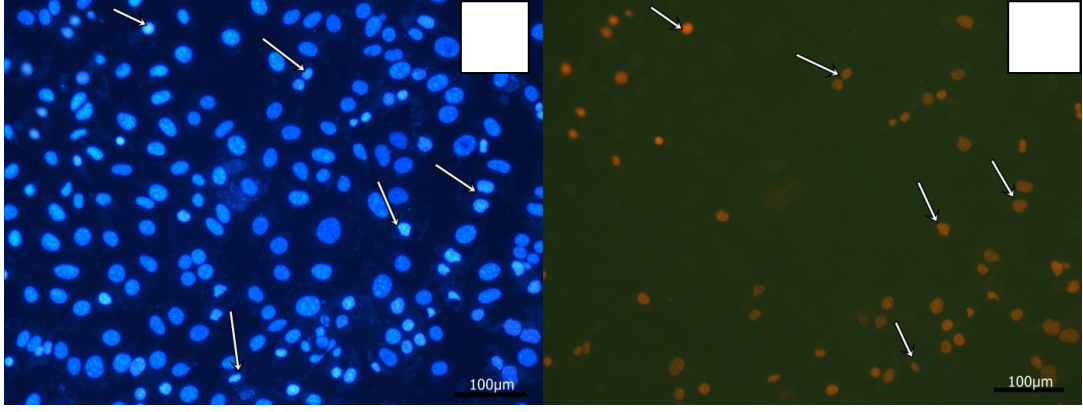
Şekil 3.16. Jelatin nanolif (derişim=6,25 µg/mL) için; C: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, D: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek, 100 µm mesafeyi göstermektedir



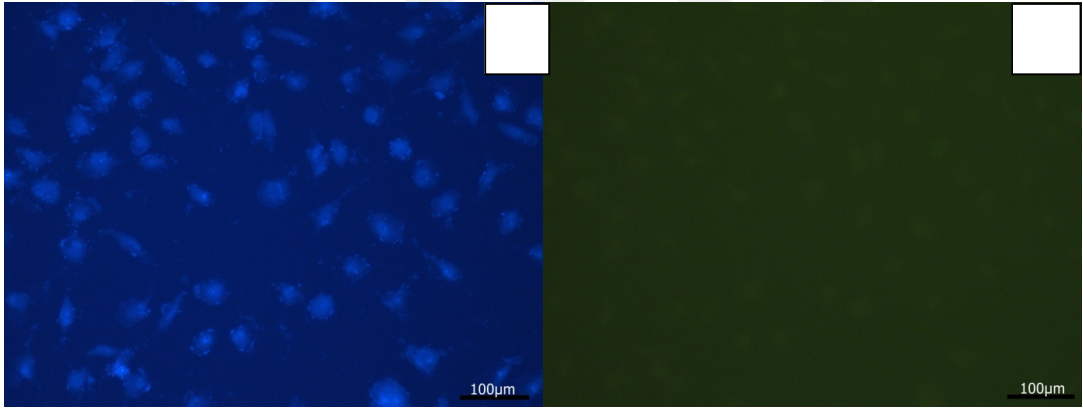
Şekil 3.17. Jelatin nanolif (derişim=200 µg/mL) için; E: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, F: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek, 100 µm mesafeyi göstermektedir



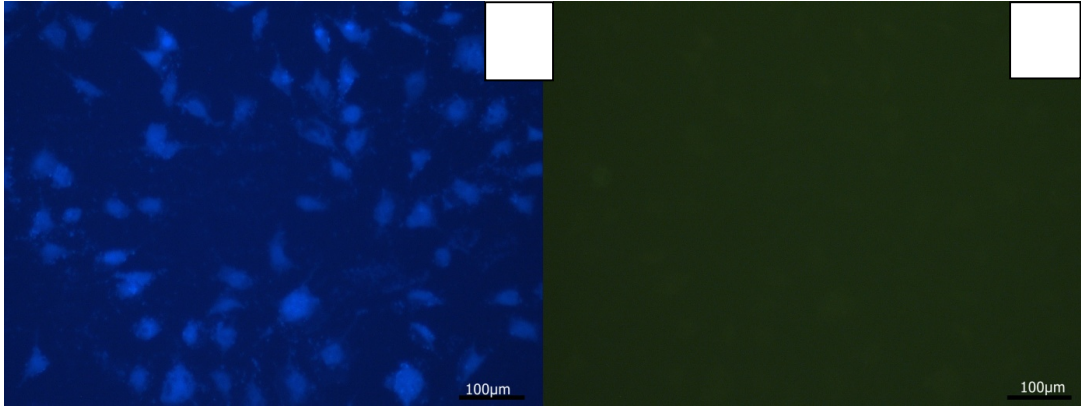
Şekil 3.18. %20 PMETAK içeren nanolif (derişim=6,25 µg/mL) için; G: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, H: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Hücrelerde apoptotik veya nekrotik görüntü bulgularına rastlanmamıştır. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 100µm mesafeyi göstermektedir.



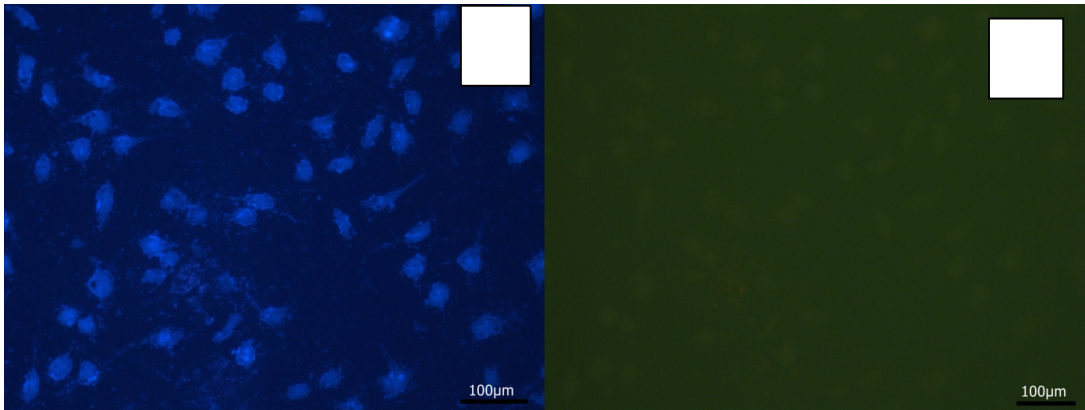
Şekil 3.19. %20 PMETAK içeren nanolif (derişim=100 µg/mL) için; K: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, L: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 100 µm mesafeyi göstermektedir.



Şekil 3.20. %40 PMETAK içeren nanolif (derişim=6,25 µg/mL) için; M: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, N: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek, 100 µm mesafeyi göstermektedir.



Şekil 3.21. %60 PMETAK içeren nanolif (derişim=6,25 µg/mL) için; R: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, S: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 100 µm mesafeyi göstermektedir



Şekil 3.22. %80 PMETAK içeren nanolif (derişim=6,25 µg/mL) için; Ü: İkili boyama sonrası elde edilen apoptotik görüntü, V: İkili boyama sonrası elde edilen nekrotik görüntü. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 100 µm mesafeyi göstermektedir.

Çizelge 3.5. Jelatin ve farklı %PMETAK içeriğine sahip nanoliflerin %nekrotik indeks sonuçları (Jelatin: jelatinden oluşan nanolif numunesine; %20: %20 PMETAK içeren nanolif numunesine; %40: %40 PMETAK içeren nanolif numunesine; %60: %60 PMETAK içeren nanolif numunesine; %80: %80 PMETAK içeren nanolif numunesine ait sonuçlardır)

Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	%Nekroz				
	Jelatin	%20	%40	%60	%80
200 μl	27 $\pm$ 2,71	25 $\pm$ 3,93	31 $\pm$ 1,92	38 $\pm$ 6,14	47 $\pm$ 3,05
100 μl	17 $\pm$ 1,55	21 $\pm$ 1,45	23 $\pm$ 2,28	27 $\pm$ 1,31	39 $\pm$ 3,53
50 μl	9,09 $\pm$ 5,60	13,75 $\pm$ 1,81	19 $\pm$ 2,74	16 $\pm$ 35,59	28 $\pm$ 1,78
25 μl	4 $\pm$ 2,69	11 $\pm$ 1,15	13 $\pm$ 2,22	14,09 $\pm$ 1,22	22 $\pm$ 4,52
12,5 μl	5 $\pm$ 2,89	8 $\pm$ 5,08	10 $\pm$ 4,04	13 $\pm$ 0,07	17 $\pm$ 3,82
6,25 μl	6,06 $\pm$ 2,5	4 $\pm$ 2,21	9 $\pm$ 0,07	9 $\pm$ 1,39	14 $\pm$ 2,57
0	4 $\pm$ 2,5	3 $\pm$ 1,5	3 $\pm$ 2,1	2 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1

Elde edilen sonuçlara göre nanoliflerin fibroblast hücrelerinde apoptotik etkisinin düşük olduğu gözlenmiştir. Elde edilen apoptotik oran kontrol gruplarından farklı olmayıp %2-5 arasında değişmektedir. Nekrotik etkiye bakıldığında ise toksisite oranları ile paralel elde edilmiştir. Konsantrasyona bağlı olarak nekrotik etkinin de arttığı gözlemlenmiştir. Özellikle %80 PMETAK içeren nanoliflerde yüksek konsantrasyonlarda nekrotik indeks oldukça yüksek elde edilmiştir. Fakat %20 ve %40 METAK polimeri içeren nanoliflerde elde edilen nekrotik indeks kabul edilebilir oranlardadır. Yine sonuçlar bize %20 ve %40 PMETAK katkılanmış jelatin nanoliflerin, biyoyumlu bir polimer olan jelatinin nanolifleri ile hemen hemen aynı nekrotik etkiye sahip olduğunu ve hiçbir sitotoksik etkisinin görülmediğini kanıtlamaktadır. Mehdi Sadat-Shojai ve arkadaşları jelatin/hidroksiapatit kullanarak elde ettikleri doku iskelesi ile fare hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada benzer sonuçları elde etmişlerdir [242]. Haram Lee ve arkadaşları kök hücreler ile yaptıkları çalışmada avidin yüklenmiş jelatinden elde edilen nanolifli yapının hücrelerin büyümesini ve yayılmasını önlememesinin yanısıra hiç bir sitotoksik etkisinin görülmediğini bildirmişlerdir [243].

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, elektro döndürme yöntemi kullanılarak hazırlanan jelatin esaslı PMETAK içeren polimerik nanoliflerden antimikrobiyal özellikli yara bandının tasarlanması, üretilmesi, antimikrobiyal özelliği ile vücuda olan uyumluluğunun test edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın birinci kısmında formik asit-asetik asit karışımında çözülmüş farklı oranlarda karıştırılmış jelatin ve METAK polimerlerinden, elektro döndürme metodu ile nanolifler sentezlenmiştir. Sentezlenen nanoliflerin suya olan dayanıklılığını ve mekanik özelliklerini arttırmak amacıyla, nanolifler desikatör içerisinde gluteraldehit buharıyla çapraz bağlanmıştır ve çapraz bağlanmış lifler üzerindeki gluteraldehit kalıntılarının uzaklaştırılması için glisin çözeltisi ile yıkanmıştır. Elde edilen nanolifler SEM, FTIR ve TGA çalışmaları ile karakterize edilmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında ise nanoliflerin antimikrobiyal yara örtü malzemesi olarak kullanılabilirliğini belirlemek için *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* kültürleri ile antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Ayrıca biyolojik olarak parçalanabilirliği için her bir nanolif fosfat tamponu içinde parçalanma testine tabi tutulmuştur ve vücuda olan biyolojik uyumluluğu fibroblast hücreleri kullanılarak sitotoksosite, apoptoz ve nekroz çalışmaları yapılarak değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

1. Jelatin ve jelatin-PMETAK nanolifler başarılı bir şekilde elektro döndürme yöntemi ile üretilmiştir.
2. SEM görüntülerinden elde edilen nanoliflerin homojen boyut dağılımına sahip oldukları, düzgün, pürüzsüz ve boncuksuz yapıda oldukları belirlenmiştir.
3. Elektro döndürme sisteminin; uygulanan voltaj, iğne ile toplayıcı arasındaki mesafe ve polimerin akış hızı gibi parametrelerinin lif çaplarını çok fazla

değiştirmedeği, fakat nanolif içindeki PMETAK yüzdesinin nanoliflerin çaplarını çok fazla etkilediği bulunmuştur.

4. Çapraz bağlama işleminden sonra başlangıçta düz olan nanoliflerin çoğunlukla kesişme noktalarından kuvvetli bir şekilde birbirine bağlandığı ve görünüşte sağlam ve sert bir ağ yapısı meydana getirdikleri belirlenmiştir.
5. FTIR sonuçlarına göre jelatin ve PMETAK'ın başarılı bir şekilde nanolif yapısına girdiği ve birlikte etkili bir şekilde kullanılabileceği görülmüştür.
6. Yine TGA sonuçlarına göre jelatin ve PMETAK'ın başarılı bir şekilde nanolif yapısına girdiği, ayrıca GA ile çapraz bağladıktan sonra nanoliflerin termal kararlılığının önemli derecede arttığı bulunmuştur.
7. Element analizi sonuçlarından nanoliflerin hesaplanan PMETAK içeriklerinin, olması gerekenden daha yüksek çıktığı bulunmuştur.
8. Parçalanma testlerine göre bütün nanoliflerin biyolojik olarak parçalanabilecekleri belirlenmiştir. Bu sonuçlar ayrıca yapıya PMETAK katılmasının nanoliflerin dayanımını arttırdığını da göstermiştir.
9. METAK polimerinin yapıya girmesi ile nanolifler *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı çok iyi antibakteriyel özellik göstermiştir. %20 PMETAK ilavesi bile nanoliflere istenilen antibakteriyel etkiyi kazandırmıştır.
10. Sitotoksikite sonuçları incelendiğinde özellikle %20 ve %40 PMETAK içeren nanoliflerin herhangi bir sitotoksik etki göstermeden başarılı bir şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, antimikrobiyal yara örtü malzemesi olarak önerilen nanoliflerin, kolay uygulanabilmesi, düşük maliyetle ve kısa süre de üretilebilmesi, biyolojik olarak kısa sürede parçalanabilmesi, çok iyi antibakteriyel özellik göstermesi ve sitotoksik etkisinin çok düşük olması gibi üstün özelliklerinden dolayı özellikle sağlık uygulamalarında büyük bir kullanım potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Jayakumar, R., et al., Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology advances*, 2011. 29(3): p. 322-337.
2. Wang, T., et al., Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. *Carbohydrate polymers*, 2012. 88(1): p. 75-83.
3. Miguel, S.P., et al., Thermoresponsive chitosan–agarose hydrogel for skin regeneration. *Carbohydrate polymers*, 2014. 111: p. 366-373.
4. Unnithan, A.R., et al., Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun polyurethane–dextran nanofiber mats containing ciprofloxacin HCl. *Carbohydrate polymers*, 2012. 90(4): p. 1786-1793.
5. Leung, V., et al., Postelectrospinning modifications for alginate nanofiber-based wound dressings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2014. 102(3): p. 508-515.
6. Ahire, J.J. and L.M. Dicks, 2, 3-Dihydroxybenzoic acid-containing nanofiber wound dressings inhibit biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2014. 58(4): p. 2098-2104.
7. Okutan, N., P. Terzi, and F. Altay, Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids*, 2014. 39: p. 19-26.
8. Dongargaonkar, A.A., G.L. Bowlin, and H. Yang, Electrospun blends of gelatin and gelatin–dendrimer conjugates as a wound-dressing and drug-delivery platform. *Biomacromolecules*, 2013. 14(11): p. 4038-4045.
9. Zhao, R., et al., Electrospun chitosan/sericin composite nanofibers with antibacterial property as potential wound dressings. *International journal of biological macromolecules*, 2014. 68: p. 92-97.
10. An, K., et al., Preparation of fish gelatin and fish gelatin/poly (l-lactide) nanofibers by electrospinning. *International journal of biological macromolecules*, 2010. 47(3): p. 380-388.
11. Zhang, S., et al., Gelatin nanofibrous membrane fabricated by electrospinning of aqueous gelatin solution for guided tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009. 90(3): p. 671-679.
12. Rujitanaroj, P.-o., N. Pimpha, and P. Supaphol, Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun gelatin fiber mats containing silver nanoparticles. *Polymer*, 2008. 49(21): p. 4723-4732.
13. Jin, G., et al., In vitro and in vivo evaluation of the wound healing capability of electrospun gelatin/PLLCL nanofibers. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers: Biomedical Applications*, 2014. 29(6): p. 628-645.
14. Aduba, D.C., et al., Semi-interpenetrating network (sIPN) gelatin nanofiber scaffolds for oral mucosal drug delivery. *Acta biomaterialia*, 2013. 9(5): p. 6576-6584.
15. Meng, Z., et al., Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011. 84(1): p. 97-102.
16. Vatankhah, E., et al., Electrospun tecophilic/gelatin nanofibers with potential for small diameter blood vessel tissue engineering. *Biopolymers*, 2014. 101(12): p. 1165-1180.
17. Tonsomboon, K. and M.L. Oyen, Composite electrospun gelatin fiber–alginate gel scaffolds for mechanically robust tissue engineered cornea.

- Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2013. 21: p. 185-194.
18. Ostrovidov, S., et al., Myotube formation on gelatin nanofibers–multi-walled carbon nanotubes hybrid scaffolds. *Biomaterials*, 2014. 35(24): p. 6268-6277.
 19. Lu, W., et al., Gelatin nanofibers prepared by spiral-electrospinning and cross-linked by vapor and liquid-phase glutaraldehyde. *Materials Letters*, 2015. 140: p. 1-4.
 20. Jalaja, K., et al., Modified dextran cross-linked electrospun gelatin nanofibres for biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, 2014. 114: p. 467-475.
 21. Serhan Sakarya, M., et al., Hypochlorous acid: an ideal wound care agent with powerful microbicidal, antibiofilm, and wound healing potency. *Wounds*, 2014. 26(12): p. 342-350.
 22. Bakhshi, H., et al., Synthesis and characterization of antibacterial polyurethane coatings from quaternary ammonium salts functionalized soybean oil based polyols. *Materials Science and Engineering: C*, 2013. 33(1): p. 153-164.
 23. Roy, D., et al., Antibacterial cellulose fiber via RAFT surface graft polymerization. *Biomacromolecules*, 2007. 9(1): p. 91-99.
 24. Basan, P.D.S., *Polimer Kimyası*. 2001, Sivas.
 25. Büyüksarı, M., Polistirenin farklı anhidritlerle modifikasyonu ve bunların hidrazin türevleri ile kondensasyon reaksiyonlarının incelenmesi. 2011, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
 26. Güneş, H.H., Polistirenin çift fonksiyonlaştırılması. 2012, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
 27. Buzoğlu, L., Blok kopolimer sentezi ve biyolojik uygulamaları. 2012, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
 28. Saçak, P.D.M., *Polimer Kimyası*. 2006, Ankara, Gazi Kitabevi.
 29. Ceylan, İ., Açıl gruplu polistirenlerin sentezi ve ürünlerin aldehitlerle reaksiyonlarının incelenmesi. 2011, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
 30. Carraher Jr, C.E., *Carraher's polymer chemistry*. 2013: CRC Press.
 31. Ay, B., *Organik Polimerler Ve Kullanım Alanları*. 2007, Pamukkale Üniversitesi: Denizli.
 32. Hazer, B., *Polimer teknolojisi*. KATÜ Fen Edebiyat Fakültesi, 1993.
 33. A. Okudan, R. Mirzaoglu, A. Kurbanova, Side-chain functionalization of polystyrene with maleic anhydride in the presence of lewis acids. *Journal of applied polymer science*, 1996. 59: p. 235-241.
 34. Saçak, P.D.M., *Polimer Kimyası*. 2002, Ankara: Gazi Kitabevi.
 35. Seçkin, P.D.T., *Polimer Kimyası*. 2015, Ankara: Seçkin Yayınevi.
 36. Emine, K., Polietilen Atıklardan Elde Edilmiş Piroliz Sivisinin Polimerizasyonu. 2007, Ankara Üniversitesi: Ankara. p. 110.
 37. Tsuruta, T., *Polimer Kimyası*, ed. P.D.M. Mustafaev. 2001, İstanbul: Seç Yayın/Dağıtım.
 38. Saçak, M., *Polimer Kimyası*. 1998, Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü.
 39. Saçak, P.D.M., *Polimer Kimyası*. 2008, Ankara: Gazi Kitabevi.
 40. Kamacı, M., Alifatik diizosiyanat bileşiğinden türetilen poli (azometin-üretan) ların sentezi ve karakterizasyonu. 2010, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı.

41. Eygi, M.S., Seramikte Kaolen Kullanımının Polielektrolit Katkısıyla Geliştirilmesi, in Maden Mühendisliği. 2009, İstanbul Teknik Üniversitesi: İstanbul.
42. Elnashaie, S.S.E., F. Danafar, and H.H. Rafsanjani, Nanotechnology for Chemical Engineers. 2015: Springer.
43. Bhardwaj, N. and S.C. Kundu, Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances*, 2010. 28(3): p. 325-347.
44. Magarshak, Y., S. Kozyrev, and A.K. Vaseashta, Silicon versus carbon: fundamental nanoprocesses, nanobiotechnology and risks assessment. 2009: Springer Science & Business Media.
45. Kut, D. and C. Güneşoğlu, Nanoteknoloji ve tekstil sektöründeki uygulamaları. *Tekstil & Teknik Dergisi*, Şubat, 2005: p. 224-230.
46. Süpüren, G., et al., Nano Lifler (Bölüm 1). *Tekstil ve Konfeksiyon*, 2007. 17(1): p. 15-17.
47. Çınar, E., Elektro-eğirme yöntemiyle bor katkılı Bi₂M₃Co₂ oksit,(M= Sr, Ca, Ba) termoelektrik nanokompozit üretimi ve karakterizasyonu. 2013, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
48. Huang, Z.-M., et al., A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites science and technology*, 2003. 63(15): p. 2223-2253.
49. Terzi, P., Elektrodöndürme Yöntemiyle Elde Edilen Jelatin Nanoliflerinin Gıdalarda Kıvam Verici Olarak Kullanılması. 2013, Fen Bilimleri Enstitüsü.
50. Oktay, B., Elektrospin Tekniği İle Hazırlanan Biyopolimer Nanoliflerin Yüzey Modifikasyonları Ve Uygulamaları, Kimya Anabilim Dalı 2015, Marmara Üniversitesi: İstanbul.
51. Bajakova, J., et al. Drawing—The production of individual nanofibers by experimental method. in *Proceedings of the 3rd International Conference on Nanotechnology-Smart Materials (Nanocon'11)*. 2011.
52. Jayaraman, K., et al., Recent advances in polymer nanofibers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2004. 4(1-2): p. 52-65.
53. Kozanoğlu, G., Elektrospinning yöntemi ile nanolif üretim teknolojisi, Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 148s, 2006.
54. Kılıç, A., Eriyikten Elektroüretim Yöntemiyle Polipropilen Nanolif Üretimi, Yüksek lisans tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2008.
55. Raghavan, P., et al., Electrospun polymer nanofibers: the booming cutting edge technology. *Reactive and Functional Polymers*, 2012. 72(12): p. 915-930.
56. Jin, L., et al., Fabrication, Characterization, and Biocompatibility of Polymer Cored Reduced Graphene Oxide Nanofibers. *ACS applied materials & interfaces*, 2016. 8(8): p. 5170-5177.
57. Lee, L.J., Nanoscale Polymer Fabrication for Biomedical Applications, in *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*. 2006, Springer. p. 51-96.
58. Pham, Q.P., U. Sharma, and A.G. Mikos, Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue engineering*, 2006. 12(5): p. 1197-1211.
59. Hu, X., et al., Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, 2014. 185: p. 12-21.

60. Goh, Y.-F., I. Shakir, and R. Hussain, Electrospun fibers for tissue engineering, drug delivery, and wound dressing. *Journal of Materials Science*, 2013. 48(8): p. 3027-3054.
61. Zeng, J., Non-linear electrohydrodynamics in microfluidic devices. *International journal of molecular sciences*, 2011. 12(3): p. 1633-1649.
62. Göktepe, F. and B.B. Mülâyim, Elektrik Alan Lif Çekimi (Elektrospinning) ile Nano Liflerden İplik Üretim Yöntemleri. *Journal of Textiles and Engineer*, 2015. 22(99), 51-67.
63. Haider, A., S. Haider, and I.-K. Kang, A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, 2015.
64. Ghorani, B. and N. Tucker, Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids*, 2015. 51: p. 227-240.
65. Nurwaha, D. and X. Wang, Free surface electrospinning: investigation of the combined effects of process parameters on the morphology of electrospun fibers. *Fibers and Polymers*, 2015. 16(4): p. 850-866.
66. Repanas, A., S. Andriopoulou, and B. Glasmacher, The significance of electrospinning as a method to create fibrous scaffolds for biomedical engineering and drug delivery applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2016. 31: p. 137-146.
67. Jarusuwannapoom, T., et al., Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers. *European Polymer Journal*, 2005. 41(3): p. 409-421.
68. Ahmed, F.E., B.S. Lalia, and R. Hashaikeh, A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications. *Desalination*, 2015. 356: p. 15-30.
69. Kırıştı, M., Plazma muamele edilmiş kitosan/iletken polimer kompozit nanoliflerinin elektroğirme yöntemi ile hazırlanması ve özelliklerinin incelenmesi. 2011, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
70. Fujihara, K., M. Kotaki, and S. Ramakrishna, Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nanofibers. *Biomaterials*, 2005. 26(19): p. 4139-4147.
71. Lee, K., et al., Characterization of nano-structured poly (ϵ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning. *Polymer*, 2003. 44(4): p. 1287-1294.
72. Fennessey, S.F. and R.J. Farris, Fabrication of aligned and molecularly oriented electrospun polyacrylonitrile nanofibers and the mechanical behavior of their twisted yarns. *Polymer*, 2004. 45(12): p. 4217-4225.
73. Fong, H., I. Chun, and D. Reneker, Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer*, 1999. 40(16): p. 4585-4592.
74. Barnes, C.P., et al., Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Advanced drug delivery reviews*, 2007. 59(14): p. 1413-1433.
75. Jackson, M.J. and W. Ahmed, Surface engineered surgical tools and medical devices. 2007: Springer Science & Business Media.
76. Park, J. and R.S. Lakes, *Biomaterials: an introduction*. 2007: Springer Science & Business Media.

77. K.Kılıç, et al., Tam Seramik Materyallerinin Biyouyumluluğunun Mtt Testi Ile Incelenmesi, Evaluation of Biocompatibility of Full Ceramics with MTT Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences), 2010. 19(02) 125-132.
78. Ruan, J.-m. and M. Grant, Biocompatibility evaluation in vitro. part III: cytotoxicity expression of human and animal osteoblasts on the biomaterials. Journal of Central South University of Technology, 2001. 8(3): p. 147-155.
79. Schmalz, G. and D. Arenholt-Bindslev, Biocompatibility of dental materials. Vol. 1. 2009: Springer.
80. Hanks, C.T., J.C. Wataha, and Z. Sun, In vitro models of biocompatibility: a review. Dental Materials, 1996. 12(3): p. 186-193.
81. Chen, H., et al., Biocompatible polymer materials: role of protein-surface interactions. Progress in Polymer Science, 2008. 33(11): p. 1059-1087.
82. Tuncer, S. and M. Demirci, Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 2011. 2011(2).
83. N. Özdemir, Y. Özalp, Biyomateryaller Ve Biyouyumluluk, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, ANKARA.
84. Cui, X.-Y., et al., Advances in in vitro methods to evaluate oral bioaccessibility of PAHs and PBDEs in environmental matrices. Chemosphere, 2016. 150: p. 378-389.
85. Wataha, J.C., Principles of biocompatibility for dental practitioners. The Journal of prosthetic dentistry, 2001. 86(2): p. 203-209.
86. Hussein, K.H., et al., Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. Materials Science and Engineering: C, 2016. 67: p. 766-778.
87. Çelik, N., Sinif V Kaviterlerde Kullanılan Restoratif Materyallerin Sitotoksitesi Ve Dişeti Oluğu Sivisindeki Sitokinlere Etkisi. Doktora tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, 2014.
88. Wilson, S.L., M. Ahearne, and A. Hopkinson, An overview of current techniques for ocular toxicity testing. Toxicology, 2015. 327: p. 32-46.
89. Murray, P.E., C. García Godoy, and F. García Godoy, How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet), 2007. 12(3): p. 258-266.
90. Fotakis, G. and J.A. Timbrell, In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicology letters, 2006. 160(2): p. 171-177.
91. Weyermann, J., D. Lochmann, and A. Zimmer, A practical note on the use of cytotoxicity assays. International Journal of Pharmaceutics, 2005. 288(2): p. 369-376.
92. Putnam, K., D. Bombick, and D. Doolittle, Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. Toxicology in vitro, 2002. 16(5): p. 599-607.
93. Moharamzadeh, K., I.M. Brook, and R. Van Noort, Biocompatibility of resin-based dental materials. Materials, 2009. 2(2): p. 514-548.
94. Dufrane, D., et al., In vitro evaluation of acute cytotoxicity of human chemically treated allografts. European cells & materials, 2001. Vol. 1: p.52-58.

95. Givens, K.T., et al., Proliferation of human ocular fibroblasts. An assessment of in vitro colorimetric assays. *Investigative ophthalmology & visual science*, 1990.
96. Bean, T.A., et al., Comparison of tetrazolium colorimetric and ⁵¹Cr release assays for cytotoxicity determination of dental biomaterials. *Dental Materials*, 1995. 11(5): p. 327-331.
97. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 1983. 65(1-2): p. 55-63.
98. Cell Proliferation Assays: Methods for Measuring Dividing Cells. 2012. <http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/117892-Cell-Proliferation-Assays/> (Eriřim tarihi: 01.10.16).
99. Ngamwongsatit, P., et al., WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *Journal of microbiological methods*, 2008. 73(3): p. 211-215.
100. Majno, G. and I. Joris, Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*, 1995. 146(1): p. 3.
101. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 1972. 26(4): p. 239.
102. Proskuryakov, S.Y., A.G. Konoplyannikov, and V.L. Gabai, Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental cell research*, 2003. 283(1): p. 1-16.
103. Cabadak, H., Hücre siklusu ve kanser. *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2008. 9(3): 51-61.
104. Cimpan, M.R., et al., The coinicator DMABEE induces death by apoptosis and necrosis in human monoblastoid cells. *Clinical oral investigations*, 2005. 9(3): p. 168-172.
105. Smith, P.J., S.A. Morgan, and J.V. Watson, Detection of multidrug resistance and quantification of responses of human tumour cells to cytotoxic agents using flow cytometric spectral shift analysis of Hoechst 33342-DNA fluorescence. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 1991. 27(6): p. 445-450.
106. Durand, R.E. and P.L. Olive, Cytotoxicity, Mutagenicity and DNA damage by Hoechst 33342. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1982. 30(2): p. 111-116.
107. Bhattacharya, S., et al., Direct identification and enrichment of retinal stem cells/progenitors by Hoechst dye efflux assay. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2003. 44(6): p. 2764-2773.
108. Polat, E., Polikaprolaktonun Elektrostatik Eğirmesi ve Rgd Yüzey Modifikasyonu ile Periferik Sinir İyileşme Kanalları Üretim ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, 2013.
109. Jones, K.H. and J.A. Senft, An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1985. 33(1): p. 77-79.
110. Dengler, W.A., et al., Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anti-cancer drugs*, 1995. 6(4): p. 522-532.

111. Gadea, R., et al., Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods. *Food Microbiology*, 2017. 63: p. 58-71.
112. Xie, S., et al., Biodegradable nanoparticles for intracellular delivery of antimicrobial agents. *Journal of Controlled Release*, 2014. 187: p. 101-117.
113. Yagci, M., et al., Antimicrobial polyurethane coatings based on ionic liquid quaternary ammonium compounds. *Progress in Organic Coatings*, 2011. 72(3): p. 343-347.
114. Tezel, U. and S.G. Pavlostathis, Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Current opinion in biotechnology*, 2015. 33: p. 296-304.
115. Zhang, C., et al., Quaternary ammonium compounds (QACs): A review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *Science of the Total Environment*, 2015. 518: p. 352-362.
116. Windler, L., M. Height, and B. Nowack, Comparative evaluation of antimicrobials for textile applications. *Environment international*, 2013. 53: p. 62-73.
117. Bshena, O.E., Synthesis of permanent non-leaching antimicrobial polymer nanofibers. 2012, Stellenbosch: Stellenbosch University.
118. Buffet-Bataillon, S., et al., Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds—a critical review. *International journal of antimicrobial agents*, 2012. 39(5): p. 381-389.
119. Kaur, R. and S. Liu, Antibacterial surface design—Contact kill. *Progress in Surface Science*, 2016. 91(3): p. 136-153.
120. Mousavi, Z.E., et al., Quaternary Ammonium Compounds (QACs) induced inactivation of *Pseudomonas* spp.: Effect of material surface. *Food and Bioproducts Processing*, 2016. 98: p. 71-78.
121. Gao, Y. and R. Cranston, Recent advances in antimicrobial treatments of textiles. *Textile Research Journal*, 2008. 78(1): p. 60-72.
122. Grare, M., et al., Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine. *Clinical Microbiology and Infection*, 2010. 16(5): p. 432-438.
123. Nagamune, H., et al., Evaluation of the cytotoxic effects of bis-quaternary ammonium antimicrobial reagents on human cells. *Toxicology in Vitro*, 2000. 14(2): p. 139-147.
124. Pelipenko, J., P. Kocbek, and J. Kristl, Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. *International journal of pharmaceuticals*, 2015. 484(1): p. 57-74.
125. Tamayol, A., et al., Fiber-based tissue engineering: progress, challenges, and opportunities. *Biotechnology advances*, 2013. 31(5): p. 669-687.
126. Ramezanifard, R., et al., Biomimetic scaffolds containing nanofibers coated with willemite nanoparticles for improvement of stem cell osteogenesis. *Materials Science and Engineering: C*, 2016. 62: p. 398-406.
127. Kabu, S., et al., Drug delivery, cell-based therapies, and tissue engineering approaches for spinal cord injury. *Journal of Controlled Release*, 2015. 219: p. 141-154.
128. Sill, T.J. and H.A. von Recum, Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 2008. 29(13): p. 1989-2006.

129. Gopal, R., et al., Surface modification and application of functionalized polymer nanofibers, in *Molecular Building Blocks for Nanotechnology*. 2007, Springer. p. 72-91.
130. Wade, R.J. and J.A. Burdick, Advances in nanofibrous scaffolds for biomedical applications: From electrospinning to self-assembly. *Nano Today*, 2014. 9(6): p. 722-742.
131. Toh, Y.-C., et al., Cellular responses to a nanofibrous environment. *Nano Today*, 2006. 1(3): p. 34-43.
132. Dersch, R., et al., Nanoprocessing of polymers: applications in medicine, sensors, catalysis, photonics. *Polymers for Advanced Technologies*, 2005. 16(2□3): p. 276-282.
133. Bacakova, L., et al., Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology advances*, 2011. 29(6): p. 739-767.
134. Bottino, M.C., V. Thomas, and G.M. Janowski, A novel spatially designed and functionally graded electrospun membrane for periodontal regeneration. *Acta biomaterialia*, 2011. 7(1): p. 216-224.
135. Pelipenko, J., et al., The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2013. 84(2): p. 401-411.
136. Fang, J., X. Wang, and T. Lin, Functional applications of electrospun nanofibers, in *Nanofibers - production, properties and functional applications*, InTech-Open Access Publisher, Rijeka, Croatia. 2011. pp.287-326.
137. Zilberman, M. and J.J. Elsner, Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *Journal of Controlled Release*, 2008. 130(3): p. 202-215.
138. Marler, J.J., et al., Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Advanced drug delivery reviews*, 1998. 33(1): p. 165-182.
139. Merrell, J.G., et al., Curcumin□loaded poly (ε□caprolactone) nanofibres: Diabetic wound dressing with anti□oxidant and anti□inflammatory properties. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2009. 36(12): p. 1149-1156.
140. Schneider, A., et al., Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing. *Acta Biomaterialia*, 2009. 5(7): p. 2570-2578.
141. Ohgo, K., et al., Preparation of non-woven nanofibers of Bombyx mori silk, Samia cynthia ricini silk and recombinant hybrid silk with electrospinning method. *Polymer*, 2003. 44(3): p. 841-846.
142. Wnek, G.E., et al., Electrospinning of nanofiber fibrinogen structures. *Nano Letters*, 2003. 3(2): p. 213-216.
143. Fang, X. and D. Reneker, DNA fibers by electrospinning. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, 1997. 36(2): p. 169-173.
144. Son, W.K., J.H. Youk, and W.H. Park, Preparation of ultrafine oxidized cellulose mats via electrospinning. *Biomacromolecules*, 2004. 5(1): p. 197-201.
145. Son, W.K., et al., Electrospinning of ultrafine cellulose acetate fibers: studies of a new solvent system and deacetylation of ultrafine cellulose acetate fibers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2004. 42(1): p. 5-11.
146. Jiang, H., et al., Optimization and characterization of dextran membranes prepared by electrospinning. *Biomacromolecules*, 2004. 5(2): p. 326-333.

147. Liang, D., B.S. Hsiao, and B. Chu, Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 2007. 59(14): p. 1392-1412.
148. Kriegel, C., et al., Fabrication, functionalization, and application of electrospun biopolymer nanofibers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008. 48(8): p. 775-797.
149. Bhattarai, N., et al., Alginate-based nanofibrous scaffolds: Structural, mechanical, and biological properties. *Advanced Materials*, 2006. 18(11): p. 1463-1467.
150. Moon, S. and R.J. Farris, Electrospinning of heated gelatin-sodium alginate-water solutions. *Polymer Engineering & Science*, 2009. 49(8): p. 1616-1620.
151. Maghdouri-White, Y., et al., Bioengineered silk scaffolds in 3D tissue modeling with focus on mammary tissues. *Materials Science and Engineering: C*, 2016. 59: p. 1168-1180.
152. Sun, J. and H. Tan, Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials*, 2013. 6(4): p. 1285-1309.
153. Du, F., et al., Gradient nanofibrous chitosan/poly ϵ -caprolactone scaffolds as extracellular microenvironments for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, 2012. 33(3): p. 762-770.
154. Michael, M., et al., Electrospun nanofibre fibrinogen for urinary tract tissue reconstruction. *Biomedical Materials*, 2007. 2(4): p. 257.
155. Ravichandran, R., et al., Mimicking Native Extracellular Matrix with Phytic Acid-Crosslinked Protein Nanofibers for Cardiac Tissue Engineering. *Macromolecular bioscience*, 2013. 13(3): p. 366-375.
156. Khadka, D.B. and D.T. Haynie, Protein-and peptide-based electrospun nanofibers in medical biomaterials. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2012. 8(8): p. 1242-1262.
157. Mathew, A.P., et al., Biocompatible fibrous networks of cellulose nanofibres and collagen crosslinked using genipin: potential as artificial ligament/tendons. *Macromolecular bioscience*, 2013. 13(3): p. 289-298.
158. Junka, R., et al., Laminin functionalized biomimetic nanofibers for nerve tissue engineering. *Journal of biomaterials and tissue engineering*, 2013. 3(4): p. 494-502.
159. Nguyen, T.-H. and B.-T. Lee, Fabrication and characterization of cross-linked gelatin electro-spun nano-fibers. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 2010. 3(12): p. 1117.
160. Matthews, J.A., et al., Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, 2002. 3(2): p. 232-238.
161. Pang, Y., et al., Local delivery of a collagen-binding FGF-1 chimera to smooth muscle cells in collagen scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, 2010. 31(5): p. 878-885.
162. Sahoo, S., et al., PLGA nanofiber-coated silk microfibrinous scaffold for connective tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2010. 95(1): p. 19-28.
163. Wang, G., et al., Electrospun PLGA-silk fibroin-collagen nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2011. 47(3): p. 234-240.

164. Warner, S.B., et al., A fundamental investigation of the formation and properties of electrospun fibers. National textile center annual report, 1998: p. 83-90.
165. Theron, A., E. Zussman, and A. Yarin, Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibres. *Nanotechnology*, 2001. 12(3): p. 384.
166. Kenawy, E.R. and Y.R. Abdel-Fattah, Antimicrobial properties of modified and electrospun poly (vinyl phenol). *Macromolecular Bioscience*, 2002. 2(6): p. 261-266.
167. Yu, D.-G., et al., PVP nanofibers prepared using co-axial electrospinning with salt solution as sheath fluid. *Materials Letters*, 2012. 67(1): p. 78-80.
168. Dai, X.-Y., et al., Electrospun emodin polyvinylpyrrolidone blended nanofibrous membrane: a novel medicated biomaterial for drug delivery and accelerated wound healing. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2012. 23(11): p. 2709-2716.
169. Li, W.J., R.M. Shanti, and R.S. Tuan, Electrospinning technology for nanofibrous scaffolds in tissue engineering. *Nanotechnologies for the life sciences*, Weinheim, 2006.
170. Vaz, C., et al., Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique. *Acta biomaterialia*, 2005. 1(5): p. 575-582.
171. Atala, A., et al., Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *The lancet*, 2006. 367(9518): p. 1241-1246.
172. Boland, E.D., et al., Utilizing acid pretreatment and electrospinning to improve biocompatibility of poly (glycolic acid) for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2004. 71(1): p. 144-152.
173. Zong, X., et al., Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*, 2002. 43(16): p. 4403-4412.
174. Caruso, R.A., J.H. Schattka, and A. Greiner, Titanium dioxide tubes from sol-gel coating of electrospun polymer fibers. *Advanced Materials*, 2001. 13(20): p. 1577-1579.
175. Kenawy, E.-R., et al., Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly (ethylene-co-vinylacetate), poly (lactic acid), and a blend. *Journal of controlled release*, 2002. 81(1): p. 57-64.
176. Liu, H. and Y.L. Hsieh, Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2002. 40(18): p. 2119-2129.
177. Kenawy, E.-R., et al., Electrospinning of poly (ethylene-co-vinyl alcohol) fibers. *Biomaterials*, 2003. 24(6): p. 907-913.
178. Jia, H., et al., Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts. *Biotechnology progress*, 2002. 18(5): p. 1027-1032.
179. Hajra, M., K. Mehta, and G. Chase, Effects of humidity, temperature, and nanofibers on drop coalescence in glass fiber media. *Separation and purification technology*, 2003. 30(1): p. 79-88.
180. Tsai, P.P., H. Schreuder-Gibson, and P. Gibson, Different electrostatic methods for making electret filters. *Journal of Electrostatics*, 2002. 54(3): p. 333-341.
181. Kim, J.s. and D.H. Reneker, Mechanical properties of composites using ultrafine electrospun fibers. *Polymer composites*, 1999. 20(1): p. 124-131.

182. Wang, Y., S. Serrano, and J. Santiago-Aviles, Conductivity measurement of electrospun PAN-based carbon nanofiber. *Journal of materials science letters*, 2002. 21(13): p. 1055-1057.
183. Bognitzki, M., et al., Nanostructured fibers via electrospinning. *Advanced Materials*, 2001. 13(1): p. 70-72.
184. Norris, I.D., et al., Electrostatic fabrication of ultrafine conducting fibers: polyaniline/polyethylene oxide blends. *Synthetic metals*, 2000. 114(2): p. 109-114.
185. MacDiarmid, A., et al., Electrostatically-generated nanofibers of electronic polymers. *Synthetic Metals*, 2001. 119(1): p. 27-30.
186. Liu, B., et al., Electrospun PLLA fibers coated with chitosan/heparin for scaffold of vascular tissue engineering. *Surface and Coatings Technology*, 2013. 228: p. S568-S573.
187. Huang, L., et al., Engineered collagen-PEO nanofibers and fabrics. *Journal of biomaterials science, Polymer edition*, 2001. 12(9): p. 979-993.
188. Huang, L., R.P. Apkarian, and E.L. Chaikof, High-resolution analysis of engineered type I collagen nanofibers by electron microscopy. *Scanning*, 2001. 23(6): p. 372-375.
189. Buchko, C.J., et al., Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer*, 1999. 40(26): p. 7397-7407.
190. Jin, H.-J., et al., Electrospinning Bombyx mori silk with poly (ethylene oxide). *Biomacromolecules*, 2002. 3(6): p. 1233-1239.
191. Klotz, B.J., et al., Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends in biotechnology*, 2016. 34(5): p. 394-407.
192. Sahoo, N., et al., Recent advancement of gelatin nanoparticles in drug and vaccine delivery. *International journal of biological macromolecules*, 2015. 81: p. 317-331.
193. Duconseille, A., et al., Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: a review. *Food Hydrocolloids*, 2015. 43: p. 360-376.
194. Kadler, K.E., A. Hill, and E.G. Canty-Laird, Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Current opinion in cell biology*, 2008. 20(5): p. 495-501.
195. Singh, S., et al., Alteration in dissolution characteristics of gelatin-containing formulations. *Pharmaceutical technology*, 2002. 26(4): p. 36-54.
196. Usta, M., et al., Behavior and properties of neat and filled gelatins. *Biomaterials*, 2003. 24(1): p. 165-172.
197. Karim, A. and R. Bhat, Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food hydrocolloids*, 2009. 23(3): p. 563-576.
198. Bigi, A., et al., Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials*, 2002. 23(24): p. 4827-4832.
199. Bigi, A., S. Panzavolta, and K. Rubini, Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 2004. 25(25): p. 5675-5680.
200. Curcio, M., et al., Grafted thermo-responsive gelatin microspheres as delivery systems in triggered drug release. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 2010. 76(1): p. 48-55.

201. Gilsenan, P.M. and S.B. Ross-Murphy, Shear creep of gelatin gels from mammalian and piscine collagens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2001. 29(1): p. 53-61.
202. Fefelova, N.A., et al., Mucoadhesive interactions of amphiphilic cationic copolymers based on [2-(methacryloyloxy) ethyl] trimethylammonium chloride. *International journal of pharmaceutics*, 2007. 339(1): p. 25-32.
203. Buron, C., et al., Mass and charge balance in self-assembled multilayer films on gold. Measurements with optical reflectometry and quartz crystal microbalance. *Journal of colloid and interface science*, 2006. 296(2): p. 409-418.
204. Buron, C., et al., Early steps in layer-by-layer construction of polyelectrolyte films: The transition from surface/polymer to polymer/polymer determining interactions. *Journal of colloid and interface science*, 2007. 314(2): p. 358-366.
205. Khutoryanskiy, V.V., et al., Polyelectrolyte complexes of soluble poly-2-[(methacryloyloxy) ethyl] trimethylammonium chloride and its hydrogels with poly (acrylic acid). *European polymer journal*, 2003. 39(4): p. 761-766.
206. Khutoryanskiy, V., et al., Temperature-responsive linear polyelectrolytes and hydrogels based on [2-(methacryloyloxy) ethyl] trimethylammonium chloride and N-isopropylacrylamide and their complex formation with potassium hexacyanoferrates (II, III). *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2004. 42(3): p. 515-522.
207. Griebel, T., W. Kulicke, and A. Hashemzadeh, Characterization of water-soluble, cationic polyelectrolytes as exemplified by poly (acrylamide-co-trimethylammoniummethylethacryate chloride) and the establishment of structure-property relationships. *Colloid and polymer science*, 1991. 269(2): p. 113-120.
208. Kujawa, P. and J.M. Rosiak, Pulse radiolysis of 2-[(methacryloyloxy) ethyl] trimethylammonium chloride in aqueous solution. *Radiation Physics and Chemistry*, 2000. 57(3): p. 559-563.
209. Wang, J., et al., Fast separation and determination of coumarins in *Fructus cnidii* extracts by CEC using poly (butyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate-co-[2-(methacryloyloxy) ethyl] trimethylammonium chloride) monolithic columns. *Journal of separation science*, 2010. 33(8): p. 1099-1108.
210. Dong, R., et al., Direct synthesis of quaternized polymer brushes and their application for guiding neuronal growth. *Biomacromolecules*, 2010. 11(8): p. 2027-2032.
211. Stopiglia, C.D.O., et al., Antimicrobial activity of [2-(methacryloyloxy) ethyl] trimethylammonium chloride against *Candida* spp. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2012. 29(1): p. 20-23.
212. Mun, G.A., et al., Polyelectrolyte complexes of linear copolymers and hydrogels based on 2-[(methacryloyloxy) ethyl] trimethylammonium chloride and N-isopropylacrylamide. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2004. 42(8): p. 1506-1513.
213. Pandolfi, L., et al., A nanofibrous electrospun patch to maintain human mesenchymal cell stemness. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2017. 28(3): p. 28-44.

214. Tonsomboon, K., A.L. Butcher, and M.L. Oyen, Strong and tough nanofibrous hydrogel composites based on biomimetic principles. *Materials Science and Engineering: C*, 2017. 72: p. 220-227.
215. Chaisiri, O., N. Chanunpanich, and B. Hanpanich. Polycaprolactone fibers gellation with gelatin ground substance: Engineered skin extracellular matrix aims for using as tissue engineering skin. in *The 15th International Conference on Biomedical Engineering*. 2014. Springer.
216. Safdari, M., et al., Preparation and characterization of Ceftazidime loaded electrospun silk fibroin/gelatin mat for wound dressing. *Fibers and Polymers*, 2016. 17(5): p. 744-750.
217. Nada, A.A., et al., Eco-friendly gelatin-based electrospun fibers to control the release of chloramphenicol. *Fibers and Polymers*, 2016. 17(12): p. 1985-1994.
218. Zhan, J., et al., In vitro evaluation of electrospun gelatin–glutaraldehyde nanofibers. *Frontiers of Materials Science*, 2016. 10(1): p. 90-100.
219. Siimon, K., H. Siimon, and M. Järvekülg, Mechanical characterization of electrospun gelatin scaffolds cross-linked by glucose. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2015. 26(1): p. 1-9.
220. Lee, S.J., et al., Electrospun chitosan nanofibers with controlled levels of silver nanoparticles. Preparation, characterization and antibacterial activity. *Carbohydrate polymers*, 2014. 111: p. 530-537.
221. Pezeshki-Modaress, M., H. Mirzadeh, and M. Zandi, Gelatin–GAG electrospun nanofibrous scaffold for skin tissue engineering: Fabrication and modeling of process parameters. *Materials Science and Engineering: C*, 2015. 48: p. 704-712.
222. Visnevskij, C. and R. Makuska, SARA ATRP in Aqueous Solutions Containing Supplemental Redox Intermediate: Controlled Polymerization of [2-(Methacryloyloxy) ethyl] trimethylammonium Chloride. *Macromolecules*, 2013. 46(12): p. 4764-4771.
223. Marcilla, R., et al., Synthesis of novel polycations using the chemistry of ionic liquids. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2005. 206(2): p. 299-304.
224. Huglin, M., Specific refractive index increments of polymers in dilute solution. *Polymer Handbook*, 1989: p. 440.
225. Gong, Y., et al., In vitro and in vivo degradability and cytocompatibility of poly (l-lactic acid) scaffold fabricated by a gelatin particle leaching method. *Acta Biomaterialia*, 2007. 3(4): p. 531-540.
226. Tarus, B., et al., Effect of polymer concentration on the morphology and mechanical characteristics of electrospun cellulose acetate and poly (vinyl chloride) nanofiber mats. *Alexandria Engineering Journal*, 2016. 55(3): p. 2975-2984.
227. Park, B.K. and I.C. Um, Effects of electric field on the maximum electrospinning rate of silk fibroin solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017. 95: p. 8-13.
228. Katti, D.S., et al., Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2004. 70(2): p. 286-296.

229. Tiwari, A.P., et al., Bimodal fibrous structures for tissue engineering: Fabrication, characterization and in vitro biocompatibility. *Journal of colloid and interface science*, 2016. 476: p. 29-34.
230. Cramariuc, B., et al., Fiber diameter in electrospinning process. *Journal of Electrostatics*, 2013. 71(3): p. 189-198.
231. Agarwal, S., A. Greiner, and J.H. Wendorff, Functional materials by electrospinning of polymers. *Progress in Polymer Science*, 2013. 38(6): p. 963-991.
232. Moutsatsou, P., et al., Conductive PANI fibers and determining factors for the electrospinning window. *Polymer*, 2015. 77: p. 143-151.
233. Qian, Y.-F., et al., Cross-linking of gelatin and chitosan complex nanofibers for tissue-engineering scaffolds. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2011. 22(8): p. 1099-1113.
234. Abdollahi, Z., M. Frounchi, and S. Dadbin, Synthesis, characterization and comparison of PAM, cationic PDMC and P (AM-co-DMC) based on solution polymerization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2011. 17(3): p. 580-586.
235. Wang, S., et al., Production of cationic xylan–METAC copolymer as a flocculant for textile industry. *Carbohydrate polymers*, 2015. 124: p. 229-236.
236. Gomes, S., et al., In vitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study. *Materials Science and Engineering: C*, 2015. 46: p. 348-358.
237. Goel, N., et al., Synthesis of antibacterial cotton fabric by radiation-induced grafting of [2-(Methacryloyloxy) ethyl] trimethylammonium chloride (MAETC) onto cotton. *Radiation Physics and Chemistry*, 2009. 78(6): p. 399-406.
238. Dizman, B., M.O. Elasri, and L.J. Mathias, Synthesis and characterization of antibacterial and temperature responsive methacrylamide polymers. *Macromolecules*, 2006. 39(17): p. 5738-5746.
239. Dizman, B., M.O. Elasri, and L.J. Mathias, Synthesis and antibacterial activities of water-soluble methacrylate polymers containing quaternary ammonium compounds. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2006. 44(20): p. 5965-5973.
240. Zhang, Y., et al., Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer*, 2006. 47(8): p. 2911-2917.
241. Mehra, M., et al., Incorporation of mesoporous silica nanoparticles into random electrospun PLGA and PLGA/gelatin nanofibrous scaffolds enhances mechanical and cell proliferation properties. *Materials Science and Engineering: C*, 2016. 66: p. 25-32.
242. Sadat-Shojai, M., M.-T. Khorasani, and A. Jamshidi, A new strategy for fabrication of bone scaffolds using electrospun nano-HAp/PHB fibers and protein hydrogels. *Chemical Engineering Journal*, 2016. 289: p. 38-47.
243. Lee, H., et al., Fabrication of FGF-2 immobilized electrospun gelatin nanofibers for tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016. 93: p. 1559-1566.