



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



HİBRİT NANOFİBER MEMBRANLARININ HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI

DUYGU YÜKSEL DENİZ

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Organik Kimya Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Memet Vezir KAHRAMAN

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Atilla GÜNGÖR

İSTANBUL, 2015



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**HİBRİT NANOFİBER
MEMBRANLARININ
HAZIRLANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE HÜCRE
KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI**

DUYGU YÜKSEL DENİZ

(720808007)

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Organik Kimya Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Memet Vezir KAHRAMAN

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Atilla GÜNGÖR

İSTANBUL, 2015

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Öğrencisi Duygu YÜKSEL DENİZ'in "Hibrit Nanofiber Membranların Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Hücre Kültürü Uygulamaları" başlıklı tez çalışması, 09 Temmuz 2015 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Doç.Dr. M. Vezir KAHRAMAN

(Danışman)

Marmara Üniversitesi(İMZA).....

Prof.Dr. Nilhan KAYAMAN APOHAN

(Üye)

Marmara Üniversitesi(İMZA).....

Prof.Dr. İ. Ersan KALAFATOĞLU

(Üye)

Marmara Üniversitesi(İMZA).....

Prof.Dr. F. Seniha GÜNER

(Üye)

İstanbul Teknik Üniversitesi(İMZA).....

Prof.Dr. Tarık EREN

(Üye)

Yıldız Teknik Üniversitesi(İMZA).....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22.07.2015 tarih ve 2015/15-02 sayılı kararı ile Duygu YÜKSEL DENİZ' in Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Programında Doktora derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Uğur YAHŞİ



ÖNSÖZ

Bu Doktora tez çalışması Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya Programında gerçekleştirilmiştir.

Doktora çalışmam süresince, aktarmış oldukları teorik bilgiler ve deneysel katkılar ile her türlü konuda bana yol gösteren, her zaman kapısını açık tutan, sonsuz sabır ve anlayış gösteren, bana güvenen, potansiyelimi açığa çıkartan ve bu çalışmanın tamamlanmasında sonsuz emeği bulunan tez danışmanım Doç. Dr. M. Vezir KAHRAMAN' a, engin bilgisi, yardımları ve her ihtiyacım olduğunda desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Nilhan KAYAMAN APOHAN' a, doktora tez çalışmam boyunca bana sabretmeyi ve azmetmeyi öğreten eş danışmanım Prof. Dr. Atilla GÜNGÖR' e, hücre kültürü çalışmalarında emeği geçen Prof.Dr. Serap Erdem Kuruca' ya,

Her zaman akademik çalışmalar yapmamı istemiş olan canım Dedem ve muhteşem Kimyager Babaanneme, doktora çalışmasının ne demek olduğunu ailemde tek anlayan ve her ne olursa olsun maddi ve manevi hep yanımda bana destek olan Babişime, desteği, güzel düşünceleri, güveni ve yardımları için Anneme, çalışmalarımı yürütebilmem için bana iş yaşantımda destek olan patronum Ebru Mert' e,

Zorlandığımda hep yardıma koşan can dostum Öğr. Gör. Özlem Yurtsever' e, yeni nesil yetişmekte olan güzel ve akıllı meslektaşım biricik kardeşim Merve' me ve gerek deneylerimde üniversitede gerekse ben bu tezi yazarken evimizde, hep yanımda, desteğim olan hayat arkadaşım, sevdiğim eşim Cesur' uma,

Tüm eğitim, mesleki yaşantım boyunca manevi desteklerini benden esirgemeyen, sevgili aileme;

Sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Benimle gurur duyduğunuzu biliyor ve Sizleri seviyorum

Haziran 2015

Duygu Yüksel Deniz

Hayatımdaki üç önemli Kimyagere...

Omnibus factis felix sum

Zor zorla zor iş yapmak zor

I faced it all, I stood tall

And did it my way...

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	iv
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
YENİLİK BEYANI	xi
SEMBOLLER	xiii
KISALTMALAR	xiv
ŞEKİL LİSTESİ	xv
TABLO LİSTESİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş	1
1.2. Amaç	2
1.3. Nanofiber Nedir?	3
1.4. Nanofiber Üretim Yöntemleri	5
1.4.1. Çekme Yöntemi	5
1.4.2. Faz Ayrımı	6
1.4.3. Kalıp Sentez Yöntemi	7
1.4.4. Kendiliğinden Birleşme Yöntemi	8
1.4.5. Bikomponent Yöntemi	9
1.4.6. Elektrospinning Yöntemi	10

1.5. Elektrosinning Yönteminin Tarihsel Gelişimi	10
1.6. Elektrosinning Yöntemi	17
1.6.1. Damlacık Oluşumu	18
1.6.2. Taylor Konisi Oluşumu	19
1.6.3. Jet Oluşumu	19
1.6.3.1. Kararlı Bölgede Jetin Uzaması	20
1.6.3.2. Kararsız Bölgenin Oluşması (Whipping Kararsızlığı)	20
1.6.3.3. Fiber Formunda Katılma	20
1.6.4. Elektrosinning Yöntemine Etki Eden Faktörler	20
1.6.5. Elektrosinning Yönteminin Avantajları	21
1.7. Doku Mühendisliği	22
1.7.1. Doku İskelesi	22
1.7.2. Doku İskelesi Hazırlama Teknikleri	26
1.8. Hidroksiapatit (HA)	29
1.8.1. Hidroksiapatitin Biyo Uyumluluğu	31
1.8.2. Hidroksiapatitin Sentez Yöntemleri	31
1.9. Kollajen ve Keratin	33
1.9.1. Biyomalzeme olarak Kollajen ve Keratin	34
1.10. Hücre Kültürü Çalışmaları: MTT Testi	36
2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	41
2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	41
2.2. Kullanılan Cihazlar ve Aletler	43
2.3. Deneysel Yöntemler	46
2.3.1. Hidroksiapatit (HA) Sentezi	46
2.3.2. 4- Vinil benzen boronik asit- Hidroksiapatit (4-VBBA-HA) Sentezi	47
2.3.3. Poli(vinilalkol) Esaslı Elektrosinning Kompozisyonlarının Hazırlanması	48
2.3.4. Kollajen Serisi Çözeltilerinin Hazırlanması	48
2.3.5. Keratin Serisi Çözeltilerinin Hazırlanması	48
2.3.6. Elektrosinning	49
2.4. Hibrit Membranların Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler	52
2.4.1. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Analizi	52

2.4.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)	52
2.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	52
2.4.4. Temas Açısı Ölçümleri	52
2.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	52
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	55
3.1. Hidroksiapatit ve 4-Vinil benzen boronik asit- Hidroksiapatit Karakterizasyonu	55
3.1.1. Fourier Transform Infrared Analizi	55
3.1.2. Termogravimetrik Analiz	56
3.1.3. Taramalı Elektron Mikroskobu	58
3.2. Hibrit Nanofiber Membranların Karakterizasyonu	59
3.2.1. Fourier Transform Infrared Analizi	59
3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu	61
3.2.3. Hücre Ekimi Sonrası MTT Testleri	65
3.2.4. Taramalı Elektron Mikroskobu - EDS Ölçümleri	69
3.2.5. Hücre Ekimi Sonrası Taramalı Elektron Mikroskobu	69
3.2.6. Temas Açısı Ölçümleri	73
4. SONUÇLAR	75
KAYNAKLAR	77
EKLER	91
ÖZGEÇMİŞ	127

ÖZET

HİBRİT NANOFİBER MEMBRANLARININ HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI

Bu tez çalışması, UV ışınları kullanılarak çapraz bağlanmış 4-VBBA-HA (4-Vinil benzen boronik asit Hidroksiapatit) / PVA (poli(vinilalkol)) kompozit nanofiber doku iskelesi hazırlanmasına ve bu nanofiberlerdeki hücre kültürü uygulamalarına odaklanmıştır. Amacımız bu nanofiberler ile biyo uyumlu bir madde elde etmek yani başka bir deyişle hücrelerin büyüyebileceği bir iskele, bir ortam tasarlamak olmuştur. Bu tez çalışması iki aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşamada, HA literatüre göre sentezlenmiş ve 4-VBBA-HA elde etmek üzere 4-Vinil benzen boronik asit ile modifiye edilmiştir. PVA çözeltileri hazırlanarak farklı miktarlarda 4-VBBA-HA ilave edilmiştir. Eş zamanlı UV elektrospinning tekniği ile 4-VBBA-HA / PVA kompozit nanofiberler elde edilmiştir. Nanofiberlerin yapı ve morfolojisi kızılötesi Fourier spektroskopisi (FT-IR) tekniği ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Nanofiberlerin hücre uygulamaları ile uyumlu olması için, püskürtme yöntemi ile kollajen çözeltisi ile muamele edilmiştir.

İkinci aşama için; saç, tüy, yün ve tırnağın başlıca yapısal proteini olan keratin seçilerek nanofiber çözeltisine eklenmiştir. Keratin, protein yapılı, ucuz ve biyo uyumlu olduğundan, tekstil sektöründen doku mühendisliğine kadar farklı uygulama alanları bulmuştur. Çalışmamızda insan saçı kaynaklı keratin, hücre kültürü uygulamaları için elde edilen nanofiber doku iskelelerini desteklemektedir. Benzer şekilde aynı anda UV reaktif elektrospinning tekniği ile farklı miktarlarda keratin ihtiva eden 4-VBBA-HA / PVA karışımı ile nanofiber doku iskeleleri hazırlanmıştır. Nanofiberlerin yapı ve morfolojisi kızılötesi Fourier spektroskopisi (FT-IR) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir.

Hücre kültürü uygulamaları için her iki hazırlanan seri de ECV 304, SAOS ve 3T3 hücreleri ile ekilmiştir. MTT testi yapıldı ve hücre canlılığı gözlemlendi. Hücrelerin varlığı ve nanofiber membranların morfolojik özellikleri SEM ile tekrardan incelenmiştir. Kollajen serisine ait MTT çalışmaları incelendiğinde yapıya katılan kollajenin hücre çoğalması için yardımcı olduğunu ve en etkili hücre büyümesinin SAOS hücre tipinde olduğunu göstermiştir. Keratin serisine ait MTT sonuçları incelendiğinde en uygun hücre büyümesinin ECV 304 hücre tipinde olduğu görülmüştür.

Haziran, 2015

Duygu YÜKSEL DENİZ

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF HYBRID NANOFIBER MEMBRANES AND THEIR CELL CULTURE APPLICATIONS

This thesis focused on preparing photo-crosslinked 4-VBBA-HA (4- Vinyl Benzene Boronic Acid- Hydroxy Apatite) / PVA (poly(vinylalcohol)) composite nanofiber scaffold and using the membrane for cell growth applications. With these nanofibers, our objective was to create a medium which was specifically designed to be a biocompatible material, in other words a scaffold, in which living cells could grow. The thesis consists of two phases. On the first phase, HA was synthesized according to literature and modified with 4-Vinylbenzene boronic acid to obtain 4-VBBA-HA. PVA solutions were prepared and 4-VBBA-HA was added in different amounts. By means of the simultaneous UV electrospinning technique 4-VBBA-HA/PVA composite nanofibers were obtained. The structure and the morphology of electrospun membranes were investigated by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) technique and Scanning Electron Microscopy (SEM). For nanofibers to be compatible with cell culture they were treated with collagen solution by spraying method.

For the second phase, keratin was chosen to be added inside the nanofibers for the reasons that it is the major structural fibrous proteins of hair, feathers, wool, and nail. Because keratin is protein based, cheap and biocompatible, it has found applications from tissue engineering to textile industry. Human hair as keratin supports the scaffolds for cell culture applications in this thesis. Similarly simultaneous UV-reactive electrospinning technique is used to fabricate nanofiber scaffolds with 4-VBBA-HA / PVA composite containing different amounts of keratin. The structure and the morphology of electrospun membranes were investigated by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and Scanning Electron Microscopy (SEM).

For the cell culture applications both series were seeded with ECV 304, SAOS and 3T3 cells on the electrospun fibrous scaffolds. MTT assay was performed and their cell viability was observed. For the presence of seeded cells and morphological analysis of the nanofiber membranes SEM analysis were conducted. MTT results for collagen containing nanofibers indicate that collagen had helped for the cells to grow and the most efficient cell growth and viability observed on SAOS type cells. MTT results for the nanofibers that contain keratin showed that ECV 304 was the most suitable cell type for all the nanofibers.

June, 2015

Duygu YÜKSEL DENİZ

YENİLİK BEYANI

HİBRİT NANOFİBER MEMBRANLARININ HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI

Hidroksiapatit esaslı biyo- polimerlerden yapılan doku iskeleleri (scaffold) insan dokularıyla yüksek biyo uyumluluk gösterdiği için biyoaktif hidroksiapatit- polimer kompozitlerine yönelik çalışmalar son zamanlarda artan bir ilgi uyandırmıştır. Bu çalışmanın ilk aşaması olarak hidroksiapatit sentezlenerek sonrasında, 4- Vinil benzen boronik asit ile etkileştirilmiştir. UV ışımaya duyarlı elde edilen bu fonksiyonel grup, poli(vinilalkol) ile elektrospin edilmiştir. Elde edilen nanofiber kompozit malzemeye biyo uyumluluk katması için kollajen ilave edildikten sonra hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Çalışmanın ikinci basamağında elektrospinning işleminden önce yapıya insan saçı kaynaklı keratin ilave edilerek doku iskeleleri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu nanofiberlere hücre kültürü çalışmaları uygulanmıştır. Nanofiberlerin ve hücre kültür çalışmalarının morfolojik yapıları SEM ile incelenmiştir.

Bu tez çalışması ve sonuçları ile iki yayın hazırlanmış olup; çalışmanın ilk kısmı biyomalzeme alanındaki SCI indeks kapsamındaki *International Journal of Polymeric Materials and Biomaterials*, adlı dergide “4-Vinylbenzene Boronic Acid–Hydroxy Apatite/Polyvinyl Alcohol Based Nanofiber Scaffold Synthesized by UV-Activated Reactive Electrospinning” başlığı ile (D. Yüksel Deniz, M. V. Kahraman, S. Erdem Kuruca, M. Süleymanoğlu, A. Güngör) yayınlanmıştır (DOI: 10.1080/00914037.2014.1002130). Çalışmanın ikinci aşaması “UV reactive electrospinning human hair keratin / 4-Vinyl Benzene Boronic Acid– Hydroxyapatite / Poly (Vinyl Alcohol) composite” başlığı ile (D. Yüksel Deniz, M. V. Kahraman, S. Erdem Kuruca) *Polymer Composites* adlı dergide, yayınlanmıştır (DOI: 10.1002/pc.23703).

Tez çalışmasının birinci bölümü 2013 yılında “*Advanced Materials World Congress*” ve daha sonra hücre çalışmaları 2014 yılında “*9th International Materials Technology Conference and Exhibition*” adlı kongrelerde sunulmuştur. Çalışmanın keratin serisi 2015 yılında “*ICAMET 2015 : 17th International Conference on Advanced Material Engineering and Technology Dubai*” kongresinde sözel olarak ve “*2015 International Congress on Chemical, Biological and Environmental Sciences*” kongresinde ise poster olarak sunulmuştur.

Haziran, 2015 Doç. Dr. Memet Vezir KAHRAMAN Duygu YÜKSEL DENİZ

SEMBOLLER

$^{\circ}\text{C}$	: Derece santigrad
cm^{-1}	: Santimetre üzeri $^{-1}$
CO_2	: Karbondioksit
dk	: Dakika
F_g	: Yer çekimi kuvveti
F_E	: Elektrik kuvveti
H	: Kapiler ve toplayıcı arası mesafe
kV	: Kilovolt
L	: R yarıçaplı kapilerin uzunluğu
nm	: Nanometre
r_0	: Damlacık yarıçapı
sa	: Saat
T	: Sıvının yüzey gerilimi
V_c	: Kritik voltaj
α	: Yüzey parametresi
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
ρ	: Sıvı yoğunluğu
γ	: Yüzey gerilimi

KISALTMALAR

ATR-IR	: Seyreltilmiş Toplam Reflektans İnfrared Spektroskopisi
ECM	: Ektra Sellular Matriks (Extra Cellular Matrix)
EDS	: Enerji Dağılım Spektroskopisi
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotid
FTIR	: Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi
MEMO	: 3-trimetoksisililpropilmetakrilat
MTT	: (4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid
PVA	: Poli(vinilalkol)
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
TEOS	: Tetraetilortosilikat
TGA	: Termal Gravimetrik Analiz
UEV	: Uygulanan Elektrik Voltajı
UV	: Ultraviyole
XRD	: X Işını Kırınım Cihazı

ŞEKİL LİSTESİ

	SAYFA
Şekil 1. 1. İnsan saçı ile nanofiberin karşılaştırılması.	4
Şekil 1.2. Çekme yönteminin şematik gösterimi.	5
Şekil 1.3. Faz ayırım yönteminin şematik gösterimi ve elde edilen fiberlerin SEM görüntüsü	6
Şekil 1.4. Kalıp sentez yönteminin şematik gösterimi.	7
Şekil 1.5. Kalıp sentez yöntemiyle elde edilmiş poliakrilat nanofiberin SEM görüntüleri.	8
Şekil 1.6. Peptit molekülünün kimyasal yapısı ve uzaydaki 3 boyutlu görüntüsü, (B): Peptit moleküllerinin nanoboyutta kendiliğinden birleşmesi (C): Peptit nanofiberlerinin TEM görüntüsü. (D): Peptit nanofiberlerinin SEM görüntüsü.	9
Şekil 1.7. Bikomponent lif üretimi ile üretilen liflerin kesit görüntüleri	10
Şekil 1.8. Elektrospinning yönteminin tarihsel gelişimi.	11
Şekil 1.9. Elektrospinning yöntemine alınan ilk patent.	12
Şekil 1.10. Zeleny deney düzeneği.	13
Şekil 1.11. Damlacık ucunda meydana gelen deformasyonlar.	13
Şekil 1.12. Formhals'ın deney düzeneği.	14
Şekil 1.13. Gladding'in tasarlamış olduğu fiber çekim sistemleri.	15

Şekil 1.14. Taylor deney düzeneği.	15
Şekil 1.15. Baumgarten deney düzeneği.	16
Şekil 1.16. Elektrospinning düzeneği.	18
Şekil 1.17. Taylor konisi.	19
Şekil 1.18. Yıllara göre doku iskelesi işlevselliğinin gelişimi.	25
Şekil 1.19. Yıllara göre doku iskelesi çalışma sayısı grafiği.	26
Şekil 1.20. Hidroksiapatitin molekül yapısı.	29
Şekil 1.21. Hidroksiapatite ait sentez şeması.	33
Şekil 1.22. Kollajenin yapısı.	35
Şekil 1.23. İnsan saçında bulunan kükürt yönünden zengin iki aminoasit a) Sistein ve b) Sistinin yapısı.	36
Şekil 1.24. MTT testi reaksiyonu.	37
Şekil 1.25. MTT testi için kullanılan plate düzeneği.	38
Şekil 2.1. Nanofiber Membranların hazırlanması için kullanılan elektrospin düzeneği.	44
Şekil 2.2. Hücre canlılık testleri için kullanılan spektrofotometre	45
Şekil 2.3. 4- Vinil benzen boronik asit- Hidroksiapatit etkileşimi.	47
Şekil 2.4. Elektrospinning işlemi sonrası alüminyum folyo üzerinde elde edilen nanofiberler membranın görüntüsü.	49
Şekil 2.5. MTT testi sonrası nanofiber membranların görüntüsü.	53
Şekil 2.6. MTT testi sonrası SEM görüntülemesi için hazırlanan nanofiber membranların görüntüsü.	54
Şekil 3.1. Hidroksiapatite ait FT-IR Spekturumu.	55

Şekil 3.2. 4- Vinil benzen boronik asit- Hidroksiapatite ait FT-IR Spekturumu.	56
Şekil 3.3. Hidroksiapatite ait Termogram.	57
Şekil 3.4. 4- Vinil benzen boronik asit- Hidroksiapatite ait Termogram.	57
Şekil 3.5. 4- Vinil benzen boronik asit- Hidroksiapatite ait SEM fotoğrafı.	58
Şekil 3.6. F4- Kollajen formülasyonuna ait FT-IR Spektrumu.	60
Şekil 3.7. F2- Keratin formülasyonuna ait FT-IR Spektrumu.	60
Şekil 3.8. F0- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı.	61
Şekil 3.9. F4- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı.	62
Şekil 3.10. F5- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı.	62
Şekil 3.11. F1- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı.	63
Şekil 3.12. F2- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı.	63
Şekil 3.13. F2- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı.	64
Şekil 3.14. F2- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı.	64
Şekil 3.15. F3- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı.	65
Şekil 3.16. Kollajen formülasyonu- SAOS hücre ekimi sonrası MTT grafiği.	66
Şekil 3.17. Kollajen formülasyonu- ECV 304 hücre ekimi sonrası MTT grafiği.	66
Şekil 3.18. Kollajen formülasyonu- 3T3 hücre ekimi sonrası MTT grafiği.	67
Şekil 3.19. Keratin formülasyonu- SAOS hücre ekimi sonrası MTT grafiği.	67
Şekil 3.20. Keratin formülasyonu- ECV 304 hücre ekimi sonrası MTT grafiği.	68
Şekil 3.21. Keratin formülasyonu- 3T3 hücre ekimi sonrası MTT grafiği.	68
Şekil 3.22. F5- Kollajen-3T3 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı.	70

Şekil 3.23. F4- Kollajen-ECV 304 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı.	70
Şekil 3.24. F4- Kollajen-SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı.	71
Şekil 3.25. F1- Keratin-SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı.	71
Şekil 3.26. F2- Keratin-ECV 304 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı.	72
Şekil 3.27. F3- Keratin-3T3 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı.	72
Şekil 3.28. F0 formülasyonuna ait temas açısı fotoğrafı.	73

TABLO LİSTESİ

	SAYFA
Tablo 1.1. Hidroksiapatite ait fiziksel ve mekanik özellikler.	30
Tablo 2.1. Kollajen ve keratin serilerinde uygulanan elektrospinning parametreleri.	50
Tablo 2.2. Kollajen serisi hibrit nanofiber membranların formülasyonları.	51
Tablo 2.3 Keratin serisi hibrit nanofiber membranların formülasyonları.	51
Tablo 3.1. Hidroksiapatit ve 4- Vinil benzen boronik asit- Hidroksiapatite ait TGA sonuçları.	58
Tablo 3.2. F3- Keratin serisine ait SEM-EDS ölçüm değerleri.	69
Tablo 3.3. Kollajen serisinde ölçüm alınabilen nanofiber mebranların temas açısı değerleri.	74
Tablo 3.4. Keratin serisinde ölçüm alınabilen nanofiber mebranların temas açısı değerleri.	74

1. GİRİŞ

1.1. Giriş

Nano Yunanca cüce anlamına gelen “nanos” sözcüğünden türemiştir. Nanometre, bir metrenin milyarda biri (10^{-9} m) uzunluğunu ifade eder. Nano boyutta malzemelerin yapılabileceği ilk defa 1959 yılında Amerikalı fizikçi Richard Feynman tarafından ortaya atılmıştır.

Nano düzeydeki maddeler, bilinen özelliklerinden farklı olarak yeni ve değişik fonksiyonel özellikler gösterdiklerinden dolayı çok çeşitli alanlarda farklı uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu popüler bilim dalı, malzeme bilimi, elektronik, optik, biyoloji, tıp, kimya, eczacılık, kozmetik, tekstil, uzay ve uçak sanayisi gibi birçok alanı kapsamakta ve nanotüpler, nanorobotlar, nanokapsüller, gibi malzemelerin sentezlenmesi ile ilgilenmektedir [1] .

Nanofiberlerin geniş yüzey alanı, esneklik, yüksek gözeneklilik, küçük gözenek boyutu, aksel mukavemet gibi özellikleri çok farklı ve geniş uygulama alanları bulmasına neden olmuştur. Nanofiberler, konvansiyonel liflere göre daha farklı mekanik özellikler gösterir [2-4].

Nanofiberlerin tıptan tekstil alanlarına kadar çok geniş bir kullanım alanı vardır. Bu lifler konvansiyonel liflere göre yüksek gözenekliliği, küçük gözenek boyutları, geniş yüzey alanları gibi özellikleri nedeniyle geniş kullanım alanına sahiptirler. Nanofiberlerin biyomedikal alanında kullanım bulduğu yerler arasında doku mühendisliği, ilaç salınım sistemleri ve yara bezleri sayılabilir. Doku mühendisliği; hastalık, yaralanma veya doğuştan gelen hatalar gibi nedenlerden dolayı zarar gören ekstrasellüler matriksi (ECM) yenilemek ve hücrelere destek sağlamak için “scaffold” (doku iskelesi) üretimini kapsar [5].

Nanofiber sentezi için; çekme, kalıp sentez, faz ayrımı, bikomponent yöntemi ve elektrospinning (elektroeğirme) teknikleri en çok kullanılan yöntemlerdir. Elektrospinning yöntemi nanofiberlerin üretilmesi için en basit yöntemdir. Elektrospinning, çoğunlukla polimerlerin solüsyondan ya da eriyikten çekim ile çapları birkaç mikrometreden birkaç nanometreye kadar değişen kesiksiz lif üretimi için çok

yönlü bir metottur. Bu yöntemin esası polimer çözeltisi veya yüksek potansiyel alanı kullanılarak çok küçük çaplı liflerin üretilmesine dayanır. Bu proseste iğnenin ucunda polimerin kendi yüzey gerilimi tarafından tutulan polimer çözeltisi elektriksel alana tabi tutulur.

Elektrospinning düzenekleri farklı birçok uygulama alanında kullanıma uygun morfolojik özellikleri farklı nanofiberler üretimi için uygun bir metottur.

Doku Mühendisliği, mühendislik ve biyolojinin metot ve prensiplerini kullanarak canlı dokularının yerine geçerek bu dokuların tamirinde, yenilenmesinde ve fonksiyonlarının sağlanmasında kullanılabilecek dokuların hazırlanması ile ilgilenen disiplinler arası bir alandır. Doku mühendisliği; canlı hücrelerin çeşitli yollarla çoğaltılmasını, bunların teşhis, test veya tedavi amaçlarıyla kullanılmasını kapsar. Bunun için hücreler ve biyo malzemeler gibi çalışma alanlarından destek alınır.

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak hücre yapı iskelelerini oluşturan polimerler biyo uyumluluk, biyoparçalanabilirlik, uygun parçalanma oranı, istenilen şekilde proses edilebilirlik ve uygun mekanik özellikler gibi bazı koşulları sağlamalıdır. Her ne kadar biyopolimerler bu gereksinimlerin bir bölümünü karşılasalar bile istenen tüm özellikleri sağlayabilecek yönde modifikasyon gereklidir. Bu amaçla, üzerinde fonksiyonel grup taşıyan diğer polimerik yapılarla modifiye edilmektedir [6]. Bir doku iskelesi; hücrelerin üç boyutlu yapısının ve işlevlerinin devamlılığını sağlamalı ve iletişim ve transporta olanak sağlayacak altyapıda olmalıdır.

Hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, toz veya tanecikli formlarda, çeşitli kemik onarımlarında ve metal protezlerin biyolojik özelliklerini geliştirme amacıyla kaplama olarak geniş olarak kullanılan biyoaktif bir seramiktir [7]. Doğal kemik temel olarak nano boyutta iğneye benzeyen HA kristalleri ve kollajen fiberlerinden oluştuğu için, hidroksiapatitin polimerle modifikasyonunu içeren birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar içerisinde medikal uygulamalarda mükemmel biyo uyumlulukları ve biyoparçalanabilirlikleri sebebiyle biyopolimerler dikkat çekmektedir [8].

1.2. Amaç

Bu çalışmanın amacı iki aşamada özetlenebilir: Birinci aşamada, hidroksiapatitin sentezlenerek polimerlere bağlanması ve ikinci aşamada hazırlanacak olan doku

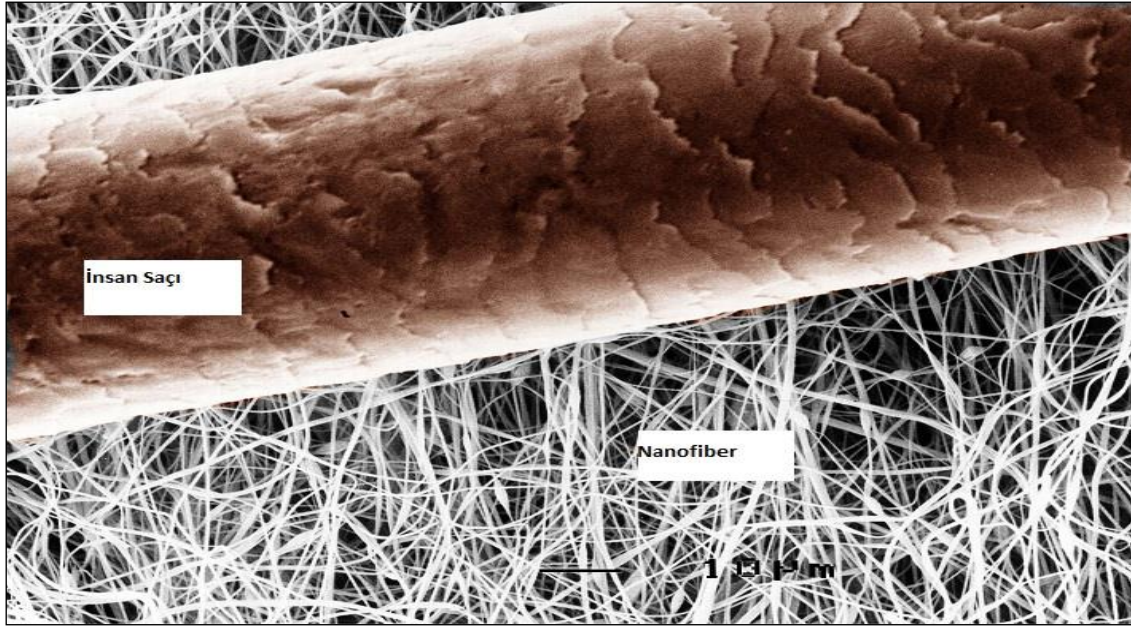
iskelesinin biyomalzeme uygulamaları için kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Hidroksiapatit, 4- Vinil benzen boronik asit ile etkileştirilerek akrilat fonksiyonallitesi kazandırılacak ve daha önceden yapılmış olan literatür çalışmalarından farklı olarak sentezlenecek olan malzeme hidroksiapatite kovalent olarak bağlanacaktır.

Nanofiberlerin mekanik özelliklerini geliştirmek ve hidroksiapatitin homojen dağılmasını sağlamak amaçlanmaktadır. Biyo uyumlu ve inorganik bir malzeme olan hidroksiapatitin, 4- Vinil benzen boronik asit ile modifiye edilerek UV' ye duyarlı fonksiyonel gruba sahip bir molekül haline getirilecektir. Malzeme, poli(vinilalkol) ile elektrospün edilerek nanofiber yapılar elde edilecektir.

İkinci aşamada ise, elektrospinning yöntemi ile elde edilen nanofiber doku iskeleleri, doku mühendisliği çalışmaları için İstanbul Üniversitesi Fizyoloji bölümüne hücre ekimi yapılacak ve doku mühendisliğine uygun olup olmadıkları ve canlılıkları incelenecektir.

1.3. Nanofiber Nedir?

Nano teknoloji devriminin başlamasıyla birlikte nano boyuttaki malzemelerin eşsiz özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Bu nano malzemeler arasında nanofiberler gösterdikleri üstün özellikler nedeniyle, tıp alanından ileri teknoloji ürünlerine kadar çok geniş bir uygulama alanında kullanılabilmektedirler [2, 9]. Nanofiberler basit olarak, çapları nanometre boyutlarında olan fiberler olarak tanımlanabilirler. Şekil 1. 1' de boyutsal olarak insan saçı ile nanofiber çapının karşılaştırılması görülmektedir.



Şekil 1.1. İnsan saçı ile nanofiberlerin karşılaştırılması.

Yeni nesil bir malzeme olan nanofiberler, küçük boyutları sayesinde daha az yapısal kusur taşırlar. Bu sayede oldukça iyi işlevsellik ve mekanik özellikler gösterirler. Nanofiber teknolojisinin sağladığı avantajlardan birisi de, küçülen lif çapları sayesinde ağırlık ya da hacme oranla yüzey alanının inanılmaz derecede yükselmesidir [10].

Nanofiberlerin son ürünlere kazandıracağı özellikler aşağıda belirtilmektedir [11]:

1. İnsan saçından daha ince bir yapıya sahip olmaları,
2. Birim kütleden elde edilebilecek yüzey alanında artış,
3. Farklı çaplarda, çok katlı olabilen, çok kararlı yapılar olmaları,
4. Daha dayanıklı, daha hafif yapılar oluşturmaları,
5. Üretimlerinde daha az malzeme kullanımı,
6. Daha az enerji kullanımı,
7. Filtrelemede yüksek performans göstermeleri,
8. Gözenek boyutlarında kontrol imkânı sağlamaları,
9. Su geçirmezlik, leke tutmazlık, kırılmazlık gibi kumaş performans özelliklerinde yüksek derecede artış sağlamaları, nanofiberlerin son ürüne kattıkları özelliklerden sadece birkaçıdır.

Nanofiberler; doku mühendisliği, filtrasyon, sensör yapımı, koruyucu maske ve kıyafet yapımı, ilaç salınımı, katalizör desteği, optik, yara kapatıcı, polimerik piller ve

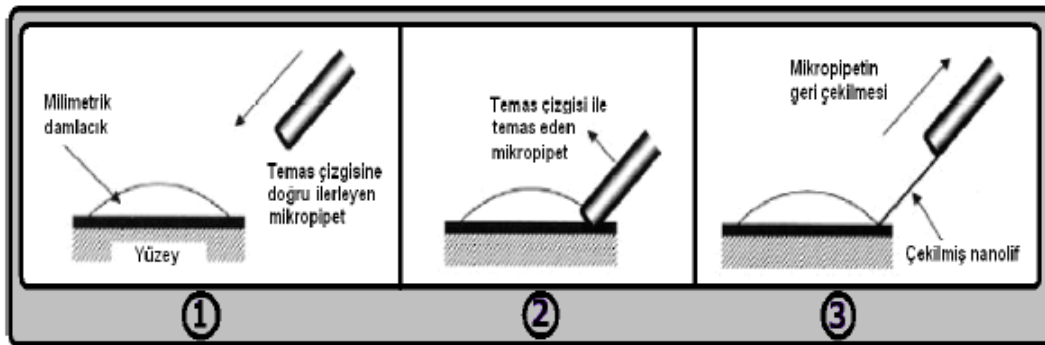
kompozit destekleyicisi olarak birçok alanda uygulama bulmaktadır [2, 3, 4]. Nanofiberler, çekme, kalıp sentez, faz ayırma işlemi, kendiliğinden birleşme ve elektrospinning gibi yöntemlerle üretilmektedir [3, 12, 13].

1.4. Nanofiber Üretim Yöntemleri

Nanofiber üretimi için farklı teknikler mevcuttur. Bunlar çekme, faz ayrımı, kalıp sentez, kendiliğinden birleşme, bikomponent yöntemi ve elektrospinning olarak sayılabilir [14]. Bunların bir kısmı laboratuvar ölçeğinde üretim teknikleridir, endüstriyel uygulamaları yoktur; bir kısmı da endüstriyel uygulamaya yöneliktir. En yeni ve en avantajlı nanofiber üretim tekniği olarak bilinen elektrospinning tekniği ile ise hem laboratuvar ölçeğinde hem de endüstriyel olarak nanofiber üretimi gerçekleştirilebilmektedir [15].

1.4.1 Çekme Yöntemi

Çekme (Drawing), yöntemi ile tek ve uzun nanofiberler elde edilebilmektedir. Bu yöntemde nano veya mikro büyüklükteki taramalı elektron mikroskobu pipetleri polimer damlacığının yüzey ile temas ettiği noktaya daldırılır ve hızlı bir şekilde çekilir. Bu şekilde tek bir fiber elde edilmiş olacaktır. Nanofiberlerin çekilmesi her bir damlacık üzerinde birçok kez tekrarlanabilir. Polimer damlacığından fiber çekilirken çözücü buharlaşması olacak ve fiber katılaşacaktır. Polimer damlacığından fiberin çekim hızı arttıkça fiber yarıçapı küçülecektir [16]. Çekme işlemi Şekil 1.2’de şematik olarak görülmektedir [17].



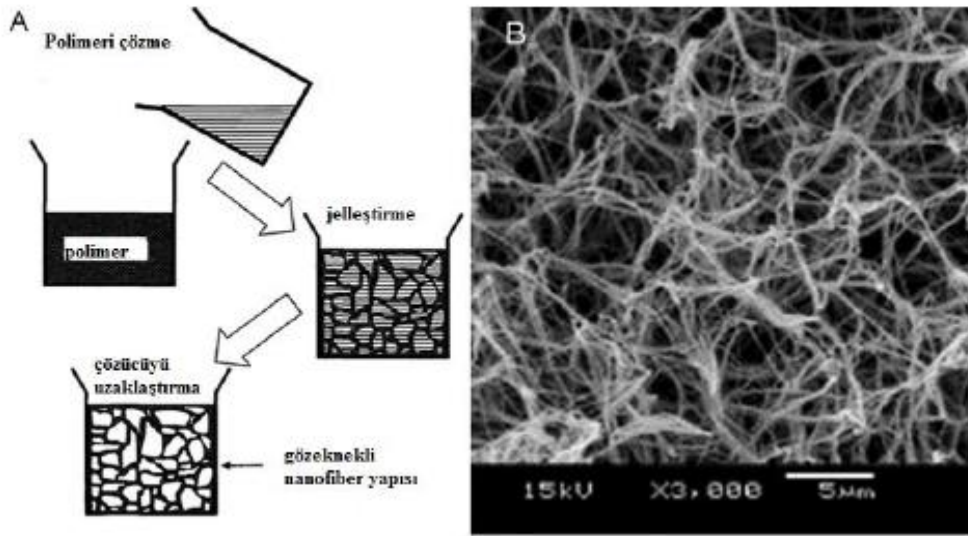
Şekil 1.2. Çekme yönteminin şematik gösterimi [17].

1.4.2 Faz Ayırımı

Faz ayırma (phase separation) metodunun ana mekanizması, iki ayrı sıvı fazın termodinamik olarak ayrılmasıdır. Fazların bir tanesi çözücü, diğeri ise çözücü uzaklaştıktan sonra arda kalan polimerik yapıdır [18]. İşlem genel olarak beş basamaktan oluşmaktadır. Bunlar:

- 1- Polimerin çözülmesi
- 2- Jelleşme
- 3- Çözücü ekstraksiyonu
- 4- Soğutma
- 5- Soğutma-kurutmadır.

Yöntem şematik olarak Şekil 1.3'te gösterilmiştir.



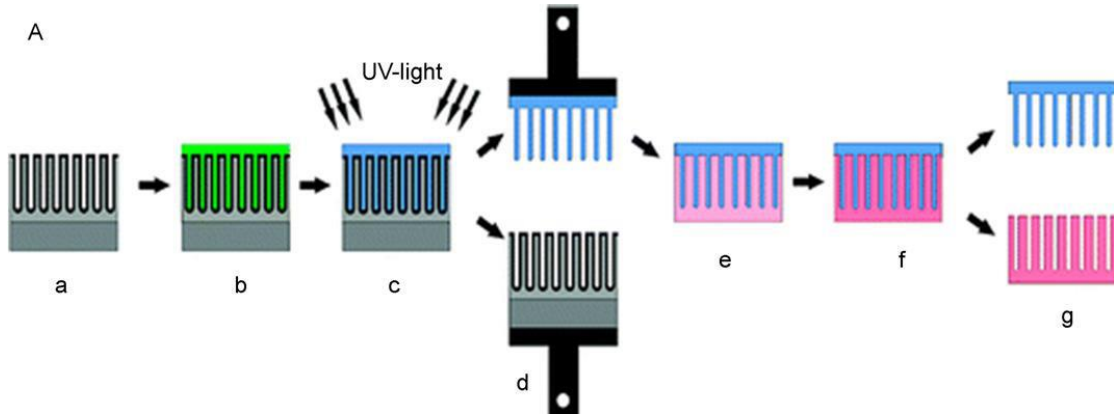
Şekil 1.3. Faz ayırma yönteminin şematik gösterimi ve elde edilen fiberlerin SEM görüntüsü [19].

Yöntem zaman alıcı ve karmaşık bir yöntemdir. Kullanılan polimer tipi, çözücü, konsantrasyon, faz ayırma sıcaklığı, soğutma ve ısıtma basamakları önemli

parametrelerdir. Fiber çapının kontrol edilmesi hem çok zordur hem de yöntem sadece bazı polimerler ile sınırlıdır [20].

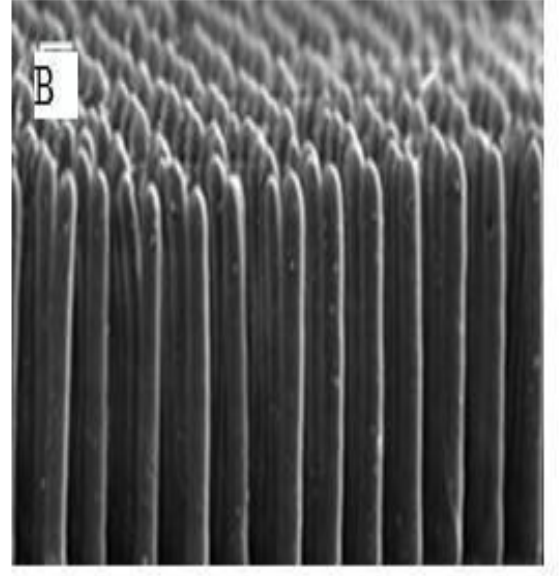
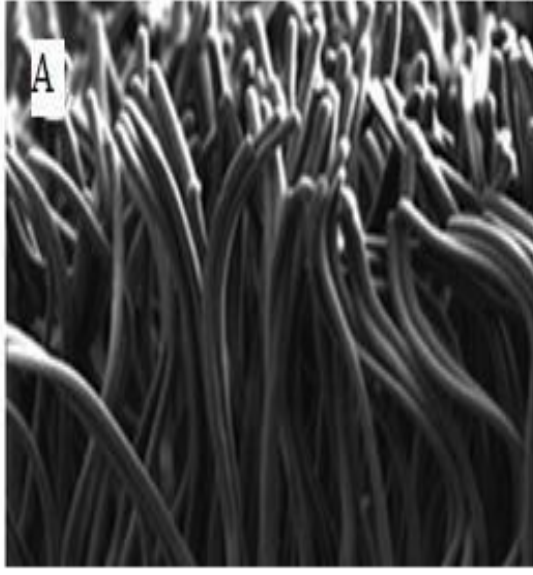
1.4.3 Kalıp Sentez Yöntemi

Kalıp sentez (template synthesis) yöntemi ile nanofiberler özel kalıplar kullanılarak üretilirler. Fiber elde edilecek polimer çözeltisi nano veya mikro büyüklükteki gözeneklere sahip membran üzerine aktarılır ve çözelti üzerine su ve basınç uygulanarak bu gözeneklerden geçmesi sağlanır. Sonuçta istediğimiz şekilde nano ve mikro yapıları oluşturmuş oluruz. Membran kalıp olarak alüminyum ve silika kullanılabilir. Elde edilen fiberlerin çapları yaklaşık 100-200 nm civarındadır [9]. Kalıp sentez yönteminin şematik gösterimi Şekil 1.4'te görülmektedir. Gri renkli olan alüminyum kalıbı, yeşil renk reçineyi, mavi renk polimer nanofiberi ve pembe renk ise silika kalıbı belirtmektedir. Polimer nanofiberler bu kalıplardan, kalıbın tahrip edilmesi veya mekanik kopma ile ayrılırlar.



Şekil 1.4. Kalıp sentez yönteminin şematik gösterimi [21].

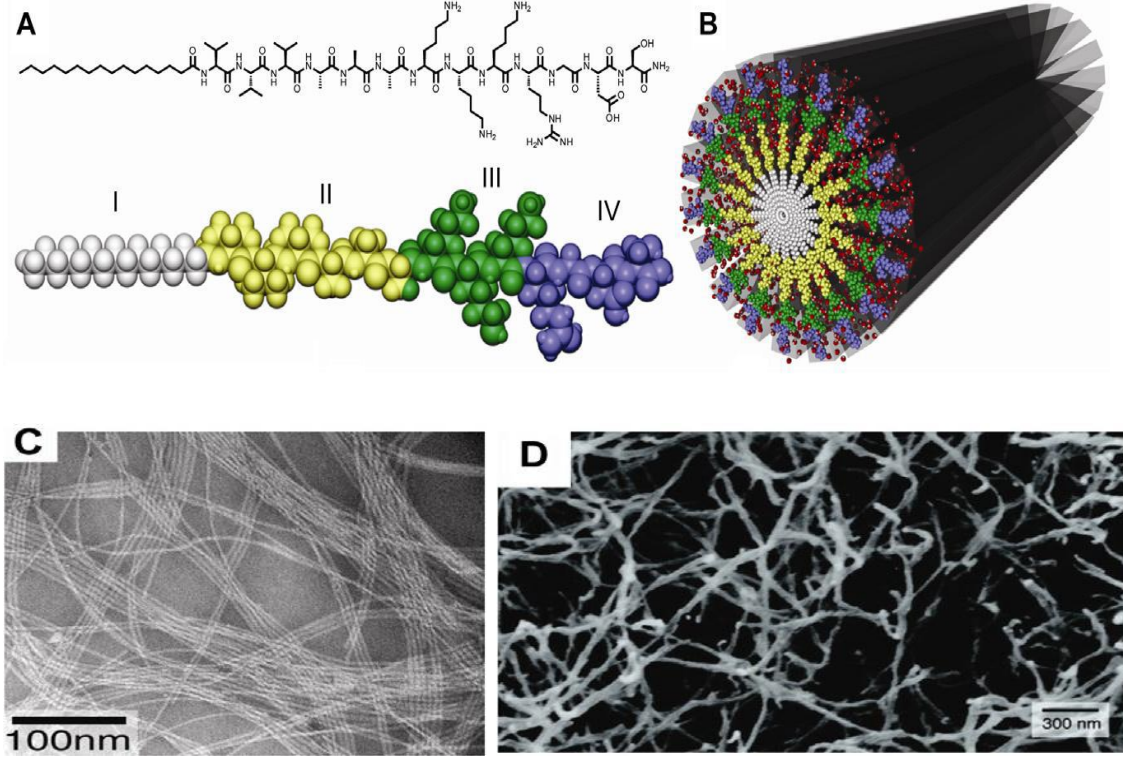
Grimm ve grubu kalıp sentez yöntemiyle çapraz bağlı poliakrilat nanofiberlerini elde etmiştir. Elde edilen nanofiberlerin çapları 120 ile 1000 nm arasında değişmektedir. Nanofiberlerin SEM görüntüleri Şekil 1.5'te görülmektedir.



Şekil 1.5. Kalıp sentez yöntemiyle elde edilmiş poliakrilat nanofiberin SEM görüntüleri [22].

1.4.4 Kendiliğinden Birleşme Yöntemi

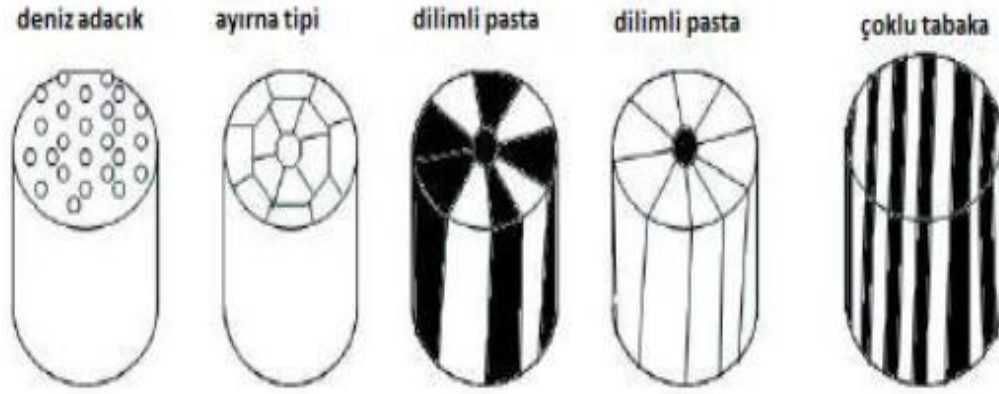
Kendiliğinden birleşme (self assembly) yönteminde, atomlar, moleküller nano boyutta hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, Wan der Walls kuvvetleri ve elektrostatik reaksiyonlar yardımıyla belirli bir düzen oluşturacak şekilde dizilirler. Bu yöntem daha çok peptid nanofiber yapıları oluşturmak için kullanılmaktadır. Peptid yapısını oluşturan aminoasitlerin hidrofilik ve hidrofobik fonksiyonel yapılarının birbirleri ile etkileşimleri sonucunda bir düzen içerisinde dizilirler [23]. Şekil 1.6’da peptid moleküllerine ait kendiliğinden birleşme yapısı görülmektedir.



Şekil 1.6. (A): Peptit molekülünün kimyasal yapısı ve uzaydaki 3 boyutlu görüntüsü, (B): Peptit moleküllerinin nano boyutta kendiliğinden birleşmesi (C): Peptit nanofiberlerinin TEM görüntüsü. (D): Peptit nanofiberlerinin SEM görüntüsü. [23].

1.4.5 Bikomponent Yöntemi

Bikomponent fiber, aynı fiberi oluşturacak farklı iki polimerin aynı düze deliğinden akıtılarak elde edilmesidir. Bikomponent fiberler temel olarak, kesit şekillerine göre iç içe, yan yana, denizde adalar ya da dilimli pasta bikomponent fiberler olarak sınıflandırılırlar [24]. Bazı çift bileşenli fiber örnekleri Şekil 1.7’de verilmiştir. Bunlardan denizde adalar yönteminde fiberler düzgün ya da düzgün dağılmamış ada bölgelerine sahip olabilirler. Yöntemde istenilen oranda karışmış iki polimerin, biri diğerinin eriği içinde süspanse edilir, aynı anda ekstrüzyonu gerçekleştirilir. Ayrıca istenirse bir bileşen ısı ya da çözücü ile ortamdan uzaklaştırılabilir [25, 26].



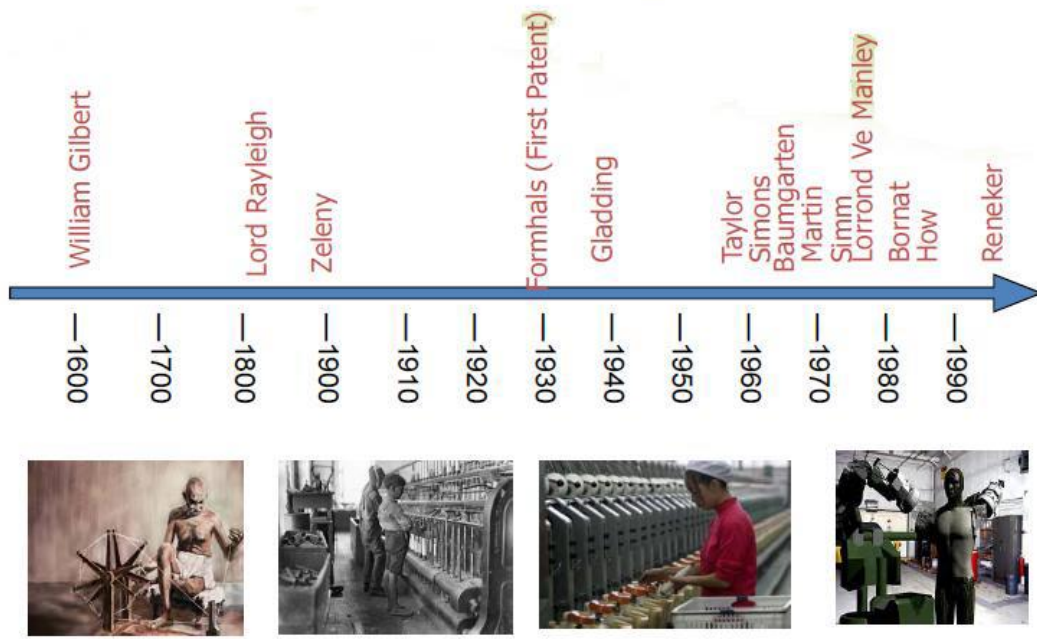
Şekil 1.7. Bikomponent lif üretimi ile üretilen liflerin kesit görüntüleri [27].

1.4.6 Elektrospinning Yöntemi

Elektrospinning, yukarıda bahsedilen yöntemler arasında nanofiber üretimi için en avantajlı, en etkili, kolay uygulanabilen, ucuz ve hızlı yöntemdir. Elektrospinning yöntemi, elektrik alan kuvvetleri yardımı ile polimerlerden fiber oluşumunu sağlar ve bu yöntemle elde edilen fiberlerin çapları nanometre boyutundadır [28, 29].

1.5. Elektrospinning Yönteminin Tarihsel Gelişimi

Elektrospinning, 1600'lü yıllarda William Gilbert'in manyetizma çalışmalarını sürdürürken elektro-manyetizmanın sıvılar üzerine etkisini gözlemlemesiyle ortaya çıkmıştır. Çalışmasında bir su damlasını elektriksel olarak kuru bir yüzeyden belli bir mesafede, bir koni biçiminde çekildiğine işaret etmiştir. İşte bu olay elektro spray ve elektro üretim işleminin başladığı tarihi nokta olarak kabul edilir [30, 31]. Elektrospinning işleminin başlangıçtan günümüze tarihsel gelişim süreci Şekil 1.8'de görülmektedir.

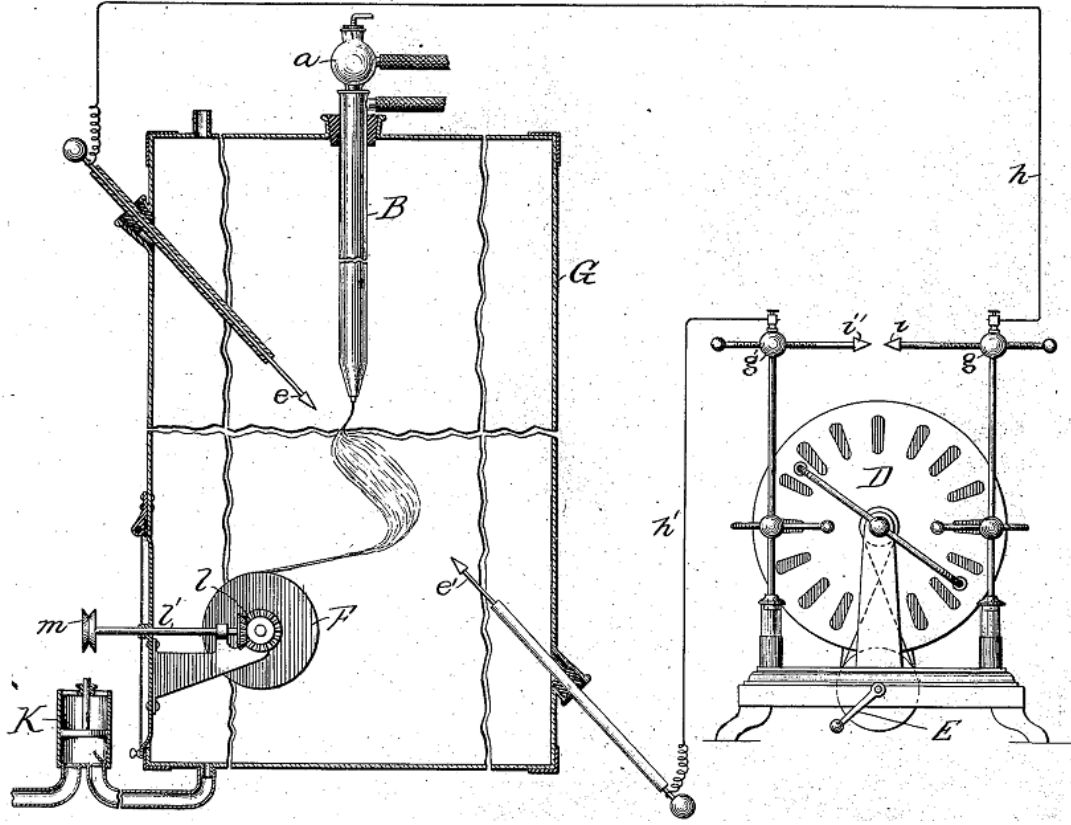


Şekil 1.8. Elektrosinning yönteminin tarihsel gelişimi [32].

1745 yılında Bose yapmış olduğu çalışmalarla sıvıların elektro-hidrokinamik davranışlarını tanımlamıştır [33].

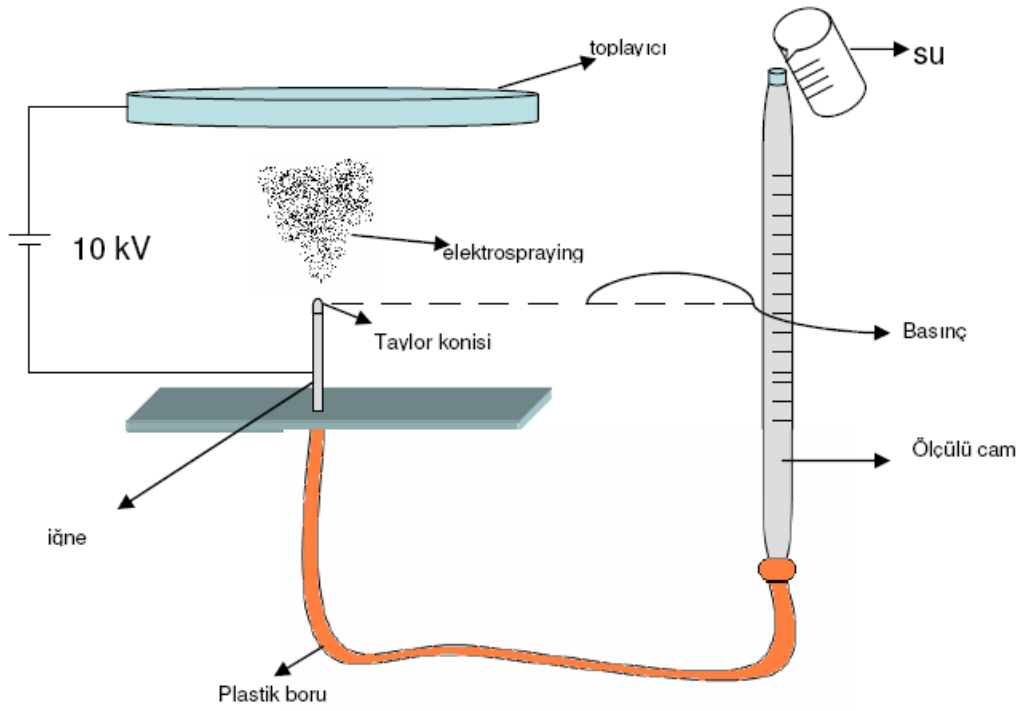
1882 yılında Lord Raleigh elektriksel olarak yüklenmiş sıvı damlacıkları ve bu damlacıkların kararlılıklarını inceleyerek çalışmaları daha ileri bir aşamaya getirmiştir. Rayleigh, elektriksel olarak yüklü bir damlacığın yüzey geriliminin üstünde bir değer aldığı anda damlacığın kararsız bir hal aldığı ve parçalanmanın bu şekilde gerçekleştiğini tahmin etmiştir. Rayleigh' in yaptığı çalışmaların sonucuna göre; sıvı damlacığını etkileyen iki kuvvetin bulunduğunu ve bu kuvvetlerden birinin elektrik kuvveti olduğunu ve diğerinin ise elektrik kuvvetine tam zıt yönde damlacığı etkileyen yüzey gerilimi kuvveti olduğunu göstermiştir. Çalışmalarında elektrik kuvvetinin, yüzey gerilimi kuvvetini yendiği anda damlacığın ince jetlere ayrılarak püskürmeye başladığını göstermiştir [34].

1902 yılında elektrosinning yöntemine ait ilk patent alınmıştır. J.F. Cooley tarafından selüloz nitratin aseton ya da eter içerisindeki çözeltileri kullanarak patentini aldığı düzenek Şekil 1.9'da verilmiştir.



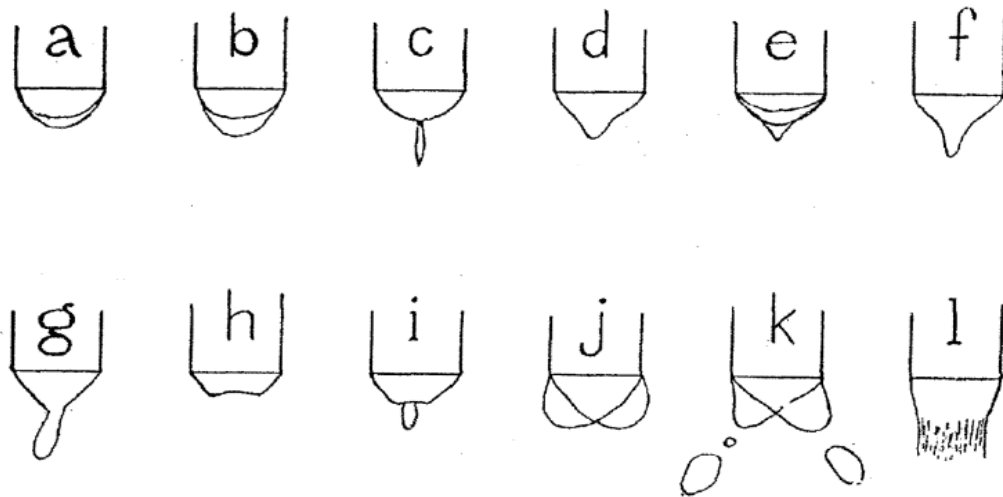
Şekil 1.9. Elektrosinning yöntemine alınan ilk patent [35].

1914 yılında Zeleny elektriksel yükün sıvıların yüzeyleri üzerine olan etkisini incelemiştir. Zeleny, yapmış olduğu çalışmalar sonucunda sıvı damlacık üzerine uygulanacak olan elektriksel kuvvetin, sıvının vizkozitesi ve yüzey gerilimi ile arasında doğru bir orantının olduğunu tespit etmiştir. Yani sıvının vizkozitesi ve yüzey gerilimi ne kadar fazla ise sıvı damlacığı püskürtmek için verilmesi gereken elektriksel güçte o kadar fazla olacaktır [36]. Zeleny' nin çalışmış olduğu deney düzeneğinin bir benzeri Şekil 1.10'da görülmektedir.



Şekil 1.10. Zeleny deney düzeneği [27] .

1915 yılında Zeleny sıvı damlacığının ucunda meydana gelen deformasyonları ve damladan jete geçiş durumunu fotoğraflarla incelemiştir. Gözlemin sonucunda oluşan spreyn çözücünün yapısına, uygulanan voltaja ve borunun ucundaki sıvı basıncına bağlı olduğunu belirlemiştir. Elektrostatik kuvvetler ile damlacığının ucunun meydana getirdiği deformasyon şekilleri Şekil 1.11’de görülmektedir [19].

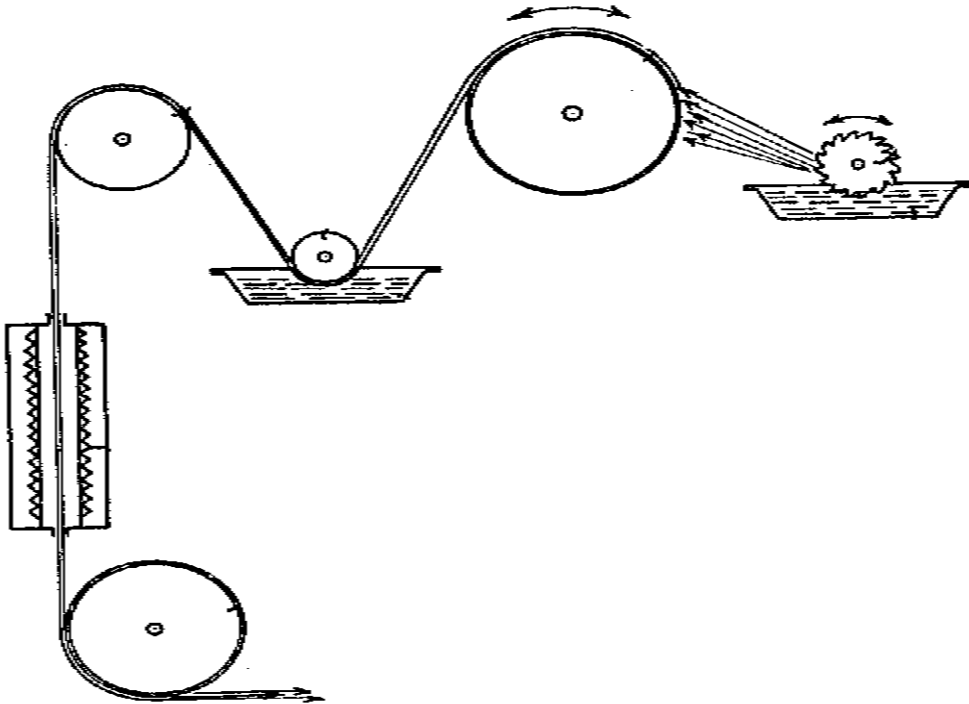


Şekil 1.11. Damlacık ucunda meydana gelen deformasyonlar [19].

Elektro üretim yöntemiyle fiber üretimi hakkındaki ilk patent 1934 yılında Anton Formhals tarafından US Patent, 1-975-504 olarak alınmıştır. Formhals elektriksel kuvvet ile yüklenmiş polimer çözeltisi damlacıklarından suni fiberler üretmiştir [37].

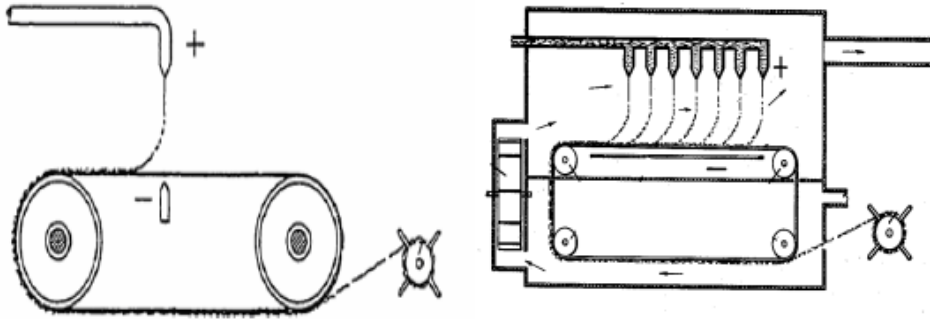
Formhals almış olduğu patentte selüloz asetat polimer çözeltisinden elektro üretim yöntemiyle fiberleri elde etmiştir. Hazırlanan polimer çözeltisi içerisine zıt kutuplara sahip elektrotlardan birini koymuş ve diğer elektrotu ise toplayıcıya monte etmiştir. Bu şekilde polimer damlacığı üzerine elektriksel güç uygulandığında polimer damlacığı filamentler halinde toplayıcı üzerinde birikmiştir. İşlem sırasında polimer damlacığına verilmesi gereken gerilim çözeltinin yapısına, çözünmüş olan polimerin mol ağırlığına ve çözelti vizkozitesine bağlıdır. Formhals 1939 ve 1940 yıllarında almış olduğu patentlerde de polimer çözeltisinin püskürtüldüğü şırınga ile toplayıcı arasındaki mesafenin fiber morfolojisine etkilerini incelemiştir [37].

Formhals' ın patentindeki fiber çekim yöntemi şematik olarak Şekil 1.12'de görülmektedir.



Şekil 1.12. Formhals'ın deney düzeneği [37].

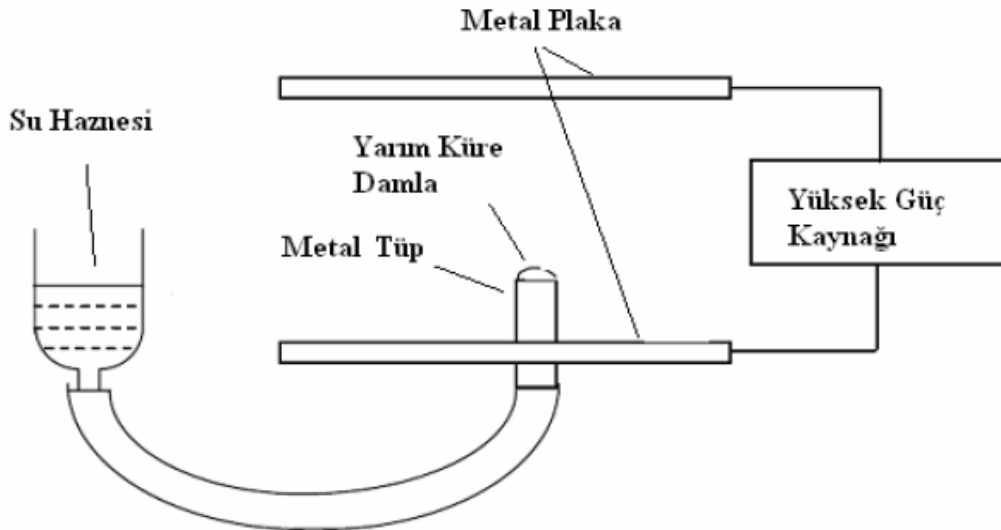
Gladding [38] geliştirmiş olduğu sistemde elektro üretim yöntemiyle elde ettiği fiberleri bir konveyör toplayıcı üzerinde toplamıştır. Bu şekilde elde edilen fiberlerin iplik gibi sarılmasını sağlamıştır. Tasarladığı sistemler şekil 1.13'te görölmektedir.



şekil 1. 13. Gladding'in tasarlamış olduğu fiber çekim sistemleri [38].

1960'lı yıllara gelindiğinde Taylor tarafından yapılan çalışmalarda, elektriksel alan altındaki bir sıvı damlacığının elektriksel olarak yükleneceğini ve uygulanan elektrostatik kuvvetle, sıvı damlacığının koni formunu alacağını ve fazla yüklerin sıvı damlacığının ucundan dışarı doğru çıkacağını ortaya koymuştur [39-41].

Taylor deney düzeneği şekil 1.14'te verilmektedir. Taylor'a göre sıvı damlacığı üzerine uygulanan voltaj eşik değerini geçtiğinde sıvı damlacığı koni formunu almaktadır. Taylor'un kritik voltaja ait denklemi eşitlik 1.1'de verilmiştir [19].



şekil 1.14. Taylor deney düzeneği [27].

$$V_c^2 = 4 \cdot \left(\frac{H^2}{L^2}\right) \cdot \left(\ln \frac{2L}{R} - 1.5\right) \cdot (1.3 \cdot \pi \cdot R \cdot T) \cdot (0.09) \quad (1.1)$$

Eşitlik 1.1. Taylor'un kritik voltaja ait denklemi.

Eşitlikte;

V_c = kritik voltaj

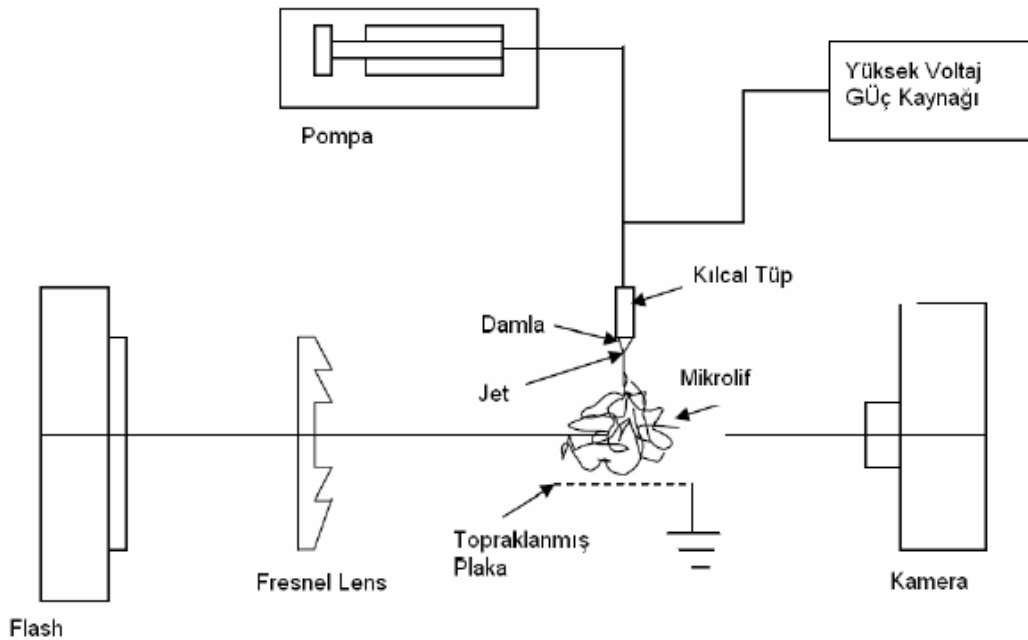
H = kapiler ve toplayıcı arası mesafe

L = R yarıçaplı kapilerin uzunluğu

T = sıvının yüzey gerilimi

1971 yılında Baumgarten, elektro-üretim yöntemiyle akrilik polimerlerden 0.001-1 μm çaplarında, sürekli bir şekilde, lifler üreten bir cihaz geliştirmiştir. Yapılan bu deneyde, lif çapı, çözelti vizkozitesi, jet uzunluğu, debi ve ortam gazı arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Baumgarten'ın tasarlamış olduğu deney düzeneği Şekil 1.15'te görülmektedir.

1977' de Martin, Cockshott ve Fildes elektrospinning yöntemi ile elde edilmiş ve tıbbi amaçla kullanılabilecek lifli ağ yapılarını sentezlemişlerdir.



Şekil 1.15. Baumgarten deney düzeneği [27].

1986 yılında Hayati ve Tadros çalışmalarında elektrik alanın, kararlı jetler oluşturabilme kabiliyetini incelediler. Yayınlarında jet oluşumunu belirleyen en önemli faktörün sıvının iletkenliği olduğunu ortaya koydular. Yüksek iletkenliğe sahip sıvıların, voltaj artışıyla birçok damlaya ayrılabilen jetler oluştururken, yalıtkan malzemelerin yüzeylerinde yük taşıyamaması nedeniyle jetin meydana gelmediğini belirlediler. Yarı iletken sıvılarınsa koni şeklinde kararlı jetler oluşturduğunu gösterdiler [42].

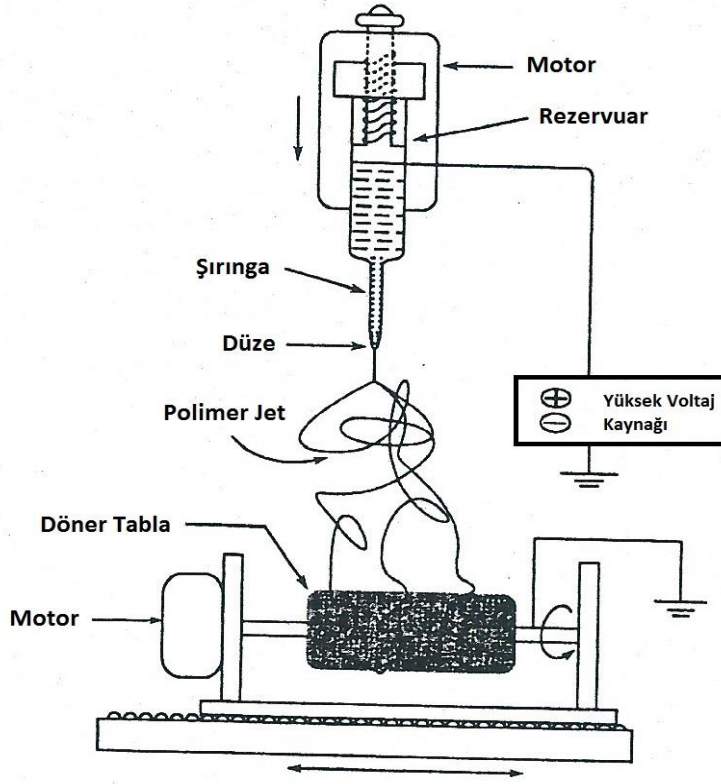
1995 yılına gelindiğinde Reneker ve Doshi tarafından “Elektrospinning” yöntemi geniş alanda kullanılan bir yöntem haline gelmiştir ve birçok organik polimerden elektrospinning yöntemiyle fiberler elde edilmiştir. Bu yıllardan sonra elektrospinning yöntemi hakkında birçok yayın yapılmış ve patent alınmıştır [29, 43, 44].

1.6. Elektrospinning Yöntemi

Elektrospinning yöntemi için gerekli deney düzeneği temelde üç kısımdan oluşur:

1. Yüksek voltaj güç kaynağı
2. Besleme ünitesi
3. Toplama ünitesi

Polimer çözeltisi kılcal incelikte bir borudan beslenir ve yüksek voltaj güç kaynağı ile yüksek değerlerde voltaj uygulanır. Böylece iğnenin ucunda asılı kalan çözelti damlacığı elektrik yüklenmiş olur. Uygulanmakta olan voltaj arttıkça polimer Taylor konisi adı verilen formu alır. Voltaj değeri kritik seviyeye ulaştığında damlacıktaki yüklerin itme kuvvetleri, yüzey gerilimini yener ve böylelikle Taylor konisinin ucundan ince bir jet oluşur ve jet yüzeyindeki aynı elektriksel yüklerin birbirini itmesi ilkesinden hareketle uzayıp incelerek toplayıcıya ilerler. Bu ilerleme spiral bir şekildedir. Yol boyunca çözelti içerisindeki çözücü buharlaşır ve toplayıcıda nano boyutta çaplara sahip polimerik fiber oluşur. Oluşan bu nanofiberler toplayıcı üzerinde rastgele konumlanmıştır. Şekil 1.16’da tipik bir elektrospinning düzeneği görülmektedir.



Şekil 1.16. Elektrosinning düzeneği [45].

Elektrosinning yöntemi sırasındaki aşamalar sırasıyla; damlacık oluşumu, Taylor konisi oluşumu, elektrosin jetinin oluşumu, kararlı bölgede jetin uzaması, kararsız bölgenin oluşumu ve fiber formunda katılaşma olarak sıralanabilir [12].

1.6.1 Damlacık Oluşumu

Bu aşamada eriyik ya da çözelti formundaki sıvı polimer, bir iğne, düze veya kılcal boru ucundan çok düşük hızlarda (örneğin 0.5 ml/sa) çekim bölgesine beslenir. Burada elektrik akımı uygulanmadığı takdirde oluşan damlacığa iki kuvvet etki eder. Bunlardan biri sıvının yüzey gerilimi (γ) ve yer çekimi (F_g) kuvvetidir. Damlacığın yarıçapı r_0 ve kılcal borunun iç yarıçapı R ise

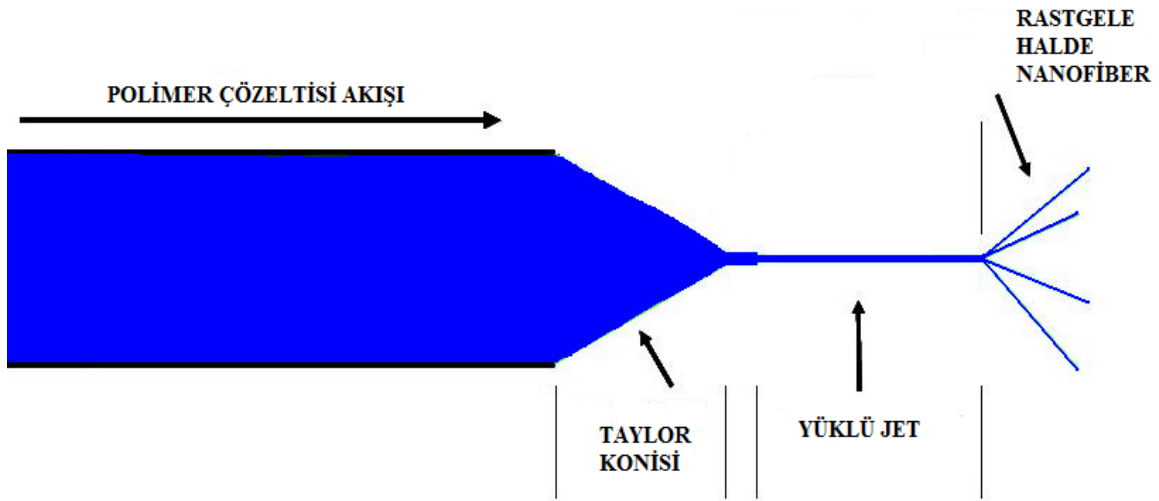
$$r_0 = \left(\frac{3 \cdot R \cdot \gamma}{2 \cdot \rho \cdot g} \right)^{1/3} \quad (1. 2)$$

Eşitlik 1.2. Damlacık oluşum denklemi.

denklemleri elde edilir. Burada, ρ , sıvının yoğunluğu ve g , yer çekimi ivmesidir. Sıvı polimer belirli bir elektrik iletkenliğine sahipken, çözeltiye yeteri kadar yüksek voltaj uygulandığında elektrik kuvveti (F_E), yer çekimi kuvveti (F_g) ile birlikte kılcal yüzey kuvvetlerine karşı etki eder ve kılcal boru ucundaki sürdürülebilir damlacık yarıçapı r' ye düşer. ($r < r_0$) [46].

1.6.2 Taylor Konisi Oluşumu

Kılcal boru ucunda asılı duran çözelti damlacığı, yüzey gerilimi kuvvetlerinin etkisi ile kritik bir voltaj değerine kadar küresel bir formda bulunur. Uygulanan voltaj kritik değere ulaştığında, elektrostatik kuvvetler yüzey gerilimi kuvvetlerine eşitlenir. Bu anda polimer damlası şekil değiştirerek koni biçimini alır. Bu koniye Taylor konisi adı verilir. Polimer damlasının artan voltajın etkisi ile yarı küresel damladan (a) Taylor konisine geçişi (b,c), Taylor konisindeki şekli (d) ve Taylor konisinden jet halinde çıkışı Şekil 1.17’de verilmiştir [44, 48, 49].



Şekil 1.17. Taylor konisi [49].

1.6.3 Jet Oluşumu

Taylor konisi oluşumunu takiben voltajdaki ufak bir artış, polimer damlası koni ucundan jet halinde fişkirır.

1.6.3.1 Kararlı Bölgede Jetin Uzaması

Polimer çözeltisine uygulanan voltaj, kritik voltaj değerini (V_C) geçtiği anda jet başlangıcı gerçekleşir. Oluşan polimer jetinin yüzeyindeki yüklerin coulomb itme kuvvetleri, jeti toplayıcıya doğru uzatan ekstenel bir bileşene sahiptir. Yapılan akışkan hızı ölçümleri göstermiştir ki, Taylor konisinden uzaklaştıkça jet hızı ve jet varyansı da artış göstermektedir. Bunun sonucu olarak jet çapı, jetteki uzama ve çözücünün buharlaşmaya başlamasına bağlı olarak hızla düşmektedir. Jetin incilmesi jetin birim alandaki yüzey yükü azalırken birim kütledeki yüzey alanı artmaktadır [15].

1.6.3.2 Kararsız Bölgenin Oluşması (Whipping Kararsızlığı)

Bir miktar mesafe sonrası koniden fırlayan jet toplayıcıya doğru, jetin içindeki yüklerden kaynaklanan itici elektostatik kuvvetlere bağlı olarak bazı bükülme kararsızlıklarıyla hızla uzamaya devam eder. Daha sonra bükülme kararsızlığından dolayı, jet birçok başka jetlere ayrılabilir. Jetin aynı anda uzaması nedeni ile fiber çapının azalması ve çözücünün buharlaşması ile de yüzey alanının artışı gerçekleşir. Eksen simetrik olmayan ya da whipping kararsızlığı olarak bilinen durumun jet çapını azalttığı gösterilmiştir [19].

1.6.3.3 Fiber Formunda Katılaşma

Polimer jeti kararsız bölgede ilerlerken jet alanının artmasıyla kütle miktarı da artmakta ve çözeltideki çözücü buharlaşmaktadır. Jetin kararsızlık bölgesinden geçtiği süreç aynı zamanda çözücünün buharlaşma hızı ile kontrol edilir. Yüksek buharlaşma hızında bir çözücü kullanıldığında jetin uzama viskozitesi, deformasyonu sağlamak için fazla yüksek kalacak, whipping kararsızlığı kısa sürecek ve buna bağlı olarak daha kalın nanofiberler elde edilecektir. Kullanılan çözücünün uçuculuğu, fiber çapını kontrol etmede önemli rol oynar. Uygun bir çözücünün seçimi, uygun proses parametrelerinde ultra ince nanofiberlerin elde edilmesini sağlar [12].

1.6.4 Elektrosprin Yöntemine Etki Eden Faktörler

Elektrosprin yöntemi ile çözeltiden veya eriyikten nanofiber üretimine birçok değişken etki etmektedir. Bunlar prensip olarak üç ana başlıkta toplanabilir [15, 50]:

1. Polimer çözeltisinden kaynaklanan parametreler

- i. Moleküler ağırlık ve viskozite

- ii. Yüzey gerilimi
- iii. Dielektrik etki
- iv. Çözeltinin iletkenliği
- v. Çözücü uçuculuğu

2. İşlem parametreleri

- i. Uygulanan voltaj
- ii. Çözeltinin akış hızı
- iii. İğne- toplayıcı arası mesafe
- iv. Toplayıcının etkisi
- v. Şırınga çapı

3. Çevresel parametreler

- i. Sıcaklık
- ii. Nem
- iii. Basınç
- iv. Atmosfer cinsi

1.6.5 Elektrospinning Yönteminin Avantajları

Yöntemin avantajları kısaca şu şekilde sıralanabilir [15]:

1. Yatırım ve işletme maliyeti bakımından ucuz bir yöntemdir
2. Yüksek üretim hızına sahiptir
3. Fiber çapı ve fiber özellikleri kontrol edilebilir
4. Ürünler yüksek yüzey alanına ve yüksek gözenekliliğe sahiptir
5. Çok çeşitli polimere uygulanabilir
6. Ürünlerin filtreleme etkinliği yüksektir
7. Fiberler yüksek uzunluk / çap oranına sahiptir
8. Çok çeşitli modifikasyonlara elverişlidir.

Bu avantajların yanı sıra elektrospinning yöntemi için bazı olumsuzluklar da mevcuttur. Organik çözücülerin sebep olduğu toksite ve ağ yapısının mekanik gücü bu olumsuzluklara örnek olarak verilebilir.

1.7. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliğinde temel prensip, hastadan veya başka bir vericiden alınan hücrelerin “biyo uyumlu / biyo bozunur” polimerik bir doku iskelesi (scaffold) üzerinde uygun hücre/doku kültür ortamında geliştirilip üç boyutlu dokuların vücuttaki doğal ve en yakın formda üretilmesi, bu dokuların hasarlı dokuları onarmak için kullanılmasıdır [51]. Doku mühendisliği “Biyomalzeme, hücre ve biyosinyal molekülerini tek başlarına veya birlikte kullanarak canlı dokuların tamiri veya yeniden yapılanması için biyoloji, kimya ve mühendislik ilkelerinin uygulanması” olarak tanımlanmaktadır [52, 53].

Doku mühendisliği hasar görmüş veya deformasyona uğramış doku ve organların yenilenmesini hedefleyen multidisipliner bir alan olup, doku mühendisliğindeki yaklaşımları başlıca dört grupta toplanabilir. Bunlardan birincisi biyomateryallerden hazırlanan doku iskelelerinin uygulanmasıdır. Bu iskeleler yapay hücresel ortam yaratmaktadır. Diğer bir yaklaşım doku iskelesine gerek olmadan yapay doku ve organ oluşturmak için canlı hücrelerin kullanımına dayanmaktadır. Üçüncü yaklaşım ise hücresel büyüme, çoğalma ve farklılaşmayı sağlayan doku iskelelerinin ve biyosinyal moleküllerinin kullanımınıdır. Dördüncü yaklaşım, yapay ve hücresel ortam arasındaki farklılıkları en aza indirmek için doku iskelesini, biyosinyal moleküllerini ve canlı hücrelerin üçünün bir arada kullanımını hedefler [54].

1.7.1 Doku İskelesi

Doku iskelesi, üç boyutlu bir yapı oluşturarak elde edilecek hedef dokunun formunu belirler ve hücrelere fiziksel destek oluşturarak, hücrelere tutunarak fonksiyon görmeleri için uygun bir ortam sağlar. Doku mühendisliği uygulamalarında; hedef dokunun oluşturulması için kullanılan hücrelerin, büyüme ve farklılaşma faktörlerinin etkinlikleri büyük oranda içinde bulundukları doku iskelesinin özelliklerine bağlıdır. Doku iskeleleri aynı zamanda; büyüme faktörleri, su, sitokinler ve besinler için rezervuar oluşturur [55,56]. Doku iskelesi olarak kullanılacak biyomateryal, doku ile uyumlu olmalı, uygun gözenek yapısına, gözenek boyutuna, uygun mekanik özelliklere ve biyoparçalanabilirliğe sahip olmalıdır [58, 59].

Doku iskelesi; hücrenin göçüne, büyümesine ve farklılaşmasına altyapı sağlamasının yanı sıra, oluşturulacak dokunun olgunlaşması ve sağlıklı kalması gerekliliklerini de karşılamalıdır. Tüm bu kavramlar çok zor ve karmaşıktır; çünkü mekanik özellikler, yüzey özellikleri, biyobozunum ürünleri ve tüm bunların zamana bağlı *in vitro* ve *in vivo* farklılıkları gibi faktörleri de göz önünde bulundurma zorunluluğu vardır [59, 60]. Doku iskeleleri; sadece biyokimyasal değil, aynı zamanda belli kimyasal ve fiziksel gereklilikleri de karşılamalıdır. Herhangi bir doku iskelesi; hasarlı dokunun, birebir özelliklerine sahip olamasa da, mekanik fonksiyonlarını yerine getirecek sağlamlık ve sertliğe sahip olmalıdır. Örneğin, deriye yönelik hasarda kullanılacak bir doku iskelesi, yara kontraksiyon kuvvetleri karşısında sağlam kalabilmelidir. Kemik doku mühendisliğinde kullanılacak bir fiksasyon sistemine ait bir doku iskelesinin, asıl doku olgunlaşana kadar oluşacak yük bindirici kuvvetlere dayanma zorunluluğu bulunmaktadır [61].

Üç boyutlu doku iskelesi; *in vitro* ya da *in vivo* hücre büyümesi sürecinde, biyomekanik yapısını devam ettirebilmeli ve implantasyon bölgesinde yeniden damarlanmaya zemin hazırlamalıdır. Hücre yapışması, hücre göçü ve tüm dokunun gelişim ve yapılanmasını karşılayabilecek altyapıya sahip olmalıdır. Bu nedenle, doku iskelesinin hangi doku için kullanılması planlanıyorsa o dokuya ait mekanik ve fizikokimyasal özelliklerin göz önünde bulundurulması gerekir. Kişiye özel planlanan doku iskelelerinde tüm bu özelliklerin yanı sıra boyut ve şekil ön plana çıkabilir [61]. Klinik uygulama ve ticarileşme noktasında; yeniden üretilebilirlik, yüksek kalite, üretim maliyeti ve hızı gibi bileşenler de işin içine girmektedirler. Belli bir dokuyu hedeflese bile, ideal bir doku iskelesinin sahip olması gereken özellikleri tam olarak tanımlamak çok güçtür. Bu çerçeveden bakıldığında da doku mühendisliğindeki doku iskelesi uygulamalarının henüz emekleme aşamasında olduğunu söylemek ve üzerinde daha birçok çalışma yapılması gerekliliğini vurgulamak çok yanlış olmaz.

Doku mühendisliği biyomedikal ve mühendislik bilimlerinin canlı hücreler veya doku oluşumunda kullanılan hücrelerin ara yüzlerini tanımlar. En çok kullanılan yöntemde hücreler sentetik olarak elde edilen polimer yapı ve kollajen gibi doğal materyalden oluşan bir iskele üzerine ekilir ve dokunun *in vitro* ortamda oluşumu beklenir. Daha sonra uygun anatomik yere protez olarak yerleştirilir. Bu durumda kullanılan doku iskeleleri genellikle gözenekli bir yapıya sahiptir [28].

Doku iskelesinde dikkat edilmesi gereken ilk kavram gözeneklilik yapısıdır. Gözenek boyutu ve gözeneklilik derecesi önemli doku iskelesi parametreleridir. Makrogözenekler (örneğin 50 μm üzerindeki), hücre yapışmasının artması ve canlılık gibi doku işlevlerinin geliştirilmesi için planlanan doku iskelelerinde tercih edilirler [62]. Örneğin boyut olarak 300 μm üzerindeki gözeneklilik, dokunun damarlanması ile ilişkili olarak daha çok kemik doku mühendisliğinde istenen bir durumdur. Mikro gözenekler (50 μm ve altındakiler) ise; memeli hücrelerinin 10-20 μm olduğu düşünülürse, hücre işlevlerinin iyileştirilmesini hedefleyen doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilirler. Gözeneklilik ve doku iskelesinin mekanik özellikleri arasında yakın bir ilişki söz konusudur. Yüksek miktardaki gözeneklilik (örneğin %90'nın üzerinde), hücre infiltrasyonu ve ekstraselüler matriks oluşumunu destekleyecek biçimde daha fazla toplam gözenek hacmi sunarken, mekanik dayanıklılıkta azalma gibi bir sorun ortaya çıkarabilir. Gözenekler arası bağlantı çok önemli bir faktördür ve doku iskelesinin tasarımında mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır [56, 63]. Doku iskelesinde elde edilen gözenekli yapılar, hücre büyümesinde ve hücre canlılığını korumasına yardımcı olmaktadır [64, 65, 66].

Doku mühendisliğinin gelişimi insanların düzgün çalışmayan hücrelerinin veya organlarının yerine fonksiyonel özellikte malzemelerin geliştirilmesine bağlıdır [54]. Doku iskelesi iki gruba ayrılabilir: doğal olarak bulunan malzemelerden elde edilen doğal matrisler ve poliglikolik asit gibi sentetik yollarla elde edilen polimer temelli matrisler [67]. Birçok çalışmada doku iskelesi olarak biyomalzemeler kullanılmış ve gözenekli yapılar elde edilerek bunların üzerine hücre ekimi yapılmıştır. Farklı fonksiyonellikteki doku iskelesi tasarımlarının eldesi için ideal özellikler aşağıdaki şekilde özetlenebilir [68]:

- Dokunun anatomik şeklini ve hacmini sağlamalıdır,
- Biyo uyumlu olmalıdır,
- Doku iskelesinin kendisi ve degradasyon ürünleri toksik olmamalıdır,
- Biyoparçalanır bir polimerden hazırlanmalıdır çünkü eğer degradasyon hücre çoğalmasından daha hızlı olursa, iskele doku oluşumundan önce parçalanabilir; eğer doku iskelesinin degradasyonu hücre çoğalmasından daha yavaş olursa, hücre ölümü gerçekleşebilir.

- Hücreye tutunma ve farklılaşma için uygun yüzey özelliklerine sahip olmalıdır,
- Yüzey alanını arttırmak için gözenekli olmalıdır, doku iskelesindeki gözenekler hücre göçüne olanak vermek için ve gaz, besin ve metabolik atıkların difüzyonu için birbirleriyle bağlantılı olmalıdır, aksi takdirde hücre ölümü gözlemlenebilir.

Polimerler, doğal polimerler ve sentetik seramikler doku iskelesi amacıyla kullanılmaktadır. Hidroksiapatit, trikalsiyum fosfat ve benzeri materyaller seramikler grubunda yer alır. Kırılgan yapıları ve fiziksel özelliklerinin zayıf olması nedeniyle doku mühendisliğinde kullanımı yaygın değildir. Ayrıca biyoparçalanır sürelerinin öngörülemez olması da sorun yaratmaktadır. Hızla yıkıma uğramaları nedeniyle mekanik özellikleri zayıflayabilir ve ortama salınan kalsiyum ve fosfora bağlı olarak hücreler üzerinde toksik etki yaratabilirler [69].

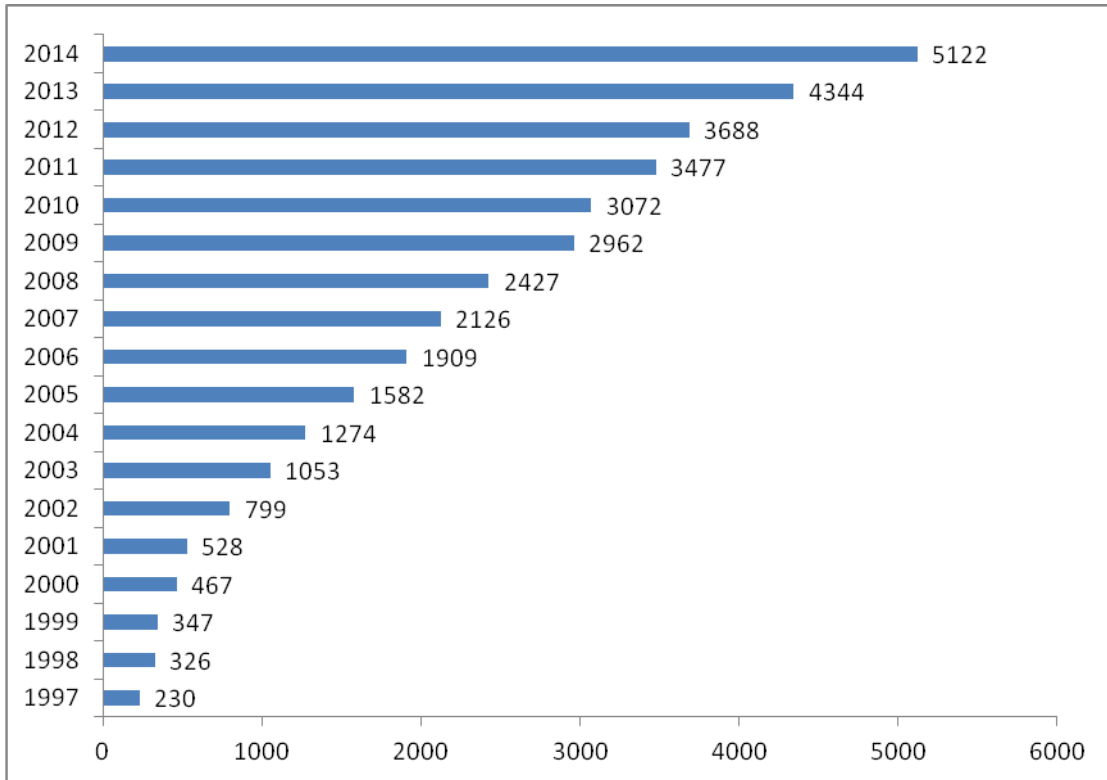
Sınırsız kaynak, kolay fabrikasyon yöntemleri ve istenilen boyut ve şekilde üretim sentetik polimerlerin önemli avantajlarıdır. Polikaprolakton [70, 71] poli laktik-koglikolik asit [72, 73], poli etilen glikol [74] , poli(vinilalkol) [75], poliüretan [76] doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilen sentetik polimerlerdir. Doğal polimerler yüksek biyo uyumlulukları nedeniyle doku iskelesi olarak sıkça tercih edilmektedir. En çok kullanılanlar arasında alginat [77], jelâtin [78] ve kitosan [79, 80] verilebilir.

Doku iskeleleri oluşturularak gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde, yıllar ilerledikçe hızlı bir artış gösterdiği görülmüştür. Şekil 1. 18’de doku iskelelerinin yıllar içerisindeki işlevselliğinin gelişimi görülmektedir.



Şekil 1.18. Yıllara göre doku iskelesi işlevselliğinin gelişimi.

Doku iskeleleri ile yapılan çalışmaların yıllara göre artış grafiği Şekil 1. 19'da görülmektedir. Li ve arkadaşları poli etilenglikol içeren hidrojelere sentezlemiş ve hücre canlılıklarını araştırmışlardır. SEM görüntüleri incelendiğinde doku iskelelerinin gözenekli bir yapıda olduğunu ve biyobozunur özelliğini koruduğunu bildirmişlerdir [62]. Song ve arkadaşları alüminyum oksidin gözenek boyutunu değiştirerek hücre canlılığına etkisini incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda hücrelerin çoğalmasının, nano gözeneklerin büyümesi ile orantılı olduğunu bildirmişlerdir [81]. Polimer kompozit kullanarak elde edilen doku iskelelerine bir başka örnek; poli kaprolakton homopolimeri ve poli (kaprolakton-ko-etilenoksit) kopolimerinin çözücü uzaklaştırma yöntemi ile elde edilmesi verilebilir. Bu çalışmada elde edilen doku iskelesine MC-63 tipi hücre ekilerek, hücre canlılıkları incelenmiştir. Enzim parçalanmasını kontrol altına alarak, yüzey morfolojisini kontrol altına alan Zhang ve arkadaşları kopolimer üzerinde hücre büyümesinin daha fazla olduğunu göstermişlerdir [82].



Şekil 1.19. Yıllara göre doku iskelesi çalışma sayısı grafiği.

1.7.2 Doku İskelesi Hazırlama Teknikleri

Doku mühendisliği çalışmalarında, doku iskelesi tasarımı ve üretimi çok önemli bir basamaktır. Çünkü doku iskelelerinin sahip olması gereken uygun gözeneklilik, yeterli

mekanik dayanım gibi pek çok fiziksel özellik biyomalzemenin işleme yöntemine göre farklılık göstermektedir. Ayrıca hasara özgü geometriye sahip doku iskelelerinin hazırlanması da hem seçilen biyomalzemenin uygunluğuna, hem de tercih edilen fabrikasyon yönteminin teknolojik altyapısına ve başarısına bağlıdır.

Doku iskelesi hazırlamada kullanılan birçok teknik mevcuttur. Geleneksel yöntemler arasında; tekstil teknolojileri, fiber bağlama, eriyik tabanlı teknolojiler, ekstrüzyon, çözücü uzaklaştırma, gaz köpüklendirme, faz ayrımı ve elektrospinning mevcuttur. Tüm bu tekniklerin kendilerine özel avantaj ve dezavantajları söz konusudur. Çözücü uzaklaştırma/parçacık özütleme yöntemi, sıklıkla kullanılan ve birçok bilimsel araştırmada denenmiş bir tekniktir. Özellikle kemik ve kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında iyi sonuçlar elde edilen bir tekniktir. Bu metod ilk kez Mikos ve arkadaşları tarafından 1994'te tanımlanmıştır ve bir polimer çözeltisi içerisinde mineraller (sodyum klorid, sodyum tartarat ve sodyum sitrat gibi) ya da organik (sakkaroz gibi) parçacıklarının dağılması prensibine dayanmaktadır [83]. Bu yöntem özellikle, poli (L-laktik asit) ya da poli (laktit-koglikolid) doku iskelelerinde kullanılmaktadır. Bu yöntemin avantajlarının yanı sıra dezavantajları da bulunmaktadır. Toksik çözücülerin kullanılması, sadece ince doku iskelelerinin oluşturulabilmesi ve mekanik özelliklerinin kontrolsüzce bozulabilmesi bu yöntemin dezavantajları arasında sayılabilir [84, 85].

Faz ayırma, çözücü uzaklaştırma tekniğine yakın bir yöntemdir. Bu yöntemde; çözücünün uzaklaştırılması yerine, çözücü film suya konur ve bir sonraki faz değişimi aşaması polimerin çökmesine neden olur. Çözücü uzaklaştırmanın kullanıldığı ana metodla karşılaştırıldığında, kristal depolanmasının önlenmesi ve bu nedenle daha kalın doku iskelelerinin üretiminin olanaklı hale geldiği dikkat çeker. Teknik açıdan bakıldığında, faz değişimi kullanıldığında, trabeküler kemiğe çok benzeyen yapıda ve gözenekler arası bağlantıların çok güçlü olduğu bir doku iskelesi üretiminin olanaklı hale geldiği gözlenmektedir [86]. Deneysel biyolojik çalışmalar temel alındığında, bu teknikte üretilen doku iskelelerinin, osteoblast ve benzeri hücrelerin büyümesini desteklediği, dolayısıyla kemik matriks oluşumunu hızlandırdığı görülmektedir [87].

Erime tabanlı teknolojiler, sıklıkla gözenekli doku iskelelerine gereksinim duyulduğunda tercih edilirler. Eriyik kalıplama/ parçacık özütleme, bu teknikler

içerisinde en çok kullanılanıdır. Bu teknikle bir polimer, gözenek oluşturuıcı bir madde ile karıştırılıp uygun bir kalıp içerisine konur [88]. Daha sonra bu kalıp belli bir dereceye kadar ısıtılır; oluşan kompozit malzeme, içerisindeki gözenek oluşturuıcı maddenin çözünmesi amacıyla, seçici bir çözücü içerisine konur. Bu teknik, yüksek gözenekliliğe sahip ve istenen şekilde doku iskelesi oluşturuılmasına olanak sağladığı için oldukça ilgi çekmektedir. Bu teknikle, gözenek büyüklüğü ve miktarını da ayarlamak mümkün olmaktadır [89].

Gaz köpürtme yöntemi, yüksek basınçlı CO₂ uygulamasını takiben, polimer disklerinde CO₂ ökeltmesi prensibine dayanmaktadır [90]. Bu yöntemin avantajı, yüksek gözeneklilik derecesine ve aynı zamanda boyutu 100 µm' ye ulaşabilen gözeneklere sahip doku iskeleleri üretebilmektir. Ancak mekanik dayanıklılığın düşük olması ve gözeneklerin yapısal özelliklerinin kontrol edilememesi bu tekniğın dezavantajı olarak karşımıza çıkmaktadır [91].

Isıyla faz ayrımının sağlandığı diğeri bir metod, dondurarak kurutma olup, daha önceden kalıba konmuş homojen polimer çözeltisinin ısısının düşürülmesi yoluyla gerçekleştirilir. Faz ayrıştırıcı sistem dengelendikten sonra, çözücüden zengin faz uzaklaştırılır ve geriye polimerik köpük kalır. Bu teknikle doğal ve sentetik polimerler içeren doku iskeleleri sentezlemek mümkün olmaktadır [92]. Elde edilen doku iskelelerinin zayıf mekanik özelliklere sahip olmaları nedeniyle çok tercih edilen bir yöntem değildir.

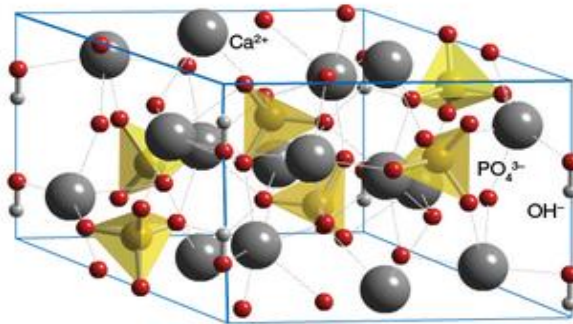
Fiber örme / bağlama tekniğı, fiber benzeri polimerik yapıların varlığında uygulanabilirler. Bu işlemdede farklı fiberler, üç boyutlu doku iskelesinin içerisine, farklı boyutta gözenekler oluşturuacak şekilde yerleştirilirler. Değışik boyutlarda fiberler kullanarak ve değışik şekillerde birleştirerek, doku iskelesi yapısında önemli değışiklikler oluşturmamak mümkün hale gelmektedir. Gözenek büyüklüğünün çok fazla olması sonucunda besleyici maddelerin kaybının yanı sıra, istenen oranda gözeneklilik ve gözenek boyutunun elde edilmesindeki teknik engeller, bu yöntemin dezavantajı olarak karşımıza çıkmaktadır [93, 94]. Ayrıca doku iskelesi gözenekleri içerisinde çözücü kalıntılarının kalabilmesi ve bu kalıntıların hücrelere zarar verebilme olasılığı da istenmeyen bir başka özellik olarak karşımıza çıkabilmektedir [95].

Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında elektrospinning, üretim ve yapım aşamalarında çok yönlü, üstün ve daha karmaşık yapıların eldesinde kullanışlı bir yöntemdir [96]. Elektrospinning tekniği ile gerçekleştirilen çalışmalarda fiber yönlenmesi ve boyutunun elde edilen doku iskelesinin morfolojisini, canlılık oranını etkilediği bilinmektedir [83, 97]. Elektrospinning yöntemi ile kullanılmakta olan polimerlerin yanı sıra kollajen, jelâtin, ipek fibrin, kitosan, hiyalüronik asit ve selüloz gibi birçok doğal polimer de mevcuttur [97-103]. Çapraz bağlanmış nanofiberler hücre çalışmaları için gözenekleri dokuları sebebi ile elverişli olmaktadır [97].

1.8. Hidroksiapatit (HA)

Hidroksiapatit toz şeklinde ya da tanecikli formlarda, kemik tedavilerinde ve çeşitli metalik protezlerde, malzemenin biyolojik özelliklerini geliştirmek üzere kaplama olarak yaygın kullanıma sahip biyoaktif bir seramiktir. Fizyolojik akışkana ait pH, sıcaklık ve aynı zamanda termodinamik olarak en kararlı kalsiyum fosfat bileşiğidir. Kemik dokusunun inorganik yapısını oluşturmakta olan kalsiyum fosfat esaslı hidroksiapatit, tıp ve dişçilikte kullanılan bir biyoseramik olup, biyo uyumluluğu nedeni ile yapay kemik olarak farklı protezlerin yapımında, çatlak ve kırık kemiklerin onarımında ve ayrıca metalik biyomalzemelerin kaplanmasında kullanılmaktadır.

$\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ genel formülüne sahip hidroksiapatit; hekzagonal rombik kafes yapısında olup, birim hücre boyutları, $a=b= 9.432 \text{ \AA}$ ve $c=6.881 \text{ \AA}$ ’ dur. Bileşimi bakımından ele alındığında hidroksiapatitteki ağırlıkça kalsiyum ve fosfor yüzdeleri sırasıyla 39.84 ve 18.52’dir. Hidroksiapatite ait molekül yapısı Şekil 1.20’de verilmiştir.



Şekil 1.20. Hidroksiapatit molekül yapısı

Hidroksiapatit en iyi mukavemete, çözünme direncine ve kristalliğe (Ca / P) molar oranı 1.67 iken ulaşmaktadır. İdeal kalsiyum / fosfor oranı 10 / 6 ve hesaplanan yoğunluğu 3.216 g / cm³ tür. Hidroksiapatitin sulu ortamlarda 4.2- 8.0 pH aralığında kararlı kaldığı bilinmektedir ve bu durum, pH değeri temasta bulunduğu dokulara göre değişebilen vücut sıvıları için dayanıklı bir kalsiyum fosfat minerali olduğuna işaret etmektedir. [104, 105]. Polimerler ile hidroksiapatitin arasındaki yapışmanın fiziksel etkileşimlerle olduğu bilinmektedir. Hidroksiapatitin doku iskelesinde tercih edilmesinin bir sebebi de, yüzey geriliminin poli (laktikasit), poli (laktikglikolikasit) gibi polimerler varlığında azalmış olduğunun bulunmasıdır [106]. Tablo 1. 1' de Hidroksiapatite ait bazı mekanik ve fiziksel özellikler verilmiştir.

Tablo 1.1. Hidroksiapatite ait fiziksel ve mekanik özellikler. [104, 105]

Elastisite modulu	GPa	4.0 - 117
Young modulu	GPa	80-110
Baskı mukavemeti	MPa	294
Eğilme mukavemeti	MPa	147
Sertlik	Vickers, Gpa	3.43
Poisson oranı		0.27
Yoğunluk	(teorik) g / cm ³	3.16
Sertlik	HV	600
Erime noktası	°C	1614
Isıl iletkenlik	W/cmK	0.013

Hidroksiapatit, kemik mineraline en yakın sentetik malzeme olarak bilinmektedir [107]. HA, yumuşak dokularla olan mükemmel biyo uyumluluğu, tahriş etmeyen yapıda olması [108] ve yukarıda bahsedilen özellikler sebebi ile birçok kullanım alanı bulmuştur. Bunlar arasında, protezler, metal implantlar, ortopedik ve dental gibi biyomedikal uygulamaları [109- 112] bulunan HA; bu alanların yanı sıra ilaç salınımı, yapısına polimer katılımı ile kompozit olarak ve membran yapımında da uygulama alanı bulmuştur [107, 113-116]. Ayrıca HA sahip olduğu katyon değişimi ve adsorbsiyon özelliği sayesinde heterojen katalizör olarak da kullanılabilir [117].

1.8.1 Hidroksiapatitin Biyo Uyumluluğu

Hidroksiapatitin en önemli özellikleri arasında mükemmel biyolojik uyumluluğu ve yavaş biyobozunurluğu vardır. Hidroksiapatit, sert dokularla direkt kimyasal bağlar kurabilir. Hidroksiapatit partiküllerinin ya da gözenekli blokların kemiğe yerleştirilmesinde; yeni doku, 4–8 haftada şekillenir [118]. HA gözenekli yapısı; hücrelerin ve gözeneklerin içine doğru büyümesinden dolayı, dokuların implanta nüfuz etmesini sağlar. Ayrıca hidroksiapatitin lokal büyüme faktörlerine, özellikle kemik proteinlerine karşı kuvvetli kimyasal bağlanma eğilimi olduğu saptanmıştır. HA non-toksik özelliklere sahip olması nedeniyle meydana gelebilecek vücut reaksiyonları da minimumdur [119]. Hidroksiapatitler kemiğin mineral fazındaki seramik halidir. Kalsiyumfosfat reaksiyonu sonucu (CaHPO_4 veya $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ vb.) elde edilen bir yapı türüdür. Hidroksiapatit kemik dokusundaki iyileşme için en çok kullanılan materyal olma özelliğine sahiptir. Kolaylıkla toz halinde getirilebilmektedir. Levitt ve arkadaşları 1969 yılında yaptıkları çalışmada hidroksiapatiti toz halde sıcak baskıdan geçirerek biyolojik deneyler için uygun kalıplara sokmuşlardır. Bu yöntem ile hidroksiapatit yaygınca biyolojik kaynaklı çalışmalarda kullanılmıştır. Hidroksiapatit esaslı biyoseramikler yaklaşık 40 senedir tıp ve dişçilik alanında kullanılmaktadır. Klinik uygulamalar arasında diş implantları, periyodik uygulamalar, ortopedi, otorinolarenoloji bulunmaktadır [28]. Hidroksiapatitin biyoaktif ve osseoconductive yani kemik oluşturuıcı hücreler ile yüzeyde kemik büyümesine elverişli olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [120]. Kulak implantı veya metal implantlarda üst kaplama gibi farklı klinik uygulamaları da bulunan hidroksiapatit polimer matriksi içinde dolgu malzemesi olarak kullanılmıştır. Bonfield ve arkadaşları 1981 yılında ilk polimer biyokompozit tanımını yapmış ve çalışmalarında polietilen içerisine hacimce yaklaşık %50' sine yakın hidroksiapatit yapıya eklemişlerdir. Kompozit; kemik yapısına yakın bir sertliğe sahip, dayanımı yüksek ve *in vivo* ortamda kemiğe bağlanması bulunan bir yapıdadır.

1.8.2 Hidroksiapatitin Sentez Yöntemleri

Hidroksiapatit kimyasal çöktürme, katı-hal reaksiyonu, hidrotermal sentez, plazma sprayleme, sol-jel metodu gibi yöntemlerle sentezlenebilmektedir. Hidroksiapatit ilk kez Hayek [121] tarafından kimyasal çöktürme yöntemi kullanılarak sentezlenmiş olup,

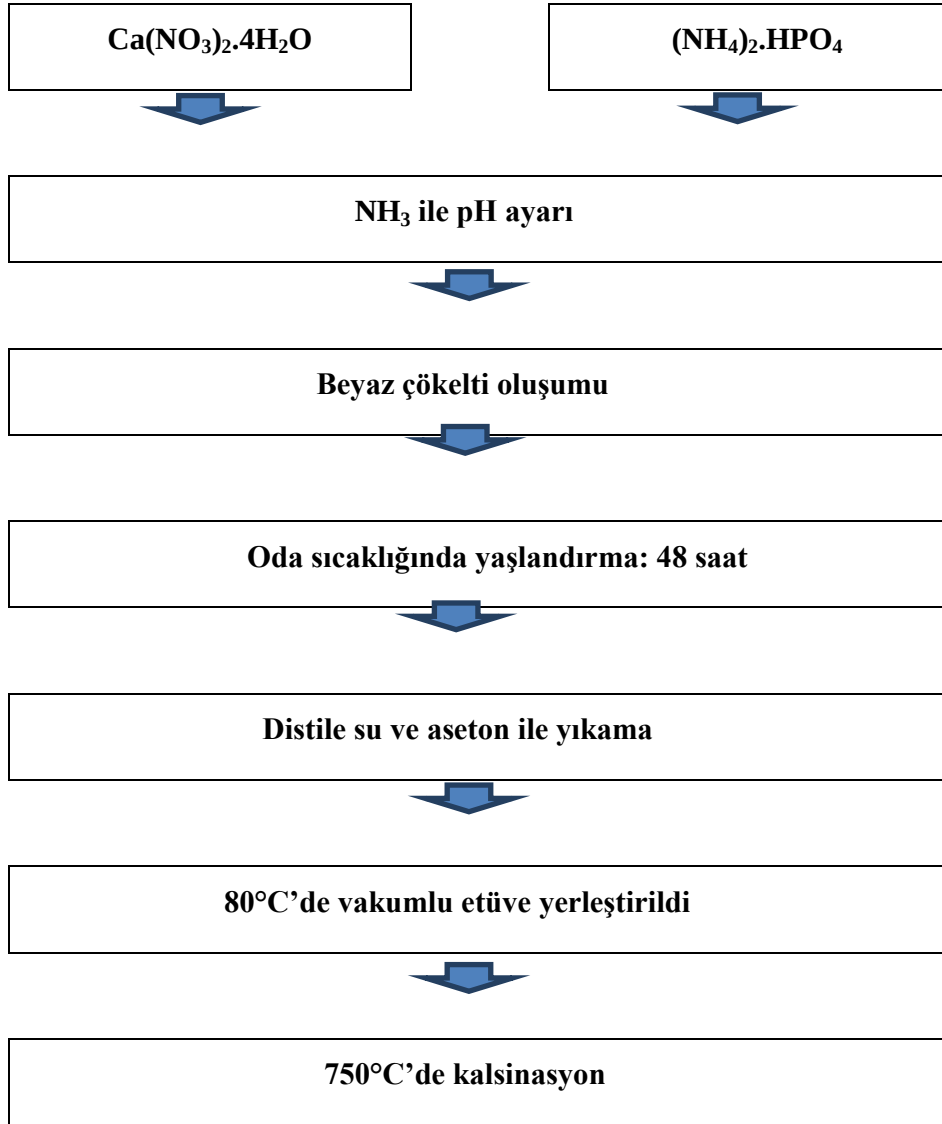
daha sonra, su-bazlı kalsiyum ve fosfat tuzları içeren çözeltilerden kimyasal çöktürme veya asit- baz titrasyonu gibi yöntemlerle elde edilmiştir [122].

Kalsiyum hidroksiapatiti nano-boyutlarda yüksek kimyasal homojenlik ve saflıkta seramik toz halinde, kalsiyum nitrat ve di-amonyum hidrojen fosfat tuzlarının, özgün bir kompozisyona sahip “Sentetik Vücut Sıvısı (SVS)” çözeltilerinde uygun oranlarda çözülmesi ile başlanmıştır. İnsan vücudu sıcaklığı olan 37 °C’ de, ve insan vücudu pH değeri olan 7. 4 ’te, biyomimetik koşullarda yürütülen bir kimyasal sentez yöntemi ile elde etmiştir [123]. HA üretmek için etilen glikol çözeltisi $\text{Ca}(\text{OAc})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ve bütanol çözeltisi kullanılmıştır. Sentez sırasında kullanılan, asetik asit ve amonyum nitrat (NH_4NO_3), dengeleyici ve oksitleyici olarak görev yapmıştır. Bu yöntem ile elde edilen hidroksiapatit kaplamaların hazırlanması uygulamasında potansiyel olarak kullanılabilir.

Hidroksiapatit sentezi için yıllar ilerledikçe birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler, homojen çökertme, plasma spray, sol- gel, hidro termal ve ultrasonik sprayleme şeklinde sıralanabilir [124-129]. Nano boyutta hidroksiapatit eldesi için literatürde farklı çalışmalar yapılmıştır. Faz ayrımı tekniği kullanılarak elde edilen nanofiber doku iskelesi ile hidroksiapatit / polimer kompoziti oluşturulmuştur [130]. Doku iskelesinin morfolojik yapısı SEM ile incelenmiş ve gözenekliliği ölçülmüştür. Yapıya katılan hidroksiapatit ile kemik tümörlerinin tedavisi ve kaybedilmiş kemiklerde öncü bir kompozit elde etmek amaçlanmıştır. Poinern ve arkadaşları, ultrasonik banyo kullanarak nano HA sentezini gerçekleştirmişler ve karakterize etmişlerdir [131]. Yöntemde $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltisine ultrasonik titreşim altında amonyak eklenmiş ve karıştırılmıştır. KH_2PO_4 eklenmiş ve santrifüjlenerek beyaz çökelti alınmıştır.

Bakan ve arkadaşları düşük sıcaklıkta sol-gel tekniğini kullanarak termal kararlılığı yüksek ve nano boyutta hidroksiapatit sentezlemişlerdir. Sol-gel metodu için gerekli Ca: P mol oranı 1.67:1 olacak şekilde tanımlanmış ve bunun için $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ ve $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$ başlangıç malzemeleri olarak kullanılmıştır. Elde edilen hidroksiapatit; FTIR, XRD (X ışını kırınım cihazı) ve SEM ile karakterize edilmiş ve hidroksiapatitin nano boyutta olduğu görülmüştür [132].

Bu çalışmalar içerisinde ıslak kimyasal metot (wet chemical method) pahalı cihaz kullanımına gerek duymayan en ekonomik ve en kolay olandır. Metoda ait sentez şeması Şekil 1.21’de görülmektedir.



Şekil 1.21. Hidroksiapatit sentez şeması.

1.9. Kollajen ve Keratin

Biyobozunur polimerler; doğal polimerler ve sentetik polimerler olarak iki grupta toplanabilir. Polisakkaritleri veya proteinleri içine alan doğal polimerler sınıfında nişasta, alginat, kitosan, hiyaluronik asit ve türevleri, soya, ipek ve kollajenle keratini de içine alan fibrinler sayılabilir [133]. Protein esaslı polimerlerin en büyük özelliği; doku oluşumunda veya yaralanmalarda ECM yapısı gibi davranabilmeleri, hücre büyümelerini ve çoğalmalarını sağlayabilmeleridir. Moleküler açıdan bakıldığında proteinler 20 farklı aminoasidin birleşmesi sonucu oluşmuş yapı blokları olarak düşünülebilirler. Birbirine bağlı aminoasit zincirleri polipeptidler olarak

adlandırıldığında; merkez karbon atomuna bağlı bir amin, karboksil grubu, hidrojen atomu veya bir –R grubu bağlı olabilir. –R grupları polar olmayan, yüklü veya yüksüz polar grupları olabilmektedir [134].

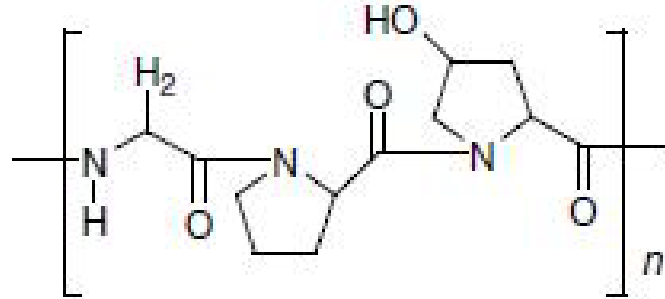
Kollajen, vücutta en fazla bulunan protein olup, derinin ve kas-iskelet sistemi dokularının ana bileşkesidir. 300.000 molekül ağırlığında olup, 300 nm uzunluğunda çubuk tipi polimerlerden oluşmaktadır. Yüksek mekanik özellikli, biyo uyumlu, suyu emebilme özelliği ve çapraz bağlanma kabiliyeti ile kollajenin, yirmiikiden fazla tipi tanımlanmıştır. Vücutta en sık rastlananlar Tip I-IV arasındakilerdir. Cildimizdeki, tendomlar ve kemiklerdeki kollajen Tip I, kıkırdak dokusu Tip II, kan damar duvarları Tip III ve epitelyum dokular arasındaki kollajen ise Tip IV kollajen olarak sınıflandırılır. Her biri; %33 'ünü glisin, %25 'ini prolin ve %25 'ini hidroksiprolinin oluşturduğu, her polipeptitin yaklaşık 1050 aminoasitten oluştuğu üç polipeptit alt ünitesinden meydana gelir. Kollajenin alt üniteleri, vücuttaki serbest aminoasitlerden sentezlenir ve fibroblast, osteoblast başta olmak üzere uygun hücrelerde transkripsiyon, translasyon ve post-translasyonel modifikasyona uğrarlar. Kollajenin glisin içeriği kollajen zincirinin bükülebilirliğini sağlar. Kollajen vücuttaki, kollajenaz ve metalloproteinazlar aracılığıyla enzimatik yıkılıma uğrar. Birçok yönden biyotıp uygulamaları açısından araştırılmıştır. Tabaka, tüp, sünger, köpük, nanofibröz matriks, pudra, enjekte edilebilir akışkan solüsyon gibi birçok formu sentezlenmiş ve ticarileştirilmiştir. Kadner ve arkadaşları Tip I ve III kollajenin kemik dokusundaki kaslara benzeyen fibroblast hücreler olduğunu kanıtlamışlardır [67, 134-137].

Keratin en yaygın proteinlerden bir diğeridir. Biyo uyumluluğu ve biyoçözünürlülüğü sebebi ile birçok biyo uyumlu malzemenin eldesinde kullanılmaktadır [135]. Keratin, tırnak, saç, pençe ve gaganın yapısında bulunmaktadır [138]. İpek, kollajen, fibrinojen veya jelatin kadar ilgi görmese de keratin, aminoasitlerin %7-20' sinde bulunmaktadır [136, 137]. Fiziksel ve biyo uyumlu özellikleri sebebi ile doku mühendisliğinde de uygulama alanı bulmuştur [134, 138].

1.9.1 Biyomalzeme olarak Kollajen ve Keratin

Kollajen, doku ve organ oluşumunda ve hücrelerin birçok biyolojik işlevinde çok önemli rol oynayan bir proteindir. Birçok doğal polimer ya da sentetik türevleri biyotıp alanında ve biyomalzeme olarak kullanılmıştır, ancak kollajenin özellikleri onu

biyomalzeme olarak daha ön plana çıkarmaktadır. Kollajen çok iyi bir yüzey aktif özelliğe sahiptir. Bu nedenle lipitten yoksun yapılara çok daha kolay girebilmektedir. Şekil 1.22’de kollajenin yapısı görülmektedir.



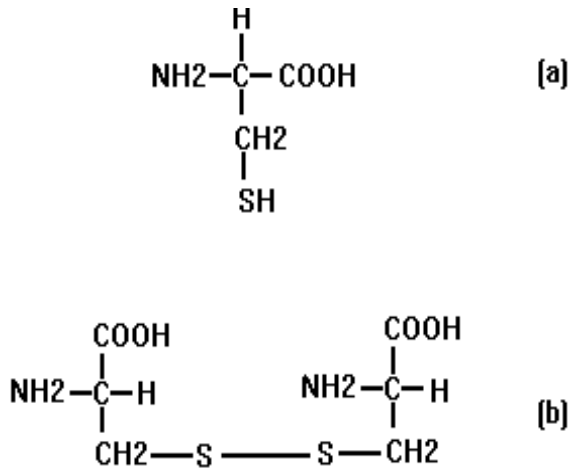
Şekil 1.22. Kollajenin yapısı [139].

Kollajen yaklaşık 20 farklı aminoasidin uzun zincirler oluşturması ile oluştuğundan her biri farklı kimyasal reaktiviteye sahip fonksiyonel gruplar içerir. Bu durum kollajen molekülünün modifikasyona uygun olmasını sağlamaktadır. Hayvan camiasında en çok kullanılan protein olan kollajen çok hücreli organizamalar için hücresel doku sağlamaktadır [28].

Kollajen başarılı biyobozunum özelliğinin yanı sıra düşük antijenikliğe ve albumin gibi diğer doğal polimerlerle karşılaştırıldığında daha üstün biyo uyumluluk özelliklerine sahiptir. Biyotıp uygulamalarında kollajenin avantajlı kullanımının esas nedeni, fiberler oluşturarak ekstra sağlamlık ve stabilite sergilemesidir. Kollajenin biyotıp alanında uygulamaları çok yaygındır. Oftalmolojide koruyucu malzeme olarak, yanık ve yaralarda sünger şeklinde, protein taşınmasında tablet şeklinde kullanımlarının yanı sıra transdermal uygulamaları ve gen taşıma sistemlerinde kullanımı da söz konusudur. Doku mühendisliğinde hücre kültürü matriksi olarak, kalp-damar cerrahide de yapay kan damarı ve kapakçık olarak da kullanılmıştır [139]. Doku iskelesi sentezlenen çalışmalarda kollajenin yapıya katılımı ile hücre ortamına uygun olduğu ve hücrelerin çoğaldığı birçok çalışma ile gösterilmiştir [140-142].

Kollajen kullanımının avantajları şunlardır: Kolaylıkla elde edilebilir ve yaşayan organizmalardan saflaştırılabilir. Biyobozunur ve biyoemilebilirdir. Biyotıp uygulamaları için yeterli mekanik dayanıklılığa ve güçlülüğe sahiptir.

Keratin kopmaya ve aşınmaya dayanıklı bir proteindir ve saç keratini α -keratin yapısındadır. α - heliks yapısında bulunan α -keratinler yapılarında yüksek miktarda sistin amino asiti bulundururlar. Sistin amino asiti, içerisinde kükürt bulunduran iki sistein aminoasitinin birleşmesi ile oluşur. Tırnaklar keratin yapısındadır. İnsan vücudundaki diğer proteinler gibi keratin de, aminoasit olarak adlandırılan küçük moleküllerin birleşmesinden oluşmuş büyük bir moleküldür. Aminoasitler tespah taneleri gibi ard arda dizilerek büyük proteinleri oluşturmaktadırlar. Peptit zincirlerinin dayanıklılığı, hidrojen bağları ve peptit bağlarının dışında kalan R uçlarındaki yan bağlanmalarla sağlanır. Yan bağlanmalardan en önemlisi, iki sistein arasında oluşan disülfid (-S-S-) bağlarıdır. Şekil 1.23'te insan saçında bulunan iki aminoasidin yapısı verilmiştir.

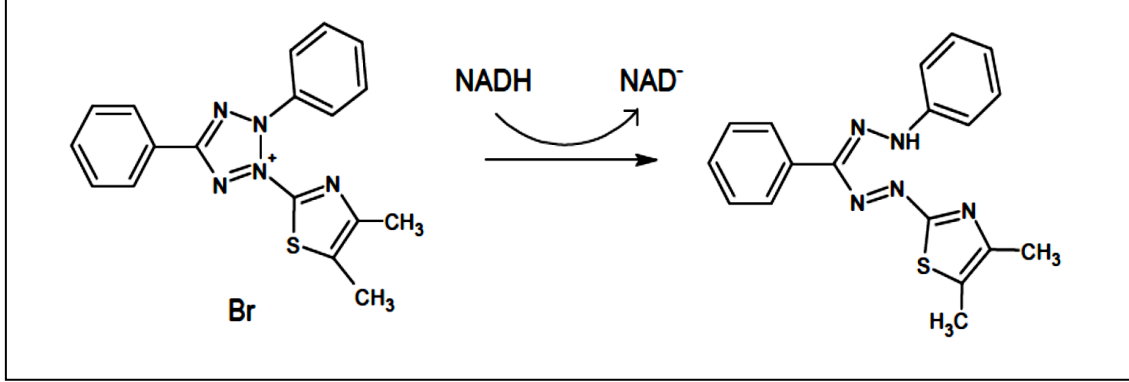


Şekil 1.23. İnsan saçında bulunan kükürt yönünden zengin iki aminoasit a) Sistein ve b) Sistinin yapısı [143].

1.10. Hücre Kültür Çalışmaları: MTT Testi

MTT ölçümü *in vitro* koşullarda metabolizmanın canlılığına dayanarak sitotoksisiteyi ölçmek için uygulanan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntem, hızlı, kolay ve yüksek oranda doğruluğa sahiptir. Bir tetrazolyum tuzu olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) sarı renkli olup, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte kristaller oluşmaktadır. Süksinatdehidrojenaz mitokondrilerin matriksinde yer alan Krebs döngüsü enzimlerinden birisidir ve diğer enzimlerinden farklı olarak mitokondriyal iç

membranın içe bakan yüzeyinde bulunmaktadır. Bu enzim, FAD (Flavin adenin dinükleotid) demir-kükürt (Fe: S) proteini içermektedir. Şekil 1.24'te MTT Assay testine ait reaksiyon verilmektedir.



Şekil 1.24. MTT Testi Reaksiyonu

Çözünür olmayan formazan, dimetil sülfoksit veya izopropanol gibi organik çözücüler ile çözünür hale gelip spektrofotometre cihazı kullanılarak 570 nm dalga boyunda (620 nm referans değeridir.) absorbans değeri ölçülür. MTT canlı hücrelerin yapısına girer ve eğer malzeme yüzeyinde canlı hücre varsa canlı hücreler tarafından MTT formazana indirgenir ve absorbans değeri ne kadar canlı hücre olduğunu saymaya imkân verir. Böylece absorbans değeri ile hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülür. Ayrıca ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir.

Aşağıdaki formüllere göre canlı hücre sayısı (VI) veya sitotoksik indeks (SI) hesaplanır:

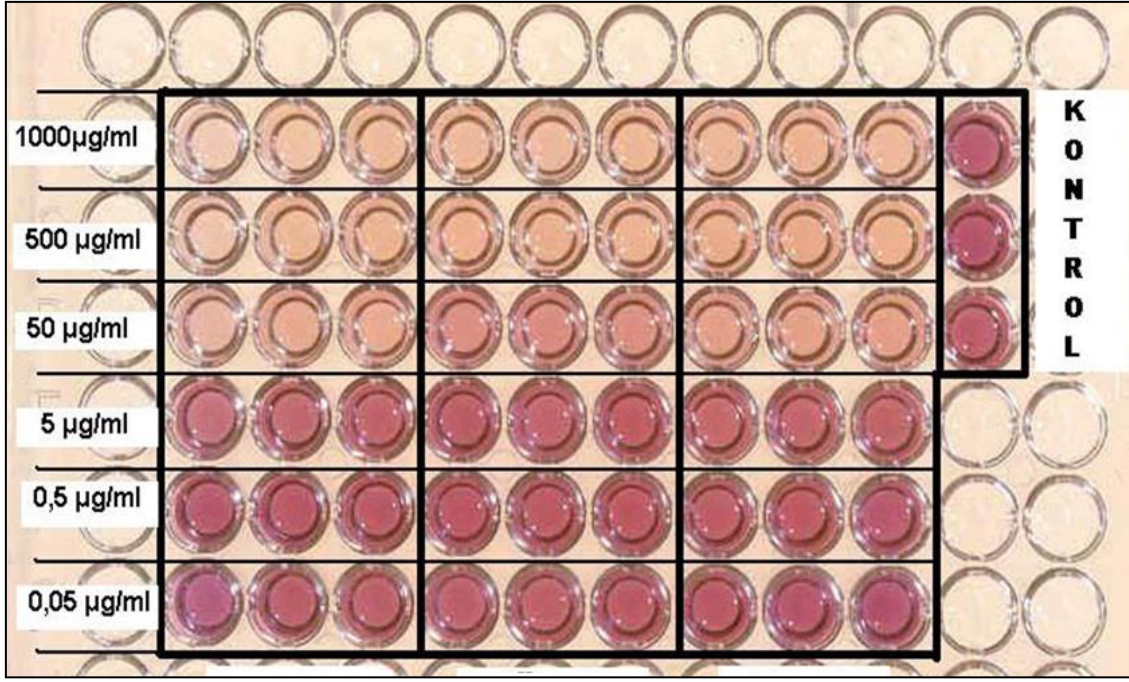
$$VI \text{ (Canlı hücre sayısı)} = (\text{Deney Absorbans} / \text{Kontrol Absorbans}) \times 100 \quad (1.3)$$

Eşitlik 1.3. Canlı hücre sayısı hesaplama denklemi.

$$SI \text{ (Sitotoksik indeks)} = 1 - [(\text{Deney Absorbans} / \text{Kontrol Absorbans}) \times 100] \quad (1.4)$$

Eşitlik 1.4. Sitotoksik indeks hesaplama denklemi.

MTT' nin en önemli özelliği canlı hücreleri tespit etmesidir. MTT, pratik, ucuz ve çoklu sistemlere uygulanabildiği için tercih edilmektedir [144, 145]. Şekil 1. 25'te MTT testi için kullanılan plate düzeneği görülmektedir.



Şekil 1.25. MTT testi için kullanılan plate düzeneği.

MTT testi ilk defa Mosmann tarafından 1983 yılında hücre büyümesini hızlı bir şekilde gözleyebilmek için kullanılmıştır. Mosmann, kantitatif kolorimetrik ölçümler ile bir tetrazolyum tuzu olan MTT' yi memeli hücrelerinde canlılığını ölçmek için kullanmıştır [146]. MTT testi daha sonra hücre canlılığını ölçmek için birçok farklı hücre tipi ile birlikte birçok literatür çalışmasında kullanılmıştır. Sailaja ve arkadaşları HA içeren kitosan-poliakrilik asit kompoziti ile hücre kültürü çalışmaları yapmış ve bunun sonuçlarını bildirmişlerdir. Human osteosarcoma hücresi içeren kompozitin yapışma davranışları incelenmiştir [147]. Luo ve arkadaşları poli(vinilalkol) içeren nanoboyutta ipek peptidleri hazırlamış ve MTT testini kullanarak hücre canlılıklarını araştırmışlardır. Çalışma incelendiğinde, poli(vinilalkol) oranı arttığında, hücre canlılık seviyesi en yüksekte olduğu görülmüştür. Doğal bir polimer olan ipek proteininin yapıya ilavesi malzemenin daha uzun lifli yapıya sahip olmasına sebep olmuştur [148]. Sumrita ve Kumar MTT testi ile elde ettikleri doku iskelesinin biyo uyumluluğunu kontrol ettikleri çalışmada; kitosan-agaroz-jelatin kullanarak bir doku iskelesi sentezlemiş ve Cos 7, NIH3T3 fibroblast hücreleri ekilerek biyo uyumlulukları incelenmiştir [149]. Hong ve arkadaşları poli (L-laktikasit) kullanarak hidroksiapatiti yüzey modifikasyonu ile bağlayarak bir nano kompozit elde etmiş ve biyo uyumluluğunu araştırmışlardır. HA yapıya katıldığında darbe dayanımının ve darbe mukavemetinin arttığı bildirilmiştir

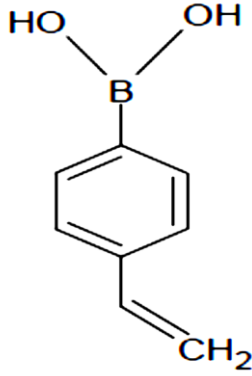
[150]. Madhumathi ve arkadaşları kitosan hidrojel-hidroksiapatit kompozitini kimyasal sentez yöntemi ile elde ettikten sonra biyo uyumluluğunu incelemişlerdir. MTT sonuçlarına göre biyo uyumluluğu iyi olan kompozitlerin doku mühendisliğinde kullanımı amaçlanmıştır [151]. Kollajen ve kitosan içeren doku iskelesi Tomola ve arkadaşları tarafından HA ile birleştirilmiş ve hücre kültürü uygulamalarında kullanılmıştır. HA içeren kompozitin kemik dokusu ve nano tıp sektörlerinde kullanımı amaçlanmaktadır [152]. Hücre ekim çalışmaları elektrospinning tekniği ile elde edilmiş doku iskelelerinde de birçok uygulama bulmuştur [153, 154]. Ito ve arkadaşları HA içeren poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) kopolimeri elektrospinning ile elde edilmiş ve hücre canlılıkları ekilen Cos-7 hücreleri ile araştırılmıştır. Yapıya eklenen HA ile hidrofiliklik artmış dolayısıyla biyobozunmayı hızlandırmıştır. Benzer bir çalışma Uchida ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [153, 155]. Elektrospinning tekniği ile yapılan bir başka çalışma, gümüş katkılı poli laktikasitten elde edilen doku iskelesine hücre ekimi yapılmasıdır. Liu ve arkadaşları biyobozunur ve antibakteriyel olmak üzere tasarladıkları doku iskelesine NIH3T3 ekmiş ve MTT testi ile sitotoksitesini araştırılmıştır. Elektrospinning ile elde edilen doku iskelesinin hücrelerin yapışmasında önemli bir rolü olduğu görülmüştür [156]. Yapılan birçok çalışma ile doku iskelesinin gözenekli yapısının 100-400 nm arasında olması hücre çoğalmasına, hücre canlılığına ve geçirgenliğe bir fayda sağlamaktadır [65, 66].

Yukarıda örneklenen çalışmalardan görüldüğü üzere MTT testi ve hücre canlılığı geliştirmekte olan bir çalışma alanıdır.

2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

4-Vinil benzen boronik asit (4-VBBA)

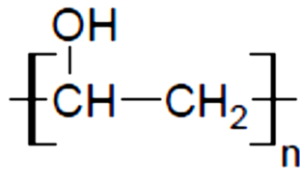


Üretici Firma : Sigma Aldrich

Molekül Formülü: $\text{H}_2\text{C}=\text{CHC}_6\text{H}_4\text{B}(\text{OH})_2$

Molekül Ağırlığı : 488.66 g/mol

Poli(vinilalkol) (PVA)

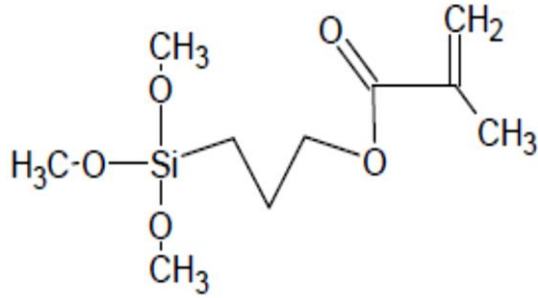


Üretici Firma : Sigma Aldrich

Molekül Formülü : $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})]_n$

Molekül Ağırlığı : 146.000- 186.000 g/mol

3-trimetoksisililpropilmetakrilat (MEMO)

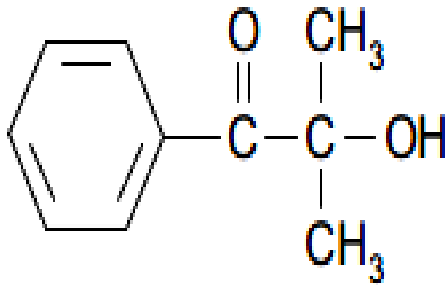


Üretici Firma : Sigma Aldrich

Molekül Formülü : $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}_2(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$

Molekül Ağırlığı : 248. 35 g/mol

2-Hidroksi-2-metil-1-fenil-propan-1-on (Darocur 1173)

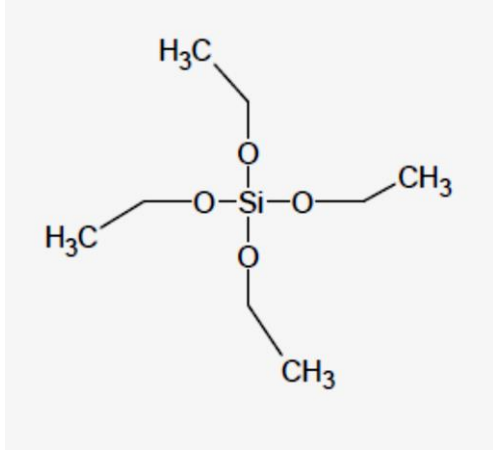


Üretici Firma : Ciba Specialty Chemicals

Molekül Formülü: $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_2$

Molekül Ağırlığı : 164.2 g/mol

Tetraetilortosilikat (TEOS)



Üretici Firma : Sigma Aldrich

Molekül Formülü: Si(OC₂H₅)₄

Molekül Ağırlığı : 208. 33 g/mol

Kullanılan Diğer Kimyasallar

Deneysel çalışmalarda değişik amaçlarla analitik saflıkta; kalsiyum nitrat (Ca(NO₃)₂.4H₂O), amonyum bifosfat ((NH₄)₂HPO₄) sodyum hidroksit (NaOH), amonyak (NH₃), lityumklorür (LiCl), p-toluensulfonik asit, etanol, diklorometan, potasyum persülfat ve sodyum metabisülfid hiçbir saflaştırma işlemi uygulanmadan kullanıldı. Tip I kollajen ve kimyasal işlem görmemiş insan saçı temin edildiği gibi kullanıldı.

2.2. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi:

Sentezlenen malzemeler ve hazırlanan nanofiberlerin fonksiyonel grup analizi FT-IR Spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektrumlar, ATR aparatı takılı olan Perkin Elmer Spektrum 100 FT-IR Spektrometre cihazı ile 400-4000 cm⁻¹ aralığında kaydedilmiştir.

Termogravimetrik Analiz (TGA):

Sentezlenen malzemelerin nanofiberlerin termo-oksidatif kararlılıkları ölçmek amacıyla, Perkin Elmer Pyris 1 model TGA cihazı kullanıldı. Ölçümler azot atmosferinde 10 °C / dk ısıtma hızıyla 30 °C- 750 °C sıcaklıkları arasında yapılmıştır.

Laboratuvar Ölçekli Elektrospin Cihazı:

Hibrit nanofiber membranların üretilmesi için laboratuvar ölçekli NE 300 model elektrosinning cihazı kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan elektrosinning cihazı Şekil 2.1’de görülmektedir.



Şekil 2.1. Nanofiber Membranların hazırlanması için kullanılan elektrospin düzeneği.

UV Lambası:

Elektrospin cihazının içerisine yüksek basınçlı civa ark tüplü, kuvars camdan ve tungsten filamentten yapılmış, güneş ışınlarının spektral dağılımına yakın ışık verebilen Osram firmasının ürettiği Ultrawit 300 markalı, 300 Watt gücünde UV lambası

yerleştirilmiş ve membranların üretilmesi için elektrospin cihazı ile eş zamanlı olarak kullanılmıştır.

Taramalı Elektron Mikroskopu (Scanning Electron Microscopy) (SEM):

Sentezlenen malzemenin ve hazırlanan nanofiberlerin morfolojisi ve çaplarının boyutu Boğaziçi Üniversitesi'nde bulunan Philips marka XL30 ESEM-FEG/EDAX model cihaz ile incelenmiştir.

Temas Açısı Ölçümleri:

Hibrit nanofiber membranların statik su temas açıları “sesil damla analizi yöntemi” ile Krüss, DSA 10 cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

ELISA Spektrofotometresi:

Hibrit nanofiberler üzerine ekimi yapılan hücrelere ait canlılık testlerinin değerlendirilmesi aşamasında İstanbul Üniversitesi Fizyoloji Bölümünde bulunan Kayto marka ELISA spektrofotometresi kullanılmıştır. Şekil 2.2’de test için kullanılan cihaza ait fotoğraf görülmektedir.



Şekil 2.2. Hücre canlılık testleri için kullanılan spektrofotometre.

2.3. Deneysel Yöntemler

Bu tez çalışması kapsamında iki farklı seride, kollajen ve keratin içeren doku iskelesi kompozisyonları hazırlanmış ve ayrı ayrı hücre kültürü uygulamaları incelenmiştir.

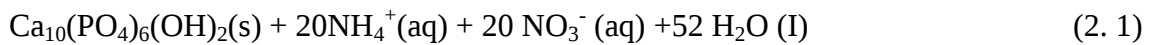
Çalışmanın ilk aşamasında, hidroksiapatit sentezlenmiş ve daha sonrasında 4-Vinil benzen boronik asit ile modifiye edilmiştir. Sonraki aşama elektrospin çözeltilerinin hazırlanmasıdır. Poli(vinilalkol) ile elektrospin edilen malzeme kollajen ile muamele edilmiştir.

Hazırlanan ikinci seride elektrospin aşamasında çözeltiye keratin katılmış ve UV ışını ile eş zamanlı olarak elektrospin edilmiştir.

Çalışmanın son aşamasında ise elde edilen nanofiberlerin hücre kültürü uygulamaları yapılarak, canlılıkları ve hücrelerin ortamda büyüüp büyümedikleri ve doku iskelelerinin yüzey morfolojileri incelenmiştir.

2.3.1. Hidroksiapatit (HA) Sentezi

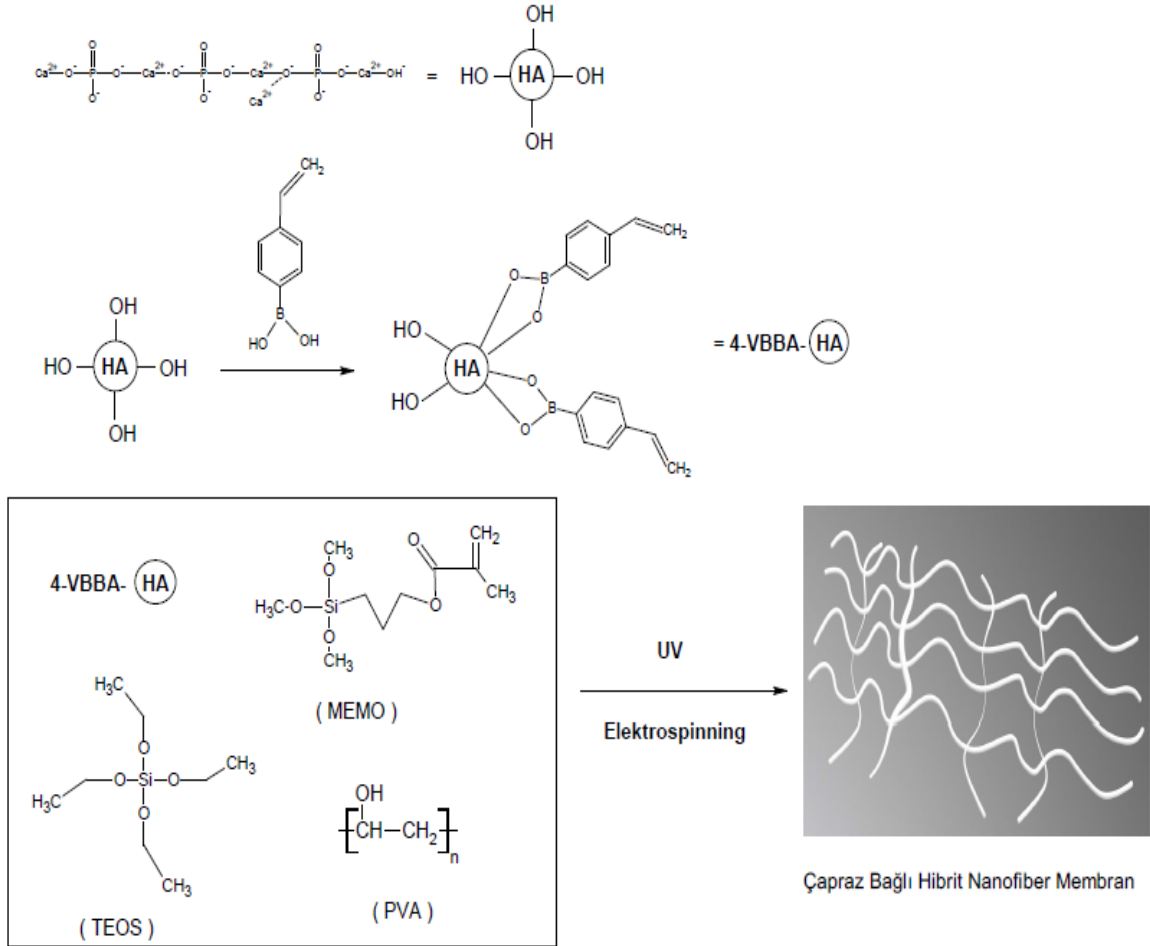
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ sentezi literatüre uygun olarak kalsiyum nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ve amonyum bifosfatın ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) 1.67:1 molar karışımı kullanılarak hazırlandı [131, 132, 157, 158]. 39.44 g ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) etanol içerisinde çözüldü ve pH amonyak NH_3 kullanılarak 10' a ayarlandı. Balon içerisine eklendi. 1M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ çözeltisi, 1.67 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltisine damla damla ilave edildi. 48 saat süre ile oda sıcaklığında yaşlandırma (aging) prosesine bırakıldı. İki faz halinde elde edilen malzemeden NH_4^+ (aq) ve NO_3^- (aq) iyonlarından ayırmak için önce distile su daha sonra topaklaşmayı önlemek için aseton ile yıkandı. Mavi bant süzgeç kâğıdından süzüldü. Malzeme 80 °C' ye ayarlı etüve konularak 12 saat bekletildi. Daha sonra malzeme kül fırınında 750° C' de 4 saat kalsine edildi.



Eşitlik 2.1. Hidroksiapatite ait reaksiyon denklemi.

2.3.2. 4- Vinil benzen boronik asit- Hidroksiapatit (4-VBBA-HA) Sentezi

Üç boyunlu balon içerisinde konularak azot (N₂) gazı geçirilen 2.50 g HA, distile su içerisinde 30 dakika boyunca çözünmesi için karışmaya bırakıldı. Oluşan süspansiyona 1 ml distile su içerisinde çözülmüş olan 0.010 g potasyum persülfat ve 0.007 g sodyum metabisülfite eklendi. 0.50 g 4-VBBA karışıma ilave edildi. pH amonyak çözeltisi ile 9.5' a ayarlandı. Reaksiyon N₂ gazı altında oda sıcaklığında 3 saat devam ettirildi. Üç saatin sonunda elde edilen süspansiyon 5000 rpm' de 30 dakika boyunca sentrifüj edildi. Daha sonra çökelti 24 saat boyunca liyofilizatörde freeze-dry işlemine tabi tutuldu [158, 159]. 4- Vinil benzen boronik asit modifiye Hidroksiapatit reaksiyonuna ait görsel Şekil 2.3' te verilmiştir.



Şekil 2.3. 4- Vinil benzen boronik asit- Hidroksiapatit etkileşimi.

2.3.3. Poli(vinilalkol) Esaslı Elektrosinning Kompozisyonların Hazırlanması

146.000 - 186.000 g / mol molekül ağırlığına sahip ve %86-89 hidroliz olmuş poli(vinilalkol)den 10 g alınarak distile su ile 100 ml olacak şekilde %10' luk PVA çözeltisi hazırlandı. Temel stok çözelti olarak bu çözelti kullanıldı. PVA çözeltisinin hücre ekim ortamında çözünmemesi için elektrosin işlemi öncesinde modifiye edildi. Modifikasyon için önce tetraetilortosilikat (TEOS) ve 3-trimetoksisililpropilmetakrilat (MEMO) çözeltileri hazırlandı. TEOS çözeltisi için; 2 ml etanol içerisinde 5.00 g TEOS eklendi. Üzerine 1.30 g saf su ve 0.05 g p-toluensulfonik asit (psa) katalizör olarak eklendi. Bir gece boyunca karışmaya bırakıldı.

MEMO için; 0.92 g etanol içerisinde 5.000 g MEMO eklendi. Üzerine 0.72 g saf su ve 0.03 g p-toluensulfonik asit (psa) katalizör olarak eklendi. Bir gece boyunca karışmaya bırakıldı. Bu çözeltilerden elektrosinning işleminden önce 2.00 g MEMO çözeltisi ve 1.00 g TEOS çözeltisi olacak şekilde 50 ml PVA çözeltisine eklendi [159].

Elektrosin işleminden önce, 50-60 °C' ye ısıtılan ve homojen fiber, küçük çaplı yüksek yüzey alanı eldesi için 30 dakika boyunca karıştırıldı ve elektrosin işleminde iletkenliği arttırması için 0.05 g lityum klorür (LiCl) eklendi. %0.5, %1, %2.5 ve %5 oranlarına sahip 4-VBBA-HA kompozitleri, poli(vinilalkol) çözeltisine ilave edildi. Ultrasonik banyoda 30 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra, süzüldü ve fotobaşlatıcı eklendi. Homojen karışım elde edildikten sonra elektrosinning işlemi uygulandı.

2.3.4. Kollajen Serisi Çözeltilerin Hazırlanması

Kollajen çözeltisi, 10 mg tip I kollajenin 5 ml distile su içerisinde çözülmesi ile hazırlandı. Daha sonra püskürtme şişesine alınan kollajen çözeltisi, elektrosinning işleminden sonra elde edilen nanofiber membranların üzerine püskürtüldü.

2.3.5. Keratin Serisi Çözeltilerin Hazırlanması

Keratin içeren serinin hazırlığı için, kuaförden herhangi bir kimyasal işlem görmemiş saç temin edildi. 0.50 g alınarak tartıldı ve kirliliklerden arınması için su ve diklorometan ile yıkandı. Daha sonra 10 ml 3 M NaOH çözeltisi içerisinde çözüldü.

Kollajen serisinde en iyi fiber oluşumunun gözlemlendiği F4 formülasyonu temel alınarak farklı oranlarda keratin çözeltisi eklendi. Keratin oranları sırasıyla 2 ml, 1 ml ve 0.5 ml olarak belirlendi.

2.3.6. Elektrospinning

Deneylerde kullanılan elektrospinning düzeneği Şekil 2.1’de verilmiştir. Elektrospinning düzeneği; yüksek voltajlı güç kaynağı, polimer çözeltisi içeren şırınga, UV kaynağı ve döner silindir toplayıcıdan oluşmaktadır. Çalışmalar sırasında pozitif yüksek voltajlı güç kaynağı bir kablo aracılığıyla, içerisinde polimer çözeltisi bulunan şırınga ucuna uygulanmıştır. Elektrik akımının uygulanması ile elde edilen nanofiber membranlar döner tablaya sarılmış olan alüminyum folyo üzerinde toplanmıştır. Sekiz saatlik elektrospinning işlemi sonrası alüminyum folyo üzerinde elde edilen nanofiber membranlara ait görüntü Şekil 2.4’te verilmiştir.



Şekil 2.4. Elektrospinning işlemi sonrası alüminyum folyo üzerinde elde edilen nanofiberler membranının görüntüsü.

Uygulanan elektrik akımı, toplayıcı uzaklığı ve dozajlama parametreleri Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Kollajen ve keratin serilerinde uygulanan elektrospinning parametreleri.

Seri Adı	Formülasyon	Uygulanan voltaj* (kV)	Toplayıcıya Uzaklık (cm)	Dozajlama (ml/sa)
Kollajen	F0	25	15	0.5
	F1	26	15	0.5
	F2	26	15	0.5
	F3	26	15	0.5
	F4	25	15	0.5
	F5	25	15	0.5
Keratin	F0	16	10	0.5
	F1	16	10	0.5
	F2	16	10	0.5
	F3	16	10	0.5

*Formülasyonlarda jetin oluştuğu voltajlarda çalışılmıştır.

Tablo 2.2 ve Tablo 2.3’ de Kollajen ve keratin serilerine ait hibrit membranların formülasyonları verilmiştir.

Tablo 2.2. Kollajen serisi hibrit nanofiber membranların formülasyonları.

Formülasyon	4-VBBA-HA	HA	PVA**	TEOS	MEMO	Fotobaşlatıcı
	(g)	(g)	(g)	(ml)	(ml)	(g)
F0	-	-	5	1	2	0.06
F1	-	5	5	1	2	0.06
F2	5	-	5	1	2	0.06
F3	2.5	-	5	1	2	0.06
F4	0.5	-	5	1	2	0.06
F5	1	-	5	1	2	0.06

Tablo 2.3. Keratin serisi hibrit nanofiber membranların formülasyonları.

Formülasyon	4-VBBA-HA	PVA**	Keratin	TEOS	MEMO	Fotobaşlatıcı
	(g)	(g)	(g)	(ml)	(ml)	(g)
F0	-	5	1	1	2	0.06
F1	0.5	5	2	1	2	0.06
F2	0.5	5	1	1	2	0.06
F3	0.5	5	0.5	1	2	0.06

**PVA ana çözelti konsantrasyonu % 10' dur.

2.4. Hibrit Membranların Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler

2.4.1. Fourier Transform Infrared Analizi

Elde edilen malzemeler ve nanofiberlerin analizi ATR- FTIR Spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirildi. Spektrumlar Perkin Elmer Spektrum 100 FTIR Spektrometre cihazı ile kaydedildi.

2.4.2. Termogravimetrik Analiz

Sentezlenen HA ve 4-VBBA-HA malzemelerinin termal kararlılıklarını belirlemek amacıyla, Perkin Elmer Pyris 1 model TGA cihazı kullanıldı. Ölçümler azot atmosferinde 10 °C / dk ısıtma hızıyla 30 °C- 700 °C sıcaklıkları arasında yapıldı.

2.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu

Elektrospin edilmiş nanofiberlerin morfolojik incelemeleri, Boğaziçi Üniversitesi' nde bulunan Philips marka XL30 ESEM-FEG/EDAX model cihazı görüntülemeye önce altın kaplanarak ile yapıldı. Hücre ekim çalışmaları sonrası alınan nanofiberler fiber boyutları ve hücre görüntülemesi için aynı cihazda inceleme işlemleri tekrarlandı.

2.4.4. Temas Açısı Ölçümleri

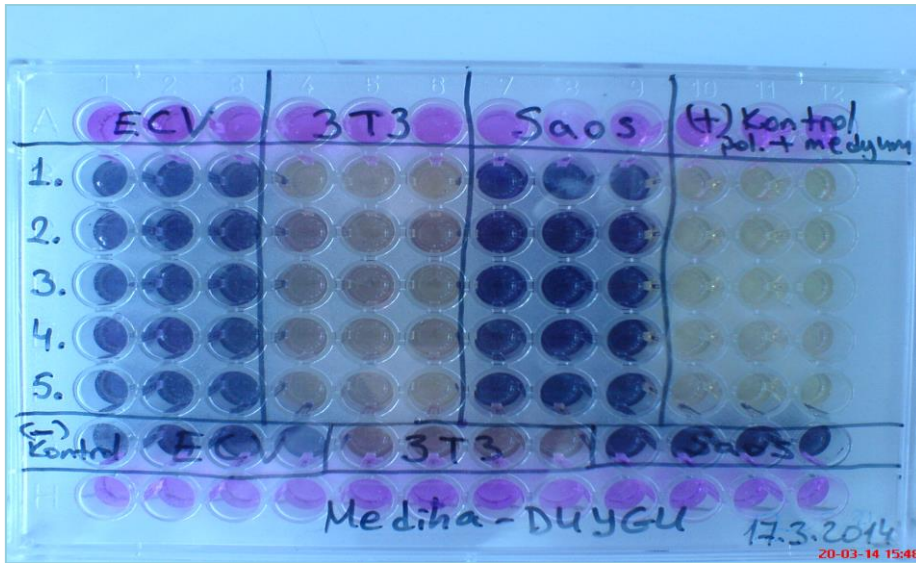
Sentezlenen hibrit membranların statik su temas açıları sesil damla analizi yöntemi ile Krüss marka, DSA 10 model temas açısı ölçüm cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Bu yöntemde 1µl su bir şırınga yardımıyla nanofiberlerin üzerine damlatılmıştır.

2.5 Hücre Kültür Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Temel Bilimler Fizyoloji Bölümünde gerçekleştirilmiştir. Nanofiber membranların hücre kültürü çalışmaları için, American Type Culture Collection (ATCC) ‘ den temin edilen, üç farklı kökende, epithelial cell vacolization (ECV 304), sarcoma osteogenic (SAOS) ve embryonic calvarium (3T3) hücreleri kullanılmıştır. ECV 304 hücreleri, insanlarda görülen mesane kanseri tipi hücreler olarak tanımlanır. SAOS hücreleri, birincil osteosarcomadan türetilen bir hücre serisidir. Kemik ilişkili moleküllerin eldesinde

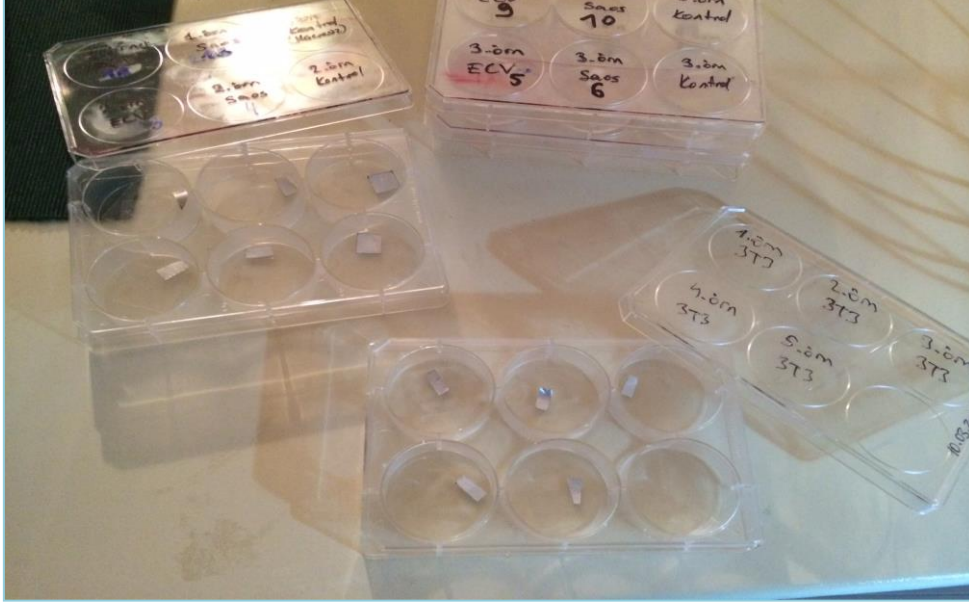
kullanılmaktadır. 3T3 hücreleri ise; birincil fare embriyonik fibroblast hücrelerin kültürlenmesi ile elde edilmiştir. Bu hücre tipi genelde cildin üst tabakasında bulunan keratinlerin büyütülmesi işleminde kullanılır. Çalışma sırasında elde edilen nanofiber membranlar delgeç yardımı ile 96 kuyucuklu ekim tablalarına cımbızla yerleştirilmiştir. UV altında üç saat boyunca steril edildikten sonra her bir hücre başına üçlü çalışma yapılacak şekilde kodları yazıldı. Kuyucuk başına 100.000 hücre / 100 µL gelecek şekilde mikropipet ile hücre süspansiyonu ekildi. Üç gün boyunca 37°C' de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi [97, 156, 160]. Hücrelere MTT eklendi ve Kayto marka ELISA spektrofotometresinde absorbans değerleri okutuldu [144, 146, 160, 161]. Şekil 2. 5'te MTT ilave edildikten sonra nanofiber membranların fotoğrafı görülmektedir.

Okuma sonrası hücrelerin SEM görüntülemesine gönderimi için fiksasyon işlemi uygulandı. Bu işlem için örnekler 1 cm²' lik alanlar şeklinde kesilerek 3 saat UV altında steril edildi. ECV 304 ve SAOS hücreleri 800.000; 3T3 hücreleri 300.000 hücre olacak şekilde 100 µL olarak kesilen nanofiberlerin üzerine eklendi. 24 saat 37°C' de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Hücreler %3' lük gluteral aldehyd ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında hücreler 10-20 dakika boyunca fosfat tamponu ile oda sıcaklığında yıkandı. Dehidrasyon işlemi için ise hücreler sırasıyla, %30,% 50, %70, %80,% 90 , %95 ve %100 etanol eklenerek 10 dakika bekletildikten sonra pipet ile geri çekilmiştir.



Şekil 2. 5. MTT testi sonrası nanofiber membranların görünümü.

Örnekler, işlem sonrasında -20°C ' de muhafaza edilmiştir. Şekil 2.6' da MTT testi sonrası SEM görüntülemesi için hazırlanan nanofiber membranların görüntüsü görülmektedir.



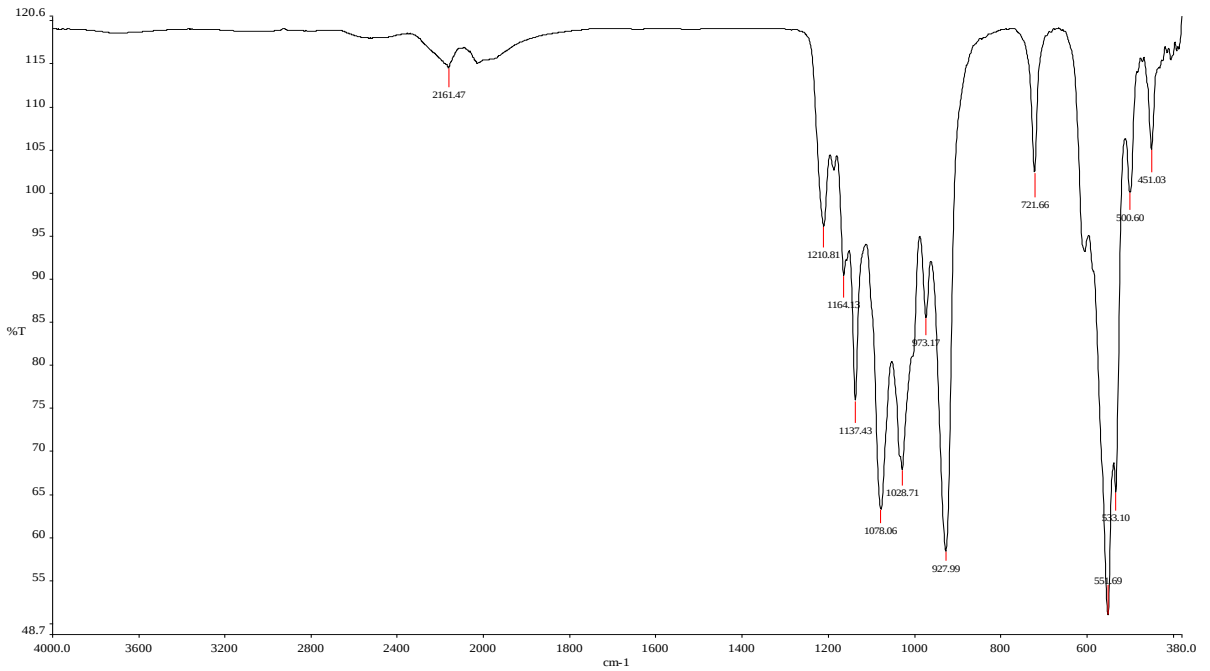
Şekil 2.6. MTT testi sonrası SEM görüntülemesi için hazırlanan nanofiber membranların görünümü.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Hidroksiapatit ve 4-Vinil benzen boronik asit- Hidroksiapatit Karakterizasyonu

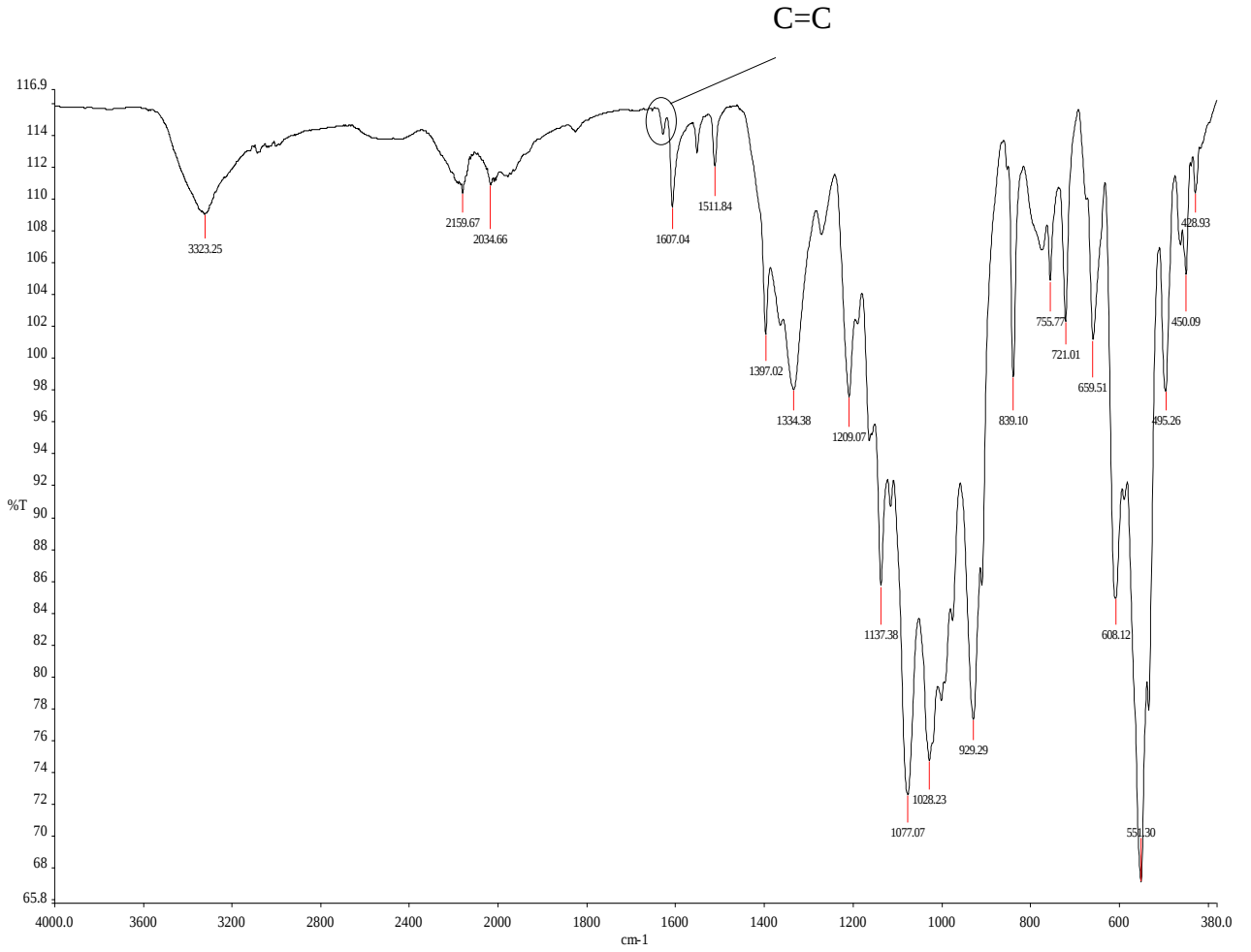
3.1.1. Fourier Transform Infrared Analizi

Hidroksiapatit sentezlendikten sonra yapı karakterizasyon işlemi için FT-IR spektroskopisi yöntemi kullanılmıştır. Şekil 3. 1' de FT-IR spektrumu verilmektedir. FT-IR spektrumu incelendiğinde, 451 cm^{-1} ve 551 cm^{-1} civarındaki piklerin HA' a ait karakteristik pikler olduğu bilinmektedir. HA' a ait pikler literatür incelendiğinde 1100 ve 1000 cm^{-1} bölgesinde toplandığı bilinmektedir [132]. 1078 cm^{-1} , 973 cm^{-1} ve 533 cm^{-1} pikleri ise fosfat grubundaki O-P-O' ya aittir [115, 158, 162].



Şekil 3.1. Hidroksiapatite ait FT-IR Spektrumu.

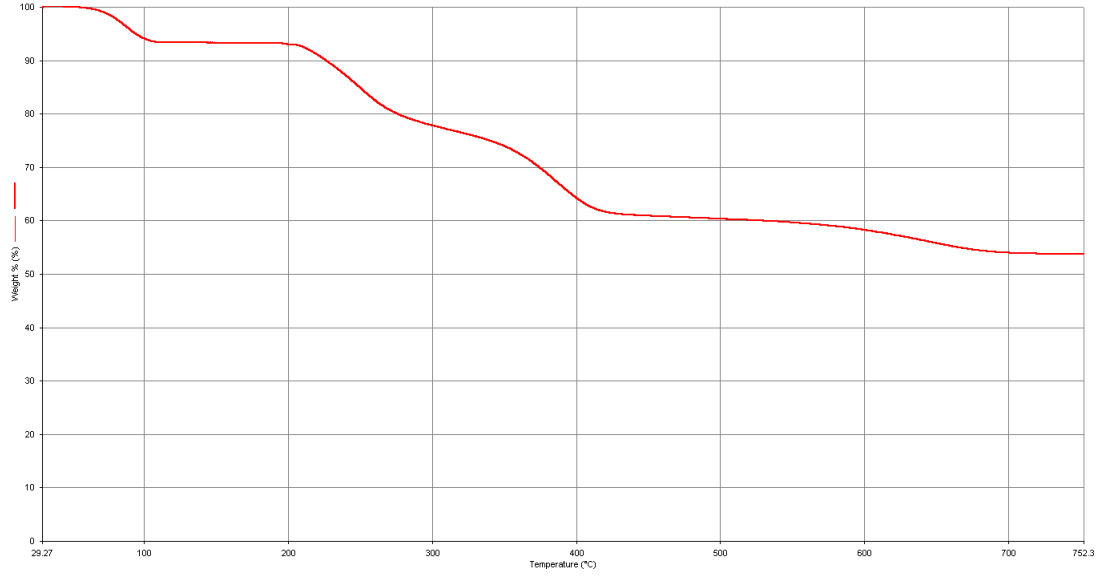
4-VBBA-HA'ın karakterizasyonu FT-IR spektroskopisi yardımı ile yapılmıştır. Şekil 3. 2 'de görülen FT-IR spektrumundaki 3323 cm^{-1} deki hidroksil grupları ve 1630 cm^{-1} deki C=C titreşim bandı 4- VBBA-HA' ya aittir [158]. Söz konusu bu pikler HA' in yapısında bulunmamaktadır. $1500 - 1600\text{ cm}^{-1}$ ' de aromatik titreşim bantları ve $750-840\text{ cm}^{-1}$ ' de ise aromatik halkaya ait gerilme titreşim bantları görülmektedir [163].



Şekil 3.2. 4-Vinil benzen boronik asit- Hidroksiapatite ait FT-IR Spektrumu.

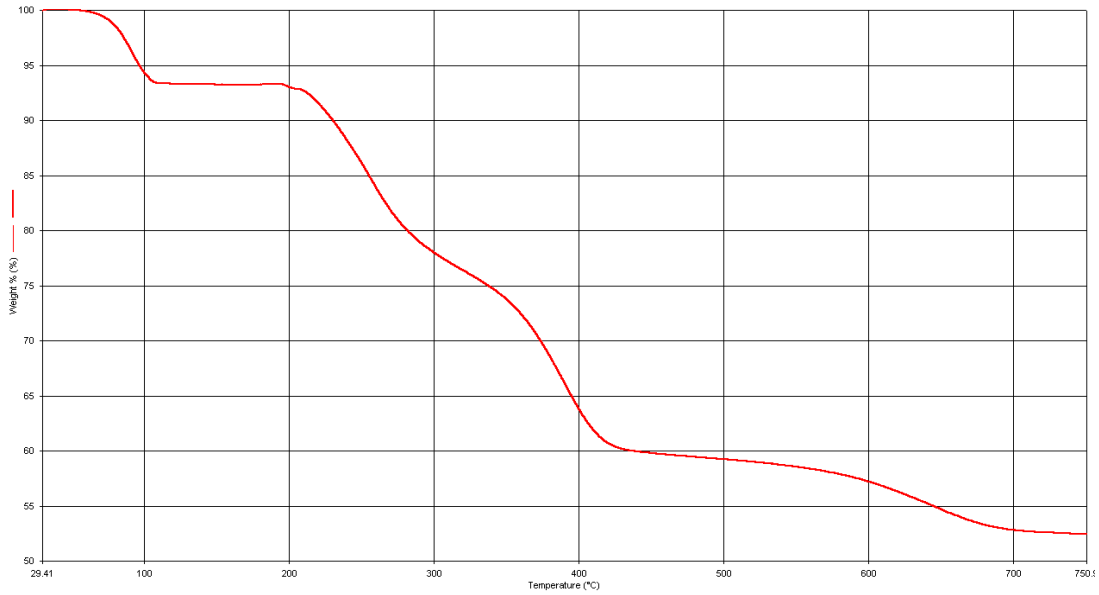
3.1.2. Termal Gravimetrik Analiz

Elde edilen malzemelerin termal kararlılığı TGA ile belirlendi. Numuneler TGA cihazında 30 °C' den 750 °C' ye 10 °C/ dakika hızla azot atmosferi altında ısıtılarak Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te görülen termogramalar elde edildi. Şekil 3.3' te Hidroksiapatit ve Şekil 3.4'te 4- Vinil benzen boronik asit - Hidroksiapatite ait termogram görülmektedir.



Şekil 3.3. Hidroksiapatite ait Termogram.

Şekil 3.3'teki termogram incelendiğinde; HA' in dört basamakta bozunma gösterdiği görülmektedir. Ana bozunma sıcaklığı 380°C' de gerçekleşmiş ve kül oranı %53 olarak bulunmuştur. 190°C, 280°C, 380 °C olan pikler daha önce yapılan literatür çalışmaları ile de uyumludur [157, 164,165]. 610°C' den sonrasında belirli bir ağırlık kaybı gözlenmemiş ve bu durum HA' in bu sıcaklıktan sonra sabit bir faz oluşturduğunu göstermektedir [164].



Şekil 3.4. 4- Vinil benzen boronik asit - Hidroksiapatite ait Termogram.

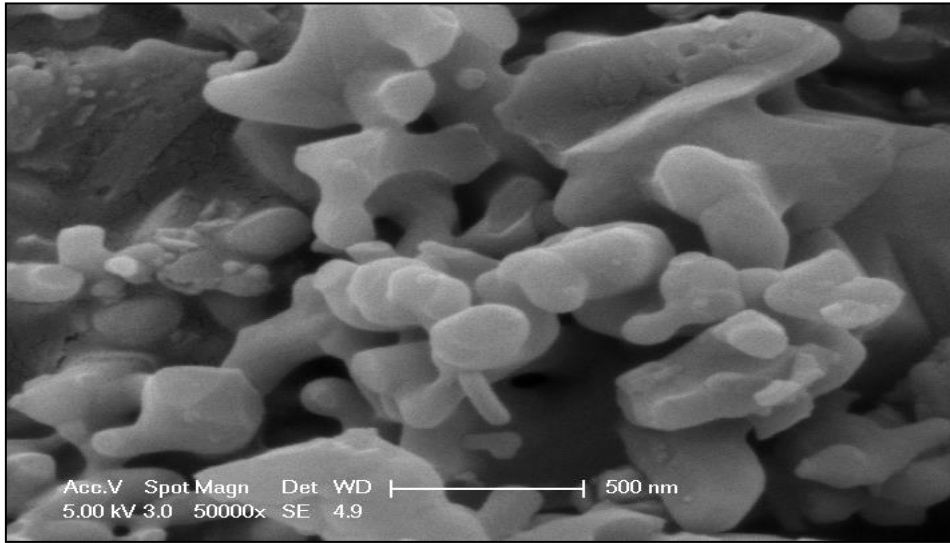
Şekil 3.4' teki termogram incelendiğinde 4-VBBA-HA' in hidroksiapatite benzer şekilde üç basamakta bozunduğu görülmektedir. HA %53 oranında kül miktarına sahipken, 4-VBBA-HA % 54.3 oranında kül bırakmıştır. Bu durum kısmen termal dayanımın arttığını göstermektedir. Doku iskelelerinde termal özelliklerden ziyade malzemenin mekanik özellikleri, biyo bozunma, toksik olmaması özellikleri oldukça önemlidir.

Tablo 3.1 Hidroksiapatit ve 4- Vinil benzen boronik asit- Hidroksiapatite ait TGA sonuçları.

Seri Adı	Ana kütle Kaybı	% Kül
Hidroksiapatit	380 °C	53.0
4- Vinil benzen boronik asit- Hidroksiapatit	385 °C	54.3

3.1.3. Taramalı Elektron Mikroskobu

4-Vinil benzen boronik asit modifiye HA ın morfolojisinin incelenebilmesi için altın kaplanmıştır. Şekil 3.5' te 4-VBBA modifiye hidroksiapatitin SEM görüntüsü görülmektedir. Hidroksiapatite ait SEM görüntüsü EK 5- Şekil 1' de verilmiştir.



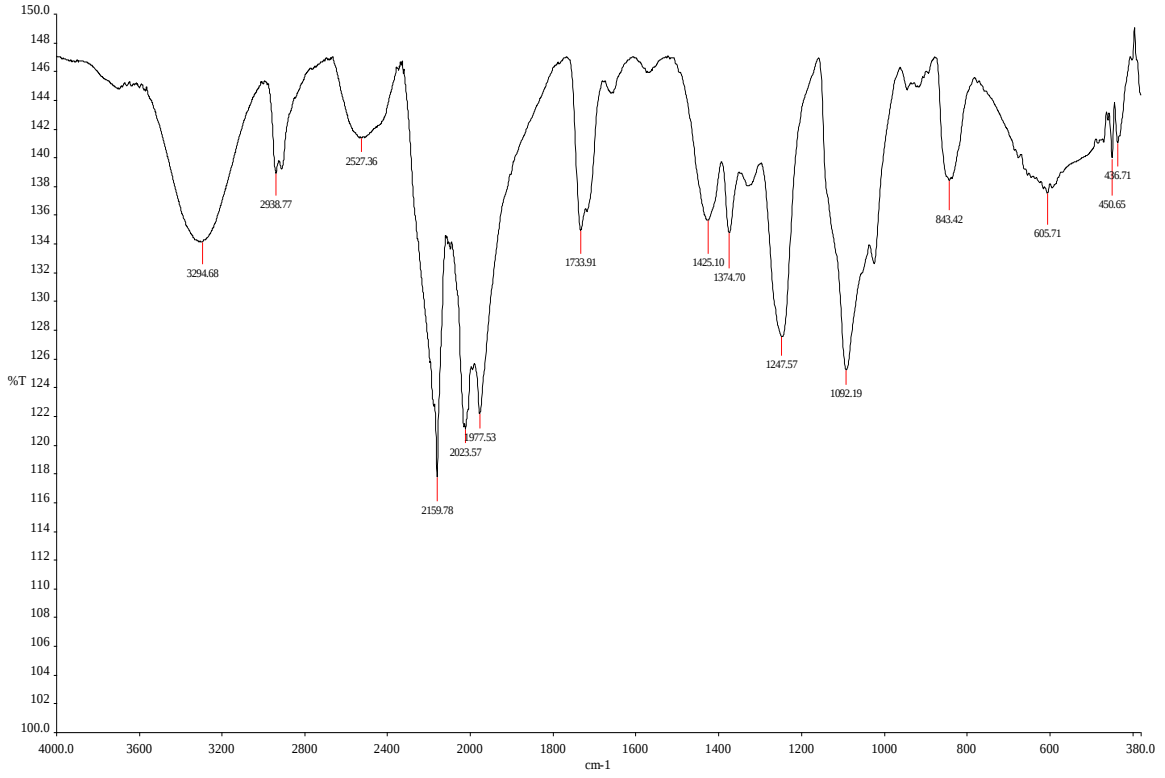
Şekil 3.5. 4-Vinil benzen boronik asit - Hidroksiapatite ait SEM fotoğrafı (x 50.000).

Elde edilen 4-VBBA-HA, mevcut literatür çalıştırılmaları ile karşılaştırıldığında; 1 μ 'dan daha küçük topaklanmış partiküller şeklinde görülmektedir [108, 115, 164, 165]. SEM görüntülerine göre 4-Vinil benzen boronik asit – Hidroksiapatit tanecik büyüklüğünün topaklanma olan bölgelerde 1 μ 'nun altında, topaklanmanın olmadığı bölgelerde 100-200 nm tanecik büyüklüğü aralığında olduğu görülmüştür.

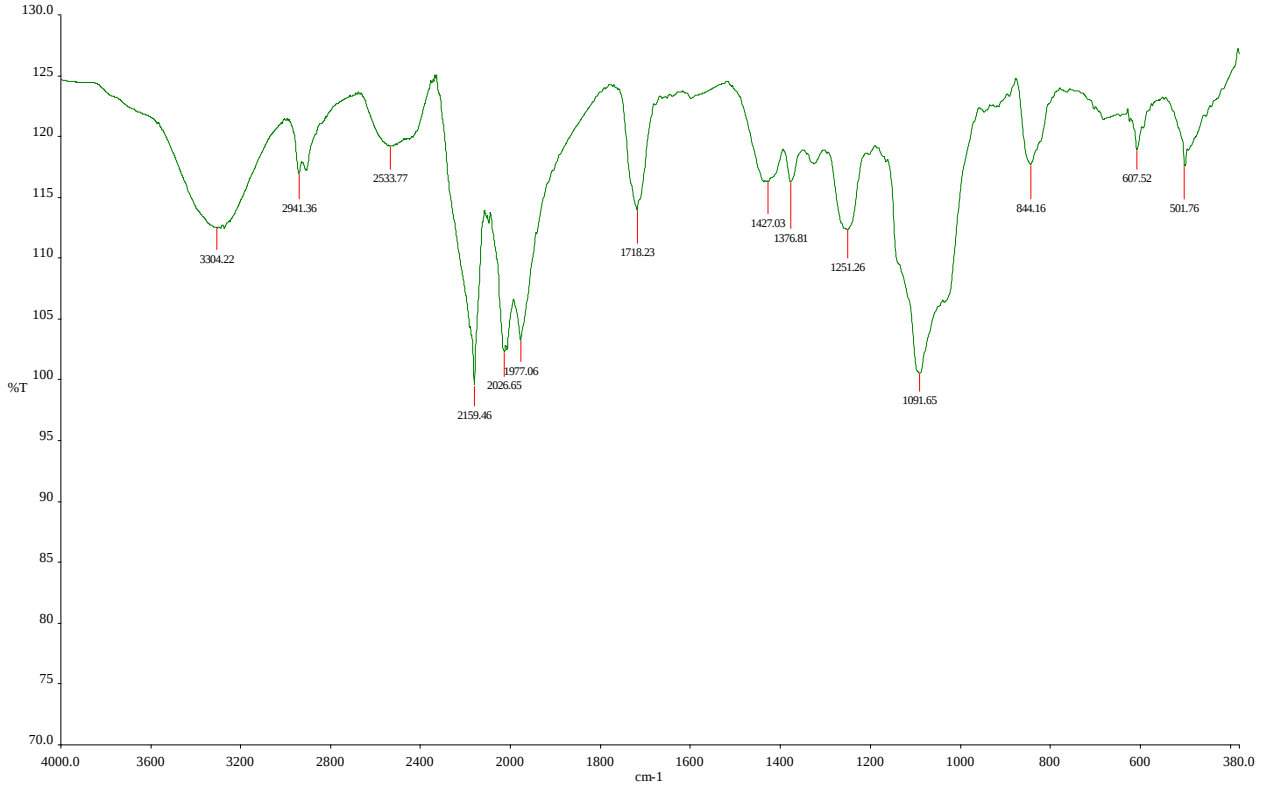
3.2. Hibrit Nanofiber Membranların Karakterizasyonu

3.2.1. Fourier Transform Infrared Analizi

Elektrospinning yöntemi ile elde edilen 4-VBBA-HA / PVA hibrit nanofiber membranlarının yapı karakterizasyonu FT-IR spektroskopisi yardımı ile yapılmıştır. Şekil 3.6'da F4- Kollajen ve Şekil 3.7'de F2- Keratin serilerine ait FT-IR spektrumu görülmektedir. F0, F1, F2, F3 ve F5- Kollajene ve F1 ve F3- Keratine ait spektrumlar EK 1- Şekil 1- EK 1- Şekil 8' de verilmiştir. F4- Kollajene ait spektrum incelendiğinde 2938 cm^{-1} , 2527 cm^{-1} , 1733 cm^{-1} , 1425 cm^{-1} , 1334 cm^{-1} , 1092 cm^{-1} , 843 cm^{-1} 'de karakteristik PVA pikleri görülmektedir [44]. 3294 cm^{-1} 'de PVA ana zincirindeki hidroksil gruplarına ait (-OH) bantları görülmektedir. F2- Keratin spektrumu incelendiğinde, 2941 cm^{-1} , 2533 cm^{-1} , 1718 cm^{-1} , 1427 cm^{-1} ve 1091 cm^{-1} ' de PVA' ya ait pikler görülmektedir. [135]. Kollajen ve keratin protein yapısında olduklarından çok sayıda amid bağları içermektedirler. Ancak keratin kollajenden farklı olarak $500\text{-}540\text{ cm}^{-1}$ ' de zayıf disülfid titreşim bantları gözlenir [166]. Şekil 3.7' de F2- Keratin formülasyonuna ait disülfid titreşim bandı 501 cm^{-1} ' de görülmektedir.



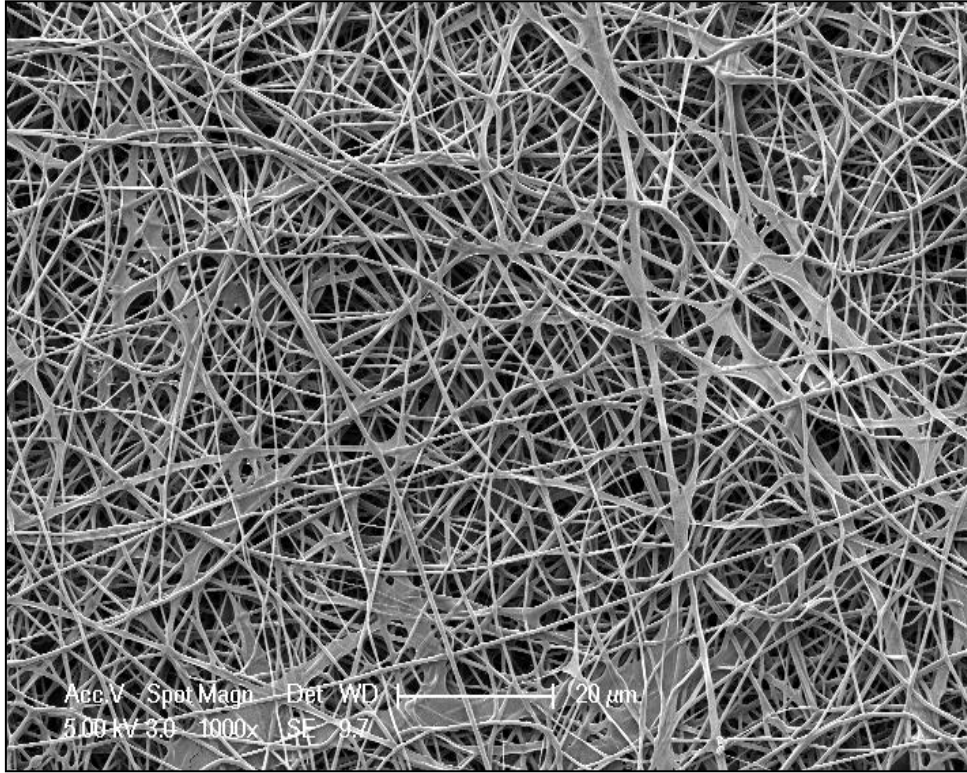
Şekil 3.6. F4 – Kollajen formülasyonuna ait FT-IR Spektrumu.



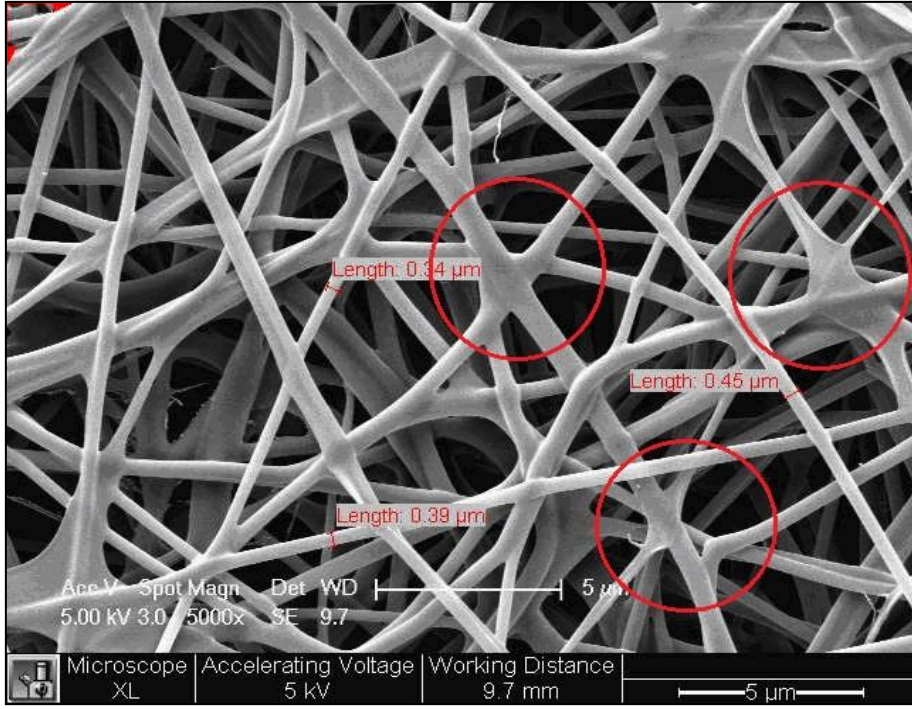
Şekil 3.7. F2 – Keratin formülasyonuna ait FT-IR Spektrumu.

3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy-SEM)

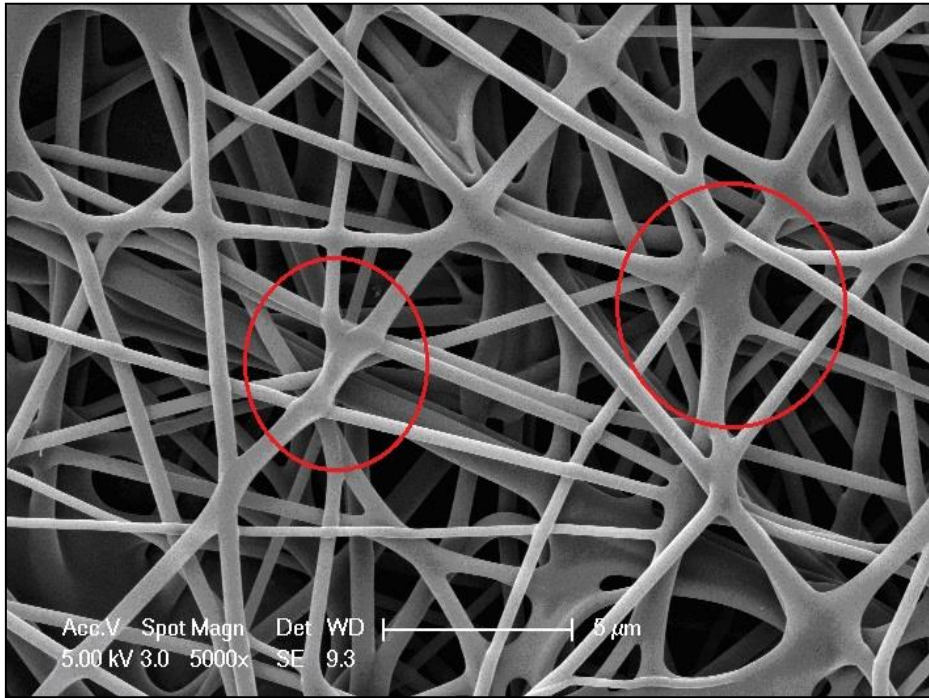
Elde edilen nanofiber membranların yapısı ve yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 3.8 - Şekil 3.15'deki fotoğraflar elektrospinning sonucunda elde edilen nanofiberlerin morfolojilerinin incelenebilmesi için altın kaplanmışlardır. Nanofiberlerin boncuksuz, düzgün fiber formunda oldukları görülmüştür. Bu durum elektrospinning sırasındaki çözelti akış hızının, voltajın, mesafenin, viskozitenin ideal fiber oluşumu için uygun olduğu ile açıklanabilir [97]. Elde edilen fiberlerin çapları 230 nm ile 430 nm arasındadır. Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11' de çapraz bağ noktalarından bazıları görülmektedir. EK 2-Şekil 1 – EK 2-Şekil 14'te diğer Kollajen ve Keratin serisi nanofiber membranlara ait fotoğraflar verilmiştir.



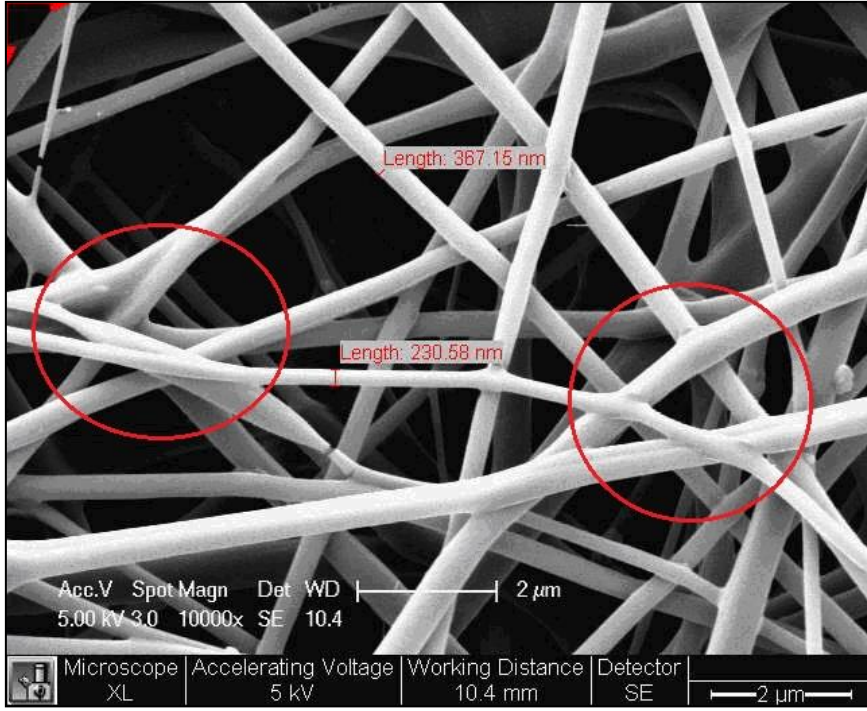
Şekil 3.8. F0- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X1.000).



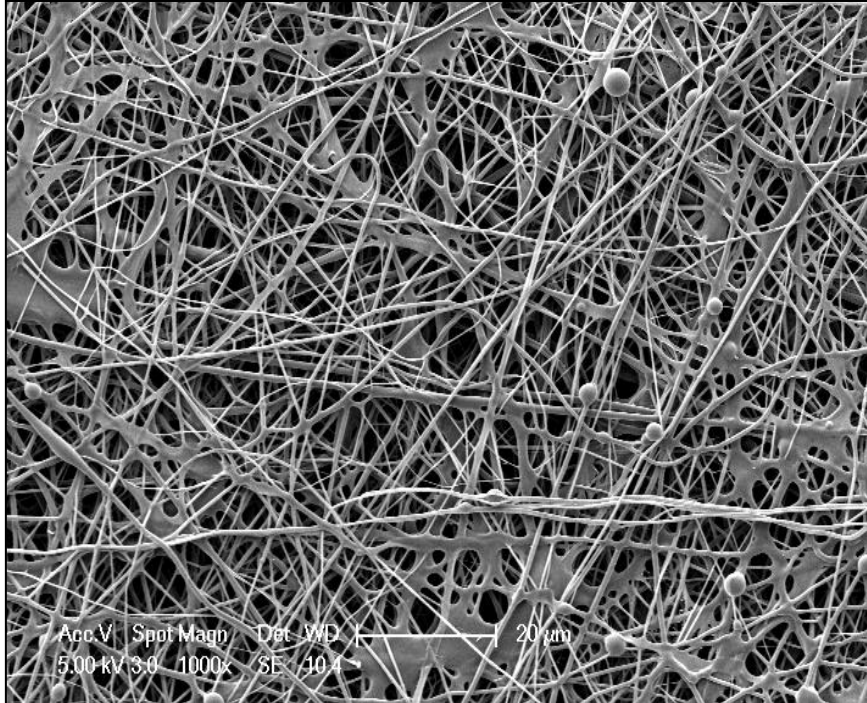
Şekil 3.9. F4- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X5.000).



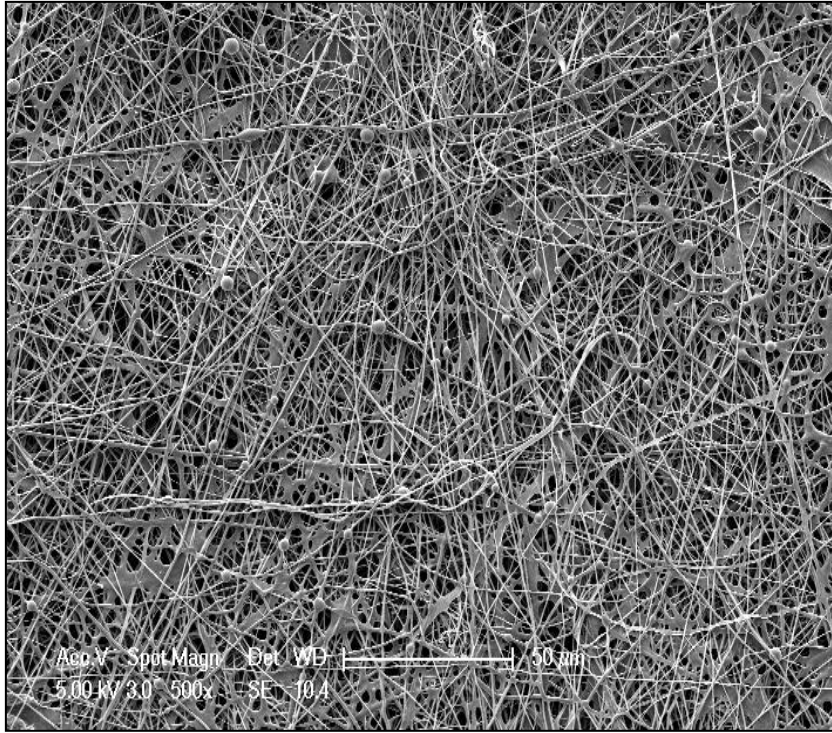
Şekil 3.10. F5- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X5.000).



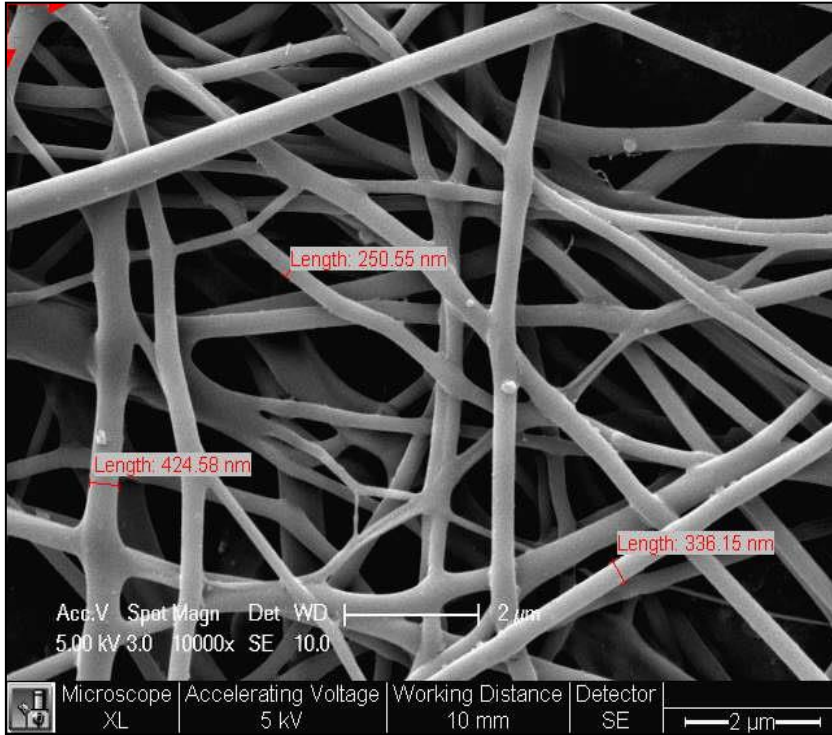
Şekil 3.11. F1- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X10.000).



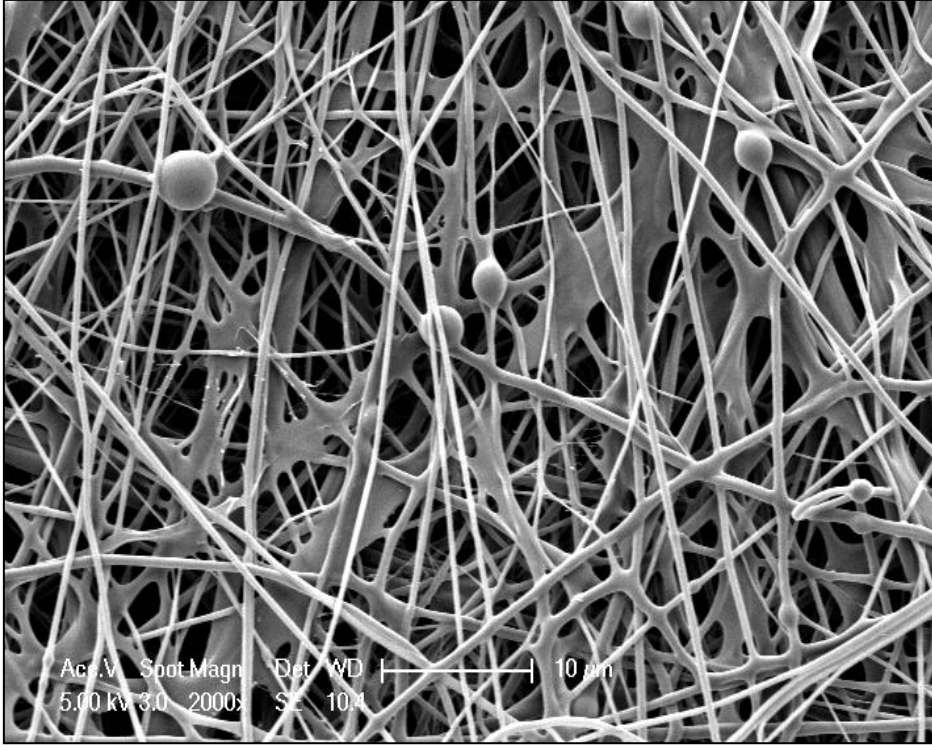
Şekil 3.12. F2- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X1.000).



Şekil 3.13. F2- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X500).



Şekil 3.14. F2- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X10.000).

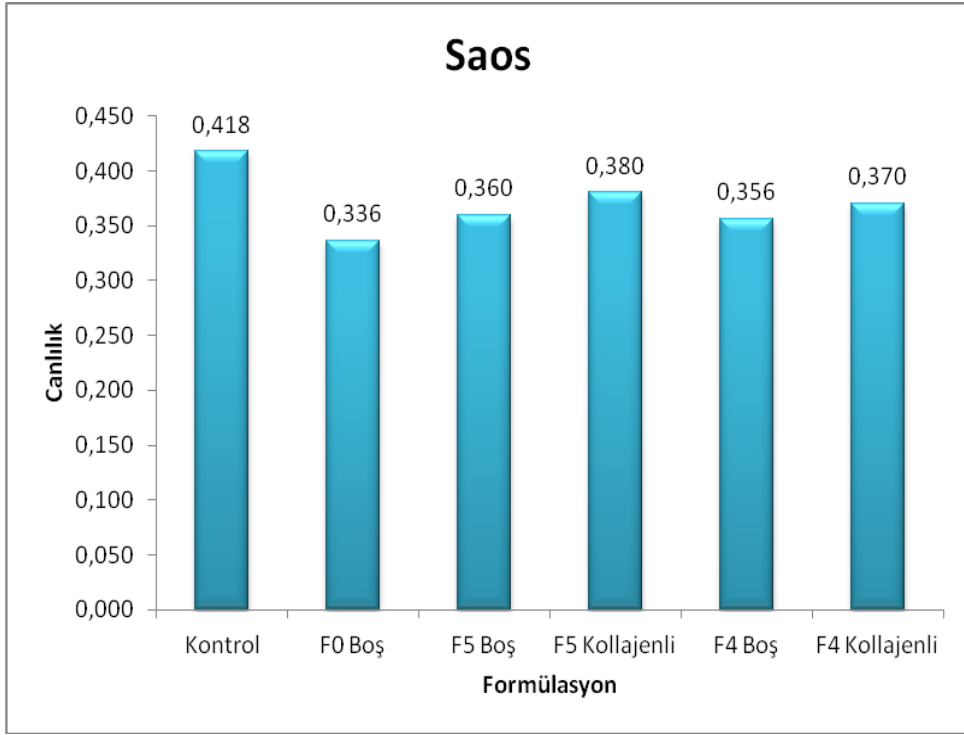


Şekil 3.15. F3- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X2.000).

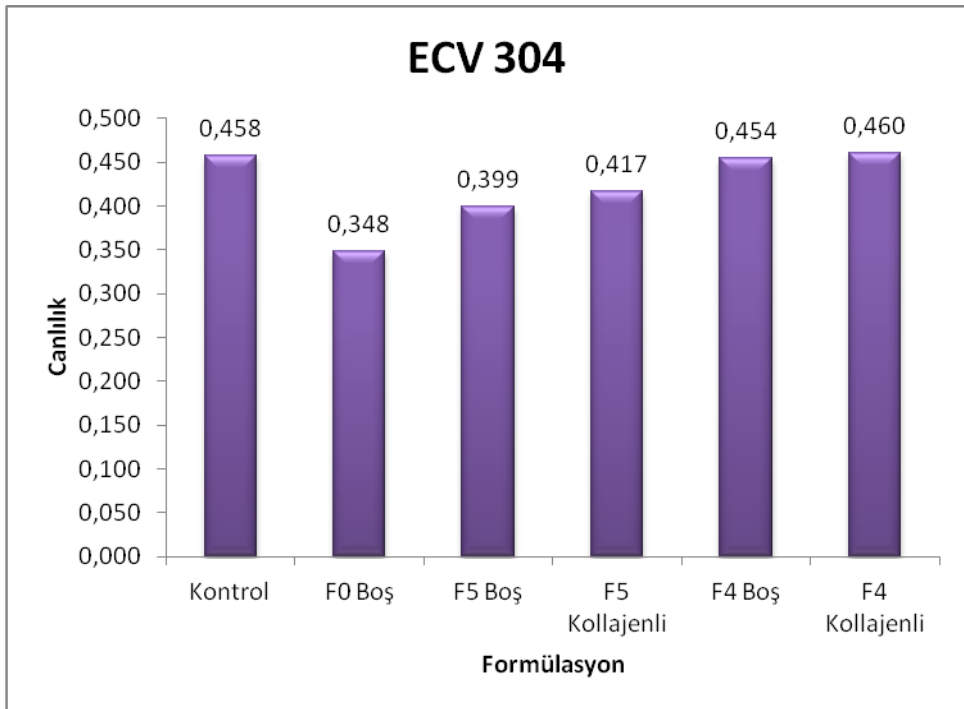
3.2.3. Hücre Ekimi Sonrası MTT Testleri

Nanofiber yapıda boncuksuz ve homojen bir yapı gösteren F0- Kollajen, F4- Kollajen ve F5- Kollajen örneklerine Epithelial cell vacolization (ECV 304), sarcoma osteogenic (SAOS) ve embryonic calvarium (3T3) hücreleri ekilmiştir. Kollajen serisine ekimi yapılan SAOS hücrelerine ait MTT testi grafik sonucu Şekil 3.16’da; ECV 304 hücrelerine ait test sonuçları Şekil 3.17’de; 3T3 hücrelerine ait MTT sonuçları ise Şekil 3.18’de verilmiştir.

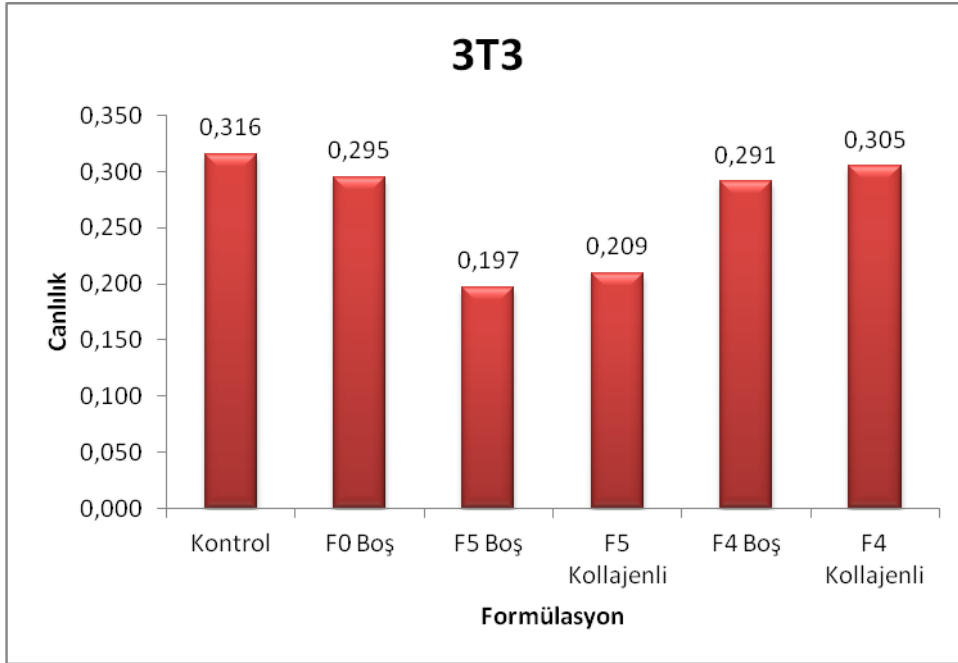
Keratin serisinin tamamına ekimi yapılan SAOS hücrelerine ait MTT testi grafik sonucu Şekil 3.19’da; ECV 304 hücrelerine ait MTT grafiği Şekil 3.20’de; 3T3 hücrelerine ait MTT sonuçları ise Şekil 3.21’de verilmiştir [167-168].



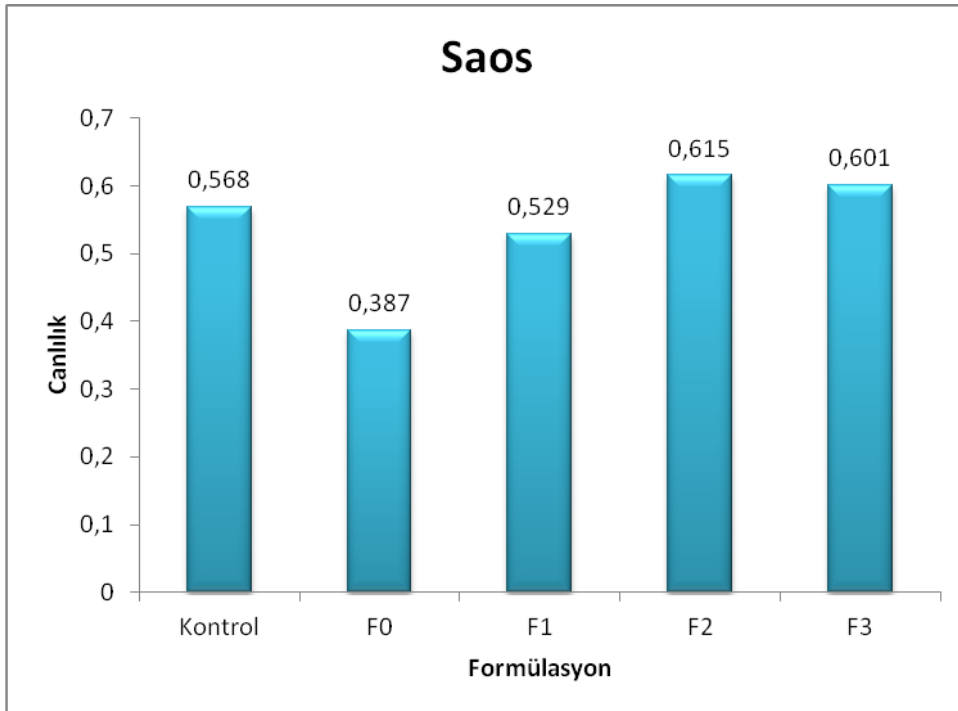
Şekil 3.16. Kollajen formülasyonu- SAOS hücre ekimi sonrası MTT grafiği.



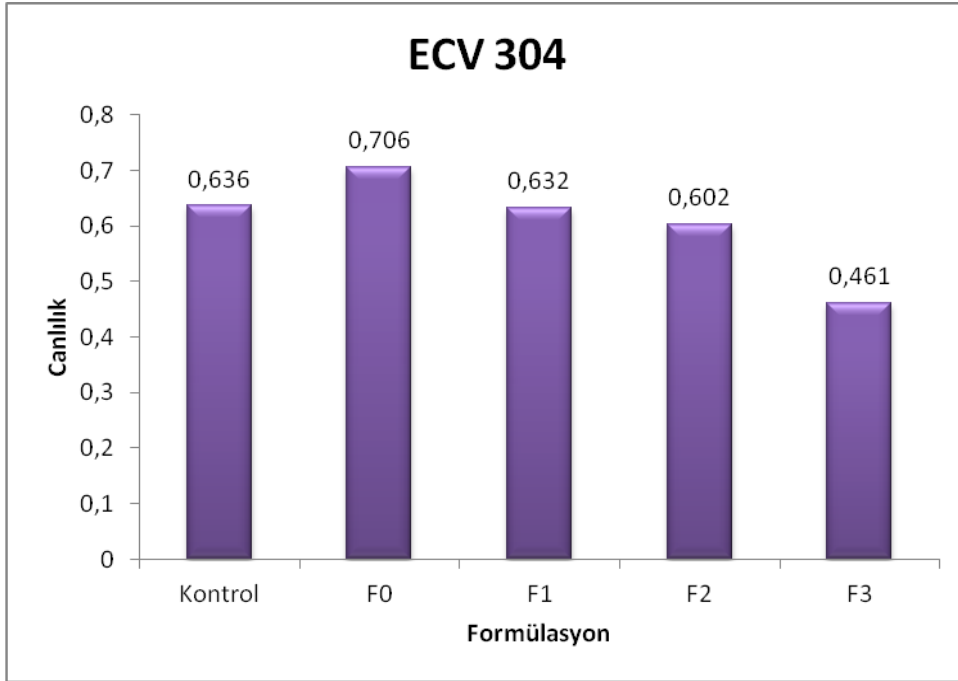
Şekil 3.17. Kollajen formülasyonu- ECV 304 hücre ekimi sonrası MTT grafiği.



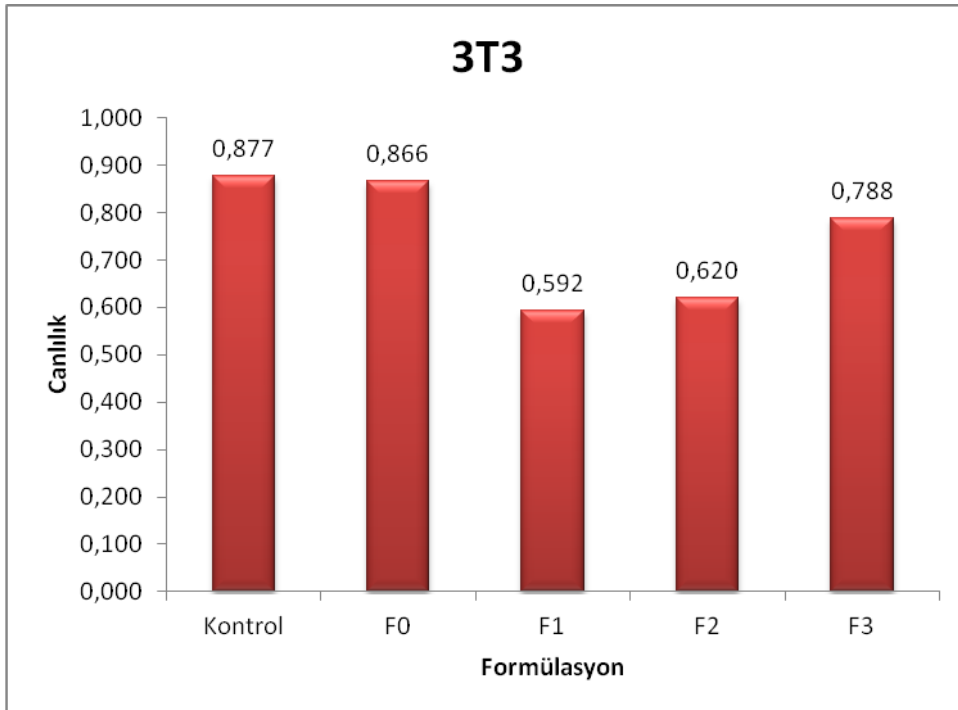
Şekil 3.18. Kollajen formülasyonu- 3T3 hücre ekimi sonrası MTT grafiği.



Şekil 3.19. Keratin formülasyonu- SAOS hücre ekimi sonrası MTT grafiği.



Şekil 3.20. Keratin formülasyonu-ECV 304 hücre ekimi sonrası MTT grafiği.



Şekil 3.21. Keratin formülasyonu- 3T3 hücre ekimi sonrası MTT grafiği.

3.2.4. Taramalı Elektron Mikroskobu - EDS Ölçümleri

Taramalı elektron mikroskobunda enerji dağılım spektrometre kullanılarak element konsantrasyonları belirlenmiştir. Keratin serisi F2 formülasyonuna ait SEM-EDS sonuçları Tablo 3.2’ de verilmiştir. B, C, N, O, Si, P, S ve Ca için ağırlık yüzdeleri sırasıyla 3.72, 48.05, 11.59, 10.14, 2.74, 15.78, 1.99 ve 5.98 olarak bulunmuştur. Kükürt varlığı keratin dokusunun korunduğunu göstermektedir. Azot varlığı ise hücre ekim işleminin varlığını ve yüzeyde bulunan hücrelerin varlığını göstermektedir [169]. Ayrıca B, Ca ve P varlığı 4-VBBA-HA yapısını doğrulamaktadır.

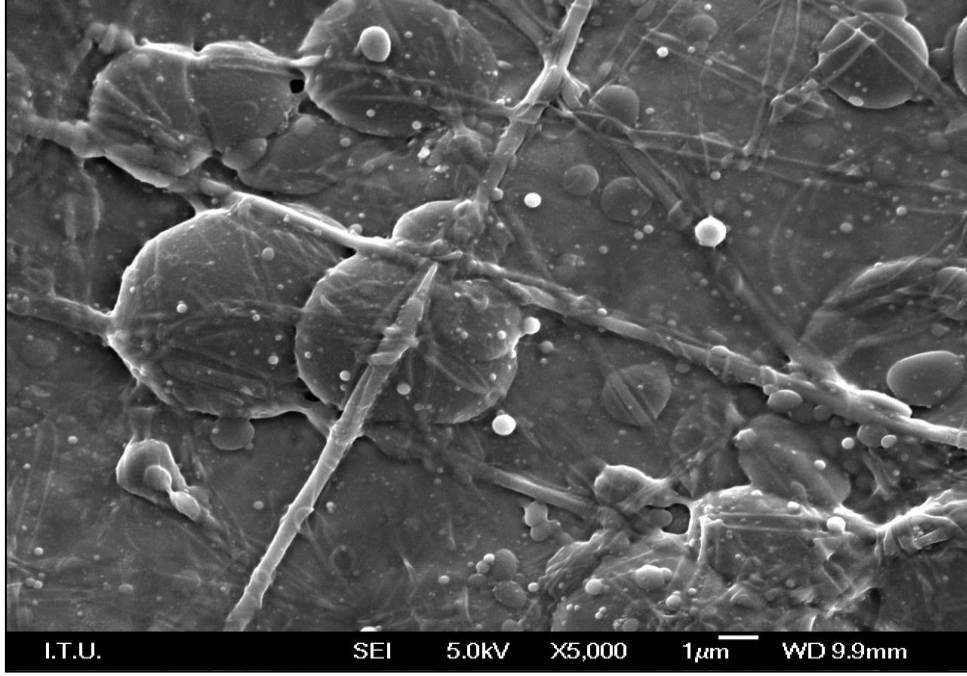
Tablo 3.2. F2- Keratin serisine ait SEM-EDS ölçüm değerleri.

Element	B	C	N	O	Si	P	S	Ca	Toplam
Wt %	3.72	48.05	11.59	10.14	2.74	15.78	1.99	5.98	99.99
At %	6.97	56.92	11.77	9.02	1.39	7.25	0.88	5.80	100

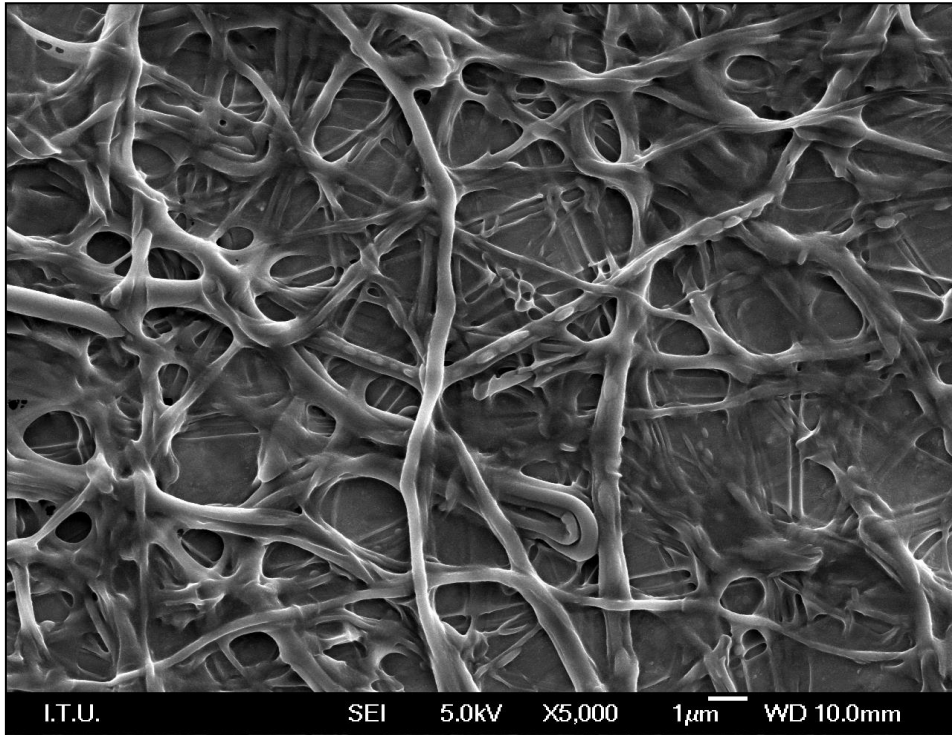
3.2.5. Hücre Ekimi Sonrası Taramalı Elektron Mikroskobu

ECV 304, SAOS ve 3T3 hücrelerinin nanofiber membranların üzerine ekilmesinden sonra 24 saat inkübe edildikten sonra fikse edilmiş ve morfolojik analizler için fiberler altın kaplanarak SEM görüntülemeleri alınmıştır. Kollajen içeren örnekler Şekil 3.22-Şekil 3.24’te verilmiştir. SAOS ve ECV 304 içeren nanofiber membranlarda fiber yapısının korunduğu, hücrelerin fiber dokusu içerisine nüfuz ettiği ve çoğalarak kısmen doku oluşumuna gittiği görülmektedir. Nanofiber membran hidrofilik yapıda olup su veya tamponu hızla bünyesine alarak fiber dokunun morfolojisinin değişmesine yol açmıştır. Bu sonuç temas açısı ölçmeye çalıştığımız örneklerin suyu hızla adsorplayarak hidrofil olma davranışlarıyla da örtüşmektedir. Şekil 3.22’de verilen 3T3 hücresine ait örnekte ise, hücrelerin çoğaldığı, çapraz bağlanma oranının çok fazla olmadığı ve fiber yapısının tamamen korunmadığı görülmektedir. Keratin içeren örnekler Şekil 3.25-Şekil 3.27’de verilmiştir. Hücre ekimlerinden sonra fiber çaplarında nanofiber membranlar hidrofilik olduğundan, hücre ortamı suyunu emerek kalınlaşmaya sebep olmuştur. Şekil 3.25’ te muhtemel doku oluşumu görülmektedir. Ek 3-Şekil 1 – Ek 3-

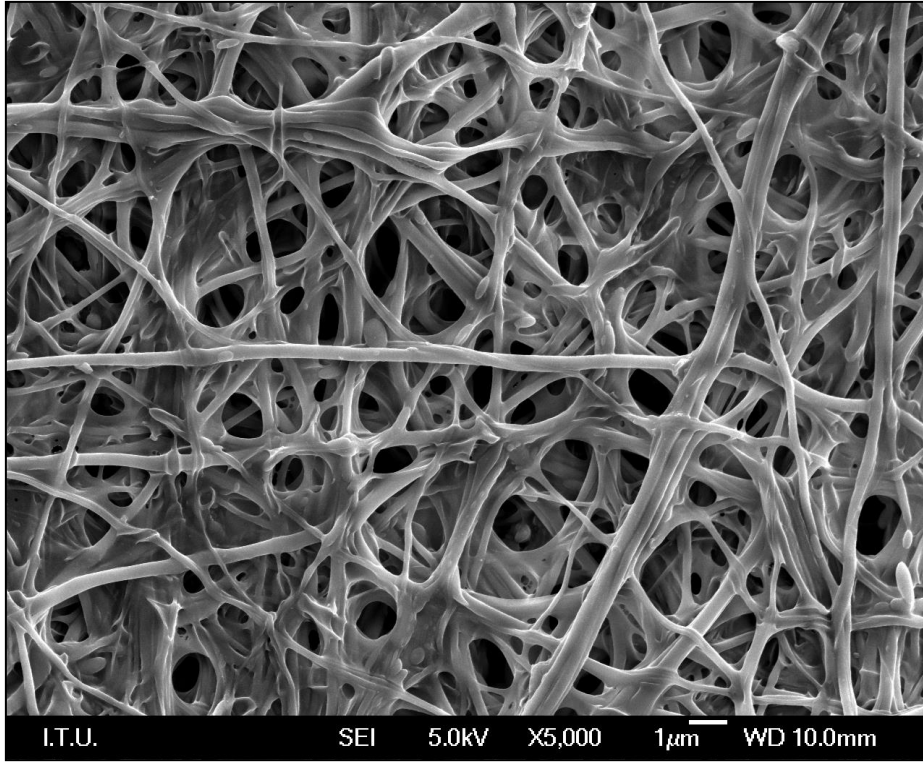
Şekil 22’de diğer Kollajen ve Keratin serisi nanofiber membranlara ait fotoğraflar verilmiştir.



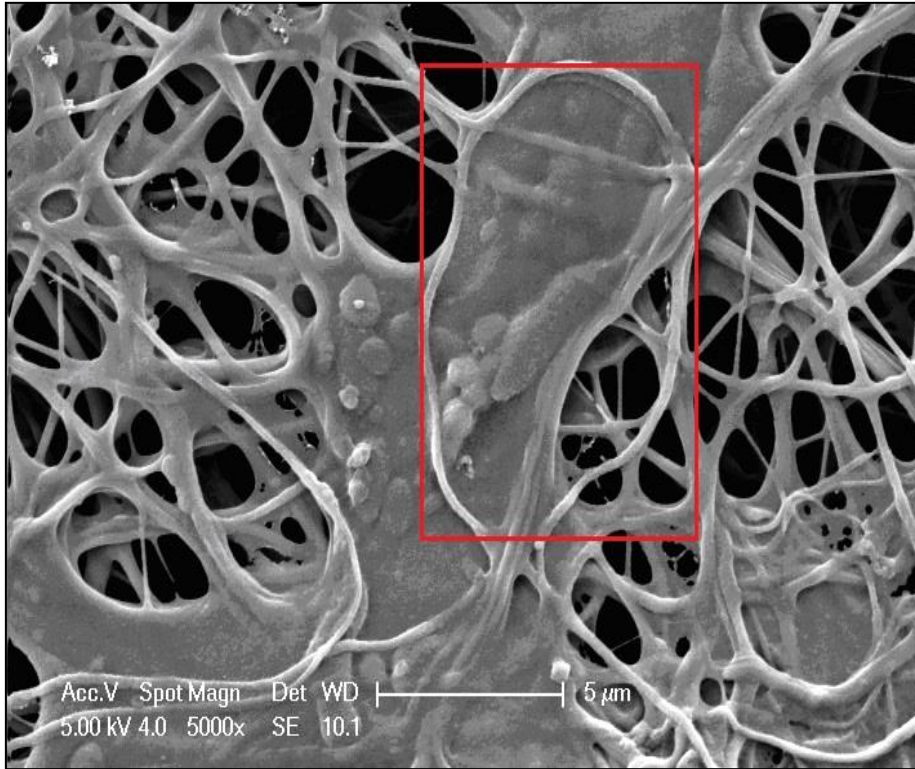
Şekil 3.22. F5- Kollajen -3T3 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000).



Şekil 3.23. F4- Kollajen -ECV 304 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000).

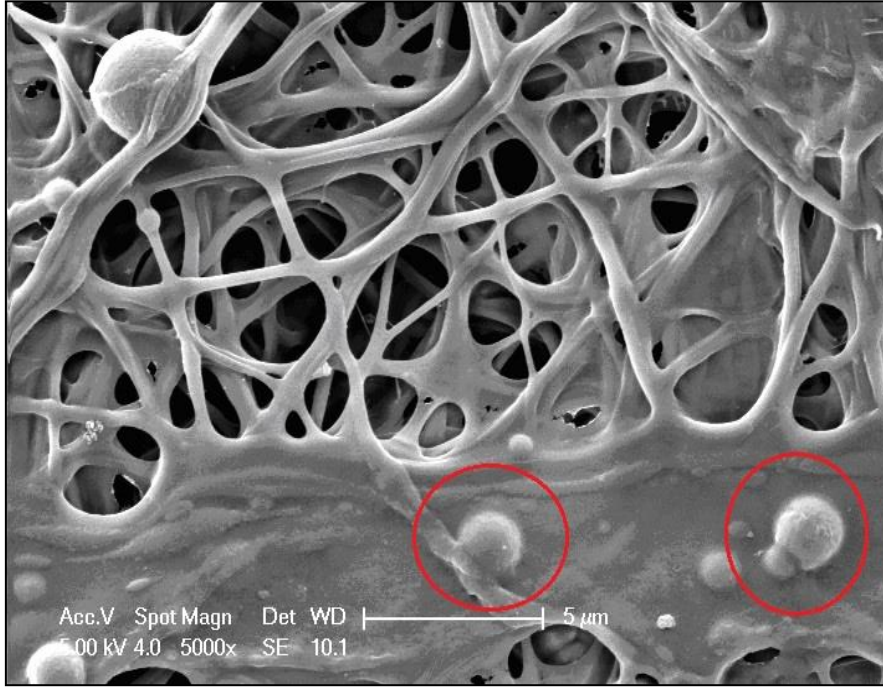


Şekil 3.24. F4- Kollajen -SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000).

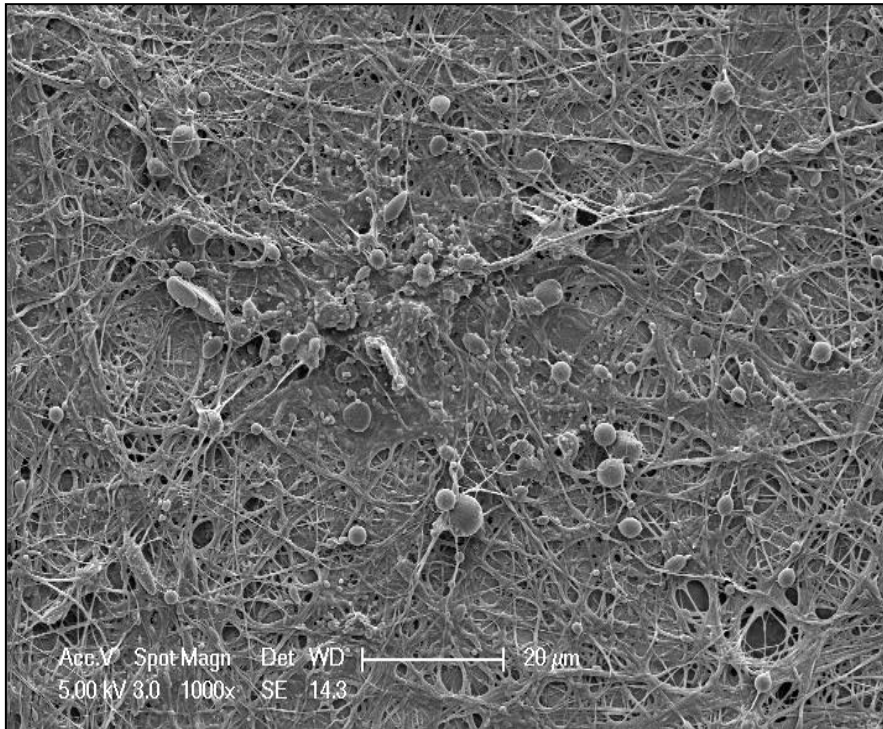


Şekil 3.25. F1- Keratin -SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000).

Şekil 3.26' da nanofiber membran yapısındaki doku oluşumu ve ECV 304 hücreleri görülmektedir.



Şekil 3.26. F2- Keratin -ECV 304 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000).



Şekil 3.27. F3- Keratin -3T3 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X1.000).

3.2.6. Temas Açısı Ölçümleri

Elde edilen nanofiber membranların temas açısı ölçümleri su kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Temas açıları ölçümlerinde membran yüzeyleri ölçüm alınamayacak kadar hidrofilik olarak bulunmuştur. Şekil 3.28’de F0- Kollajen formülasyonunun temas açısı görüntüsü görülmektedir. EK 4- Şekil 1 – EK 4-Şekil 6’da temas açısına ait fotoğraflar görülmektedir.

Kollajen serisi nanofiber membranlara ait temas açısı değerleri Tablo 3.3’te ve keratin serisi nanofiber membranlara ait temas açısı değerleri Tablo 3.4’te verilmiştir. Hidroksiapatit mükemmel yapışma özelliği ile bilinen ve aynı zamanda farklı hücre tiplerinin ve bakterilerin yapışması için uygun bir ortama sahip olan bir yapıya sahiptir. Bu özelliği düşük enerji elektron yayımının, yüzey potansiyelini arttırması ile açıklanmaktadır [106, 170-172]. Hidroksiapatitin, PVA ve diğer bileşenlerin hidrofillik özelliğinden dolayı elde edilen nanofiber membranların yüzeyi hidrofilik olmakta ve net şekilde ölçüm alınamamaktadır. Hidrofil yapı hücre ortamı için elverişli bir ortam sağlamıştır. Literatürde de ifade edildiği gibi yüzeyin hidrofilik olmasının sebepleri arasında, malzemenin yüzey kompozisyonu ve inorganik iyonların varlığı da sayılabilir [171].



Şekil 3.28. F0 formülasyonuna ait temas açısı fotoğrafı.

Tablo 3.3. Kollajen serisinde ölçüm alınabilen nanofiber membranların temas açısı değerleri.

Formülasyon	Temas Açısı Sol (°)	Temas Açısı Sağ (°)	Ortalama (°)
F0	17	18	17

Tablo 3.4. Keratin serisi ölçüm alınabilen nanofiber membranların temas açısı değerleri.

Formülasyon	Temas Açısı Sol (°)	Temas Açısı Sağ (°)	Ortalama (°)
F0	12	12	12
F2	6	7	6

4. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, UV ışınları ile eşzamanlı olarak çapraz bağlanmış nanofiber yapıları hibrit doku iskeleleri hazırlanmıştır. 4- Vinil benzen boronik asit ile modifiye edilen Hidroksiapatit, poli(vinilalkol) eşliğinde UV kullanarak elektrospinning işlemine tabi tutuldu ve çapraz bağlanmış hibrit nanofiber doku iskelesi meydana getirilmiştir. Bu çalışma ile polimer yapının esnekliği ve inorganik yapının mukavemeti birleştirilerek biyo uyumlu yeni bir hibrit nanofiber kompozit malzeme hazırlanmıştır.

Bu çalışmada; hidroksiapatit mevcut çalışmalara göre sentezlenmiş ve sonrasında yapılan çalışmalardan farklı olarak 4- Vinil benzen boronik asit ile modifiye edilerek akrilat fonksiyoneliitesi kazandırılmıştır. Söz konusu modifikasyon, 4-VBBA-HA'nin sistem içerisinde homojen dağılması ve polimer yapının literatürde ifade edildiği üzere biyo uyumlu ve aynı zamanda biyobozunur olmasını sağlamıştır. Elektrospinning kompozisyonunda poli(vinilalkol), hidrolize TEOS ve MEMO kullanılmıştır. Fotobaşlatıcı olarak Darocur 1173 eklenmiş ve eş zamanlı olarak UV ışını kullanarak elektrospinning işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nanofiberlere kollajen, püskürtme yöntemi ile ilave edildikten sonra hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Püskürtme yöntemi, UV ve elektrospinning işlemleri esnasında kollajenin uğrayabileceği degradasyonu önlemek için tercih edilmiştir. Nanofiberlerin hücre kültürü uygulamaları İstanbul Üniversitesi Fizyoloji Bölümünde gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü uygulamaları için ECV 304, SAOS ve 3T3 adlı üç farklı tipte hücre seçilmiş ve nanofiber membranlar üzerine ekimi yapılarak MTT testi ile canlılıkları test edilmiştir. Hücre ekimi ve sonrası nanofiber membranların yüzey morfolojisi ve hücre büyümleri SEM ile incelenmiştir. Çalışmanın ikinci aşaması için, elektrospinning çözeltisinin içerisine kollajen yerine, insan saçı kaynaklı keratin eklenmiş ve bu şekilde elektrospinning işlemi uygulanmıştır. Elde edilen nanofiberlere yine üç farklı hücre ekilmiş ve canlılıkları MTT testi ile incelenmiştir. Nanofiberlerdeki hücre çoğalmaları ve fiber yapısı SEM ile incelenmiştir.

Tez çalışması kapsamında, elde edilen malzemelerin ve nanofiberlerin yapı analizleri FT-IR ile analiz edilmiştir. Sentezlenen HA ve 4-VBBA-HA'nin termal dayanımları, termal gravimetrik analiz (TGA) yöntemiyle incelenmiştir. Hazırlanan nanofiberlerin

morfolojileri SEM ile incelenmiştir. Temas açısı ölçümleri ile nanofiberlerin yüzey karakterizasyonu yapılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda, elde edilen verilere göre çapraz bağlanmış 4-VBBA-HA / PVA hibrit nanofiber membranları başarı ile hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Eş zamanlı UV ışını kullanarak hücre ortamında çözünür olmayan 4-VBBA-HA / PVA hibrit nanofiberler elde edilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde F4 ve F5 formülasyonuna ait fiberler en iyi sonuçları vermiş ve bu sebeple hücre ekim çalışmaları için bu formülasyonlar seçilmiştir. Elde edilen fiberlerin çapları 400 nm' nin altındadır. Fiberler boncuksuz, gözeneksiz ve homojendirler. MTT çalışmaları yapıya katılan kollajenin hücre çoğalması için yardımcı olduğunu ve en etkili hücre büyümesinin **SAOS** hücre tipinde olduğunu göstermiştir. Nanofiberlerin SEM görüntüleri MTT testlerine ait sonuçlar ile örtüşmektedir ve fiber yapısı SAOS ve ECV 304 hücreleri için korunmuştur. Fiber yapısında gözeneklilik korunmuştur ancak hücre ortamındaki suyun emilimi sebebi ile fiber çapında kalınlaşma gözlenmiştir. Ekimi yapılan hücre tipleri fiber dokusuna, iç ve yüzey kısmına yayılmış ve çoğalmıştır ancak 3T3 hücrelerinde çoğalma SAOS ve ECV 304 hücrelerine göre daha az bulunmuştur.

İkinci aşamada keratin esaslı hibrit nanofiber membranlar elde edilmiştir. Elde edilen doku iskeleleri incelendiğinde fiber boyutunun 350 nm' nin altında olduğu belirlenmiştir. Fiber çapları kollajenli seriden daha az kalın elde edilmiştir. Elde edilen fiberler gözeneksiz, homojen ve boncuksuz yapıdadır. Benzer şekilde hücre kültürü uygulamaları için SAOS, ECV 304 ve 3T3 hücre tiplerinin ekimi yapılmış ve canlılıkları incelenmiştir. MTT sonuçları incelendiğinde en uygun hücre büyümesinin **ECV 304** hücre tipinde olduğu görülmüştür. Hücre ekimi sonrası incelenen yüzey morfolojisi ile hücrelerin fiber dokusu içerisinde çoğaldığı ve doku oluşumuna gittiği görülmüştür. Doku oluşumuna giden yapı kollajenli seriden daha iyi sonuç vermiştir ve 3T3 hücre tipinin kollajenli seriden daha fazla büyüme gösterdiği görülmektedir. Hücre ekim çalışmaları İstanbul Üniversitesi' nde 72 saat süre ile yapılmıştır. Nanofiber membran kompozisyonlarında doku oluşumu da bu süre içerisinde gözlemlenmiştir. İlerleyen dönemlerde yapılacak çalışmalarda, inkübasyon işlemi sürenin uzatılmasının doku oluşumuna etkisi incelenerek, bu noktadan itibaren hayvan deneylerine geçilmesine yönelik çalışmalar değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Eminoğlu, M.E. (2014) Çapraz Bağlı Tiyofen Esaslı Nanofiberlerin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 1-80.
- [2] Dzenis, Y. A. (2004) Spinning continuous fibers for nanotechnology Science, 304, 1917-1919.
- [3] Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. Composites science and technology, 63(15), 2223-2253.
- [4] Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W. E., Yong, T., Ma, Z., & Ramaseshan, R. (2006). Electrospun nanofibers: solving global issues. Materials today, 9(3), 40-50.
- [5] Beachley, V., & Wen, X. (2010). Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. Progress in polymer science, 35(7), 868-892.
- [6] Bayramoğlu, G.(2009) İzosiyanatoetilmetakrilat Modifiye,Biyoparçalanabilir, Enjekte Ebilebilir, UV Işınları ile Hazırlanan Biyopolimerlerin Sentezi ve Karakterizasyonu Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 1-133.
- [7] Liu, D. M., Troczynski, T., & Tseng, W. J. (2001). Water-based sol–gel synthesis of hydroxyapatite: process development. Biomaterials, 22(13), 1721-1730.
- [8] Chen, F., Wang, Z. C., & Lin, C. J. (2002). Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials. Materials Letters, 57(4), 858-861.
- [9] Saeed, K., Haider, S., Oh, T. J., & Park, S. Y. (2008). Preparation of amidoxime-modified polyacrylonitrile (PAN-oxime) nanofibers and their applications to metal ions adsorption. Journal of Membrane Science, 322(2), 400-405.
- [10] Yılmaz, E. (2012) 3- Boyutlu Kitosan Doku İskelelerinin Elektro- Eğirme Tekniği ile Üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye.1-129.
- [11] Lyons, J. M. (2004) Melt-electrospinning of Thermoplastic Polymers: An Experimental and Theoretical Analysis. Doctoral Dissertation, Drexel University, USA.
- [12] Zeytuncu, B. (2014) Elektrosinning Tekniği ve UV Işımasının Eşzamanlı Olarak Uygulanması ile Nanofiber Membranların Hazırlanması ve Kıymetli Metallerin

adsorpsiyonunda Uygulanması. Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye, 1-129.

- [13] Nguyen, L. T., Chen, S., Elumalai, N. K., Prabhakaran, M. P., Zong, Y., Vijila, C., Allakhverdiev, S.I., Ramakrishna, S. (2013). Biological, chemical, and electronic applications of nanofibers. *Macromolecular Materials and Engineering*, 298(8), 822-867.
- [14] Ravichandran, R., Sundarajan, S., Venugopal, J. R., Mukherjee, S., & Ramakrishna, S. (2012). Advances in polymeric systems for tissue engineering and biomedical applications. *Macromolecular Bioscience*, 12(3), 286-311.
- [15] Üstündağ, G.C. (2009) Elektrospinning Yöntemi ile Biyomedikal Kullanımına Yönelik Nanolif Yüzey Üretimi ve Uygulanması. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Türkiye, 1-181.
- [16] Nain, A. S., Amon, C., & Sitti, M. (2004, June). Three-dimensional Nanoscale Manipulation and Manufacturing Using Proximal Probes: Controlled Pulling of Polymer Micro/nanofibers. In *Mechatronics, 2004. ICM'04. Proceedings of the IEEE International Conference on* (pp. 224-230). IEEE.
- [17] Nain, A. S., Wong, J. C., Amon, C., & Sitti, M. (2006). Drawing suspended polymer micro-/nanofibers using glass micropipettes. *Applied Physics Letters*, 89(18), 183105.
- [18] Daşdemir, M. (2006) Elektrospinning of Thermoplastic Polyurethane for Producing Nanofibers. MSc, Thesis, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep, Türkiye. 1-107.
- [19] Çakmakçı, E. (2009) Elektrospinning Yöntemi ile Yeni Polimerik Malzemelerin Sentezi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 1-114.
- [20] Göktaş, A. (2008) Electrospinning of polystyrene/butyl rubber blends: a parametric study. Bitirme Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği, Ankara, Türkiye.
- [21] Porter, J. R., Henson, A., & Popat, K. C. (2009). Biodegradable poly (ϵ -caprolactone) nanowires for bone tissue engineering applications. *Biomaterials*, 30(5), 780-788.
- [22] Grimm, S., Giesa, R., Sklarek, K., Langner, A., Gösele, U., Schmidt, H. W., & Steinhart, M. (2008). Nondestructive replication of self-ordered nanoporous alumina membranes via cross-linked polyacrylate nanofiber arrays. *Nano letters*, 8(7), 1954-1959.
- [23] Matson, J. B., Zha, R. H., & Stupp, S. I. (2011). Peptide self-assembly for crafting functional biological materials. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 15(6), 225-235.

- [24] Kikutani, T., Radhakrishnan, J., Arikawa, S., Takaku, A., Okui, N., Jin, X., Niwa, F., Kudo, Y. (1996). High-speed melt spinning of bicomponent fibers: Mechanism of fiber structure development in poly (ethylene terephthalate)/polypropylene system. *Journal of applied polymer science*, 62(11), 1913-1924.
- [25] <http://www.engr.utk.edu/mse/pages/Textiles/Bicomponent%20fibers.htm> 07 Mart 2014.
- [26] Lewin M., Sello S. B. (1985) *Handbook of Fiber Science and Technology*, İkinci Baskı, New York.
- [27] Kozanoğlu, S.G. (2006) *Elektrospinning Yöntemi İle Nanolif Üretim Teknolojisi*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 1-148.
- [28] Ratner, B. D. Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. (2004). *Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine*. Academic press.
- [29] Bhardwaj, N., Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3), 325-347.
- [30] Kataphinan, W. (2004) *Electrospinning and potential applicationd*, PhD. Thesis, The Graduate Faculty of University Akron.
- [31] Lam, H. L. (2004) *Electrospinning of single wall carbon nanotube reinforced aligned fibrils and yarns*, PhD. Thesis, The Graduate Faculty of Drexel University.
- [32] Baştürk, E. (2012) *Çapraz Bağlı PVA/B Nanofiberlerinin Elektrospin Yöntemi ile Hazırlanması ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 1-132.
- [33] Bose, G.M. (1745) *Recherches sur la causa et sur la veritable theorie del'electricite*. Wittenberg.
- [34] Raleigh, X.L. *Dublin Philosophy Magazine*, 1884, London, Edinburgh.
- [35] <http://www.google.com/patents/US692631> 07 Mart 2014.
- [36] Zeleny, J. (1884) *The Electrical Discharge from Liquid Points, and A Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at their Surfaces*. *Physical Review*, 3, 69-91.
- [37] Formhals, A. (1934) *Process And Apparatus For Preparing Artificial Threads*. US Patent, 1975 504, Oct 2.
- [38] Gladding K.E. (1939) *Apparatus For The Production Of Filaments, Threads, And The Like*. US Patent 2 168 027, Aug 1.

- [39] Taylor, G. (1964) Disintegration of water drops in an electric field. In Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences The Royal Society 280 (1382), 383-397.
- [40] Taylor, G. (1965) The Force Exerted By An Electric Field On A Long Cylindrical Conductor. Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical & Engineering Sciences, 291, 145-158.
- [41] Taylor, G. (1969) Electrically Driven Jets. Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical & Engineering Sciences, 313 , 453-475.
- [42] Hayati, I., Bailey, A. I., & Tadros, T. F. (1987). Investigations into the mechanisms of electrohydrodynamic spraying of liquids: I. Effect of electric field and the environment on pendant drops and factors affecting the formation of stable jets and atomization. Journal of Colloid and Interface Science, 117(1), 205-221.
- [43] Reneker, D. H., Chun, I. (1996). Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. Nanotechnology, 7(3), 216.
- [44] Reneker, D. H., Yarin, A. L. (2008). Electrospinning jets and polymer nanofibers. Polymer, 49(10), 2387-2425.
- [45] Reneker, D. H., Yarin, A. L., Fong, H., & Koombhongse, S. (2000). Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. Journal of Applied physics, 87(9), 4531-4547.
- [46] Doğan, E. N. (2013) Elektrosprinning Metodu ile Magnezyum Borat Nano Kompozit Eldesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Erzurum, Türkiye, 1-75.
- [47] Yarin, A. L., Koombhongse, S., & Reneker, D. H. (2001). Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers. Journal of Applied Physics, 90(9), 4836-4846.
- [48] Sun, D., Chang, C., Li, S., & Lin, L. (2006). Near-field electrospinning. Nano letters, 6(4), 839-842.
- [49] Picciani, H.P., Medeiros, S.E., Orts, J.W., Mattoso, C.H.L. (2011) Advances In Electroactive Electrospun Nanofibers Nanofibers. Production, Properties and Functional Applications Edited by Tong Lin, InTech, Nov 14, 85-116.
- [50] Sill, T. J., & von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. Biomaterials, 29(13), 1989-2006.
- [51] Özkoç, G. Doku mühendisliği ve doku mühendisliği uygulamalarında biyomalzemeler, yapı iskeleleri ve biyoreaktörler. 2014, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli, Türkiye

- [52] Acar, G. Ö. (2007) Doku Mühendisliği ve Hücre Kültürü Kaynaklı Yeni Tedavi Seçenekleri” Cerrahpaşla Tıp Dergisi, 38, 32 – 39.
- [53] Agarwal, S., Wendorff, J. H., & Greiner, A. (2008). Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, 49(26), 5603-5621.
- [54] Langer, R., Vacanti, J. P. (1993) Tissue engineering. *Science*, 260; 920- 926.
- [55] Nakahara, T., Nakamura, T., Kobayashi, E., Kuremoto, K. I., Matsuno, T., Tabata, Y., Eto, K., Shimizu, Y. (2004). In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells. *Tissue engineering*, 10(3-4), 537-544.
- [56] Salgado, A. J., Coutinho, O. P., Reis, R. L. (2004). Novel starch-based scaffolds for bone tissue engineering: cytotoxicity, cell culture, and protein expression. *Tissue engineering*, 10(3-4), 465-474.
- [57] Riminucci, M., & Bianco, P. (2003). Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. *Brazilian journal of medical and biological research*, 36(8), 1027-1036.
- [58] Sittering, M., Hutmacher, D. W., & Risbud, M. V. (2004). Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Current opinion in biotechnology*, 15(5), 411-418.
- [59] Hollister, S. J. (2005). Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials*, 4(7), 518-524.
- [60] Woodfield, T. B., Malda, J., De Wijn, J., Peters, F., Riesle, J., & van Blitterswijk, C. A. (2004). Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique. *Biomaterials*, 25(18), 4149-4161.
- [61] Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21(24), 2529-2543.
- [62] Li, Y., Yang, C., Khan, M., Liu, S., Hedrick, J. L., Yang, Y. Y., & Ee, P. L. R. (2012). Nanostructured PEG-based hydrogels with tunable physical properties for gene delivery to human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 33(27), 6533-6541.
- [63] Tutkun, L. (2010) Biyobozunur Kompozit Doku İskeleleri: Polimerik Fiber / Malzeme Destekli Kriojeller. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 1-135.
- [64] Manjubala, I., Scheler, S., Bössert, J., & Jandt, K. D. (2006). Mineralisation of chitosan scaffolds with nano-apatite formation by double diffusion technique. *Acta Biomaterialia*, 2(1), 75-84.

- [65] Mikos, A.G., Sarakinos, G. Lyman, M.D., Ingber, D.E., Vacanti, J.P., Langer, R. (1993) Prevascularization of porous biodegradable polymers. *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 716-723.
- [66] Karageorgiou, V., Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474-5491.
- [67] Fong, P., Shin'oka, T., Lopez-Soler, R. I., & Breuer, C. (2006). The use of polymer based scaffolds in tissue-engineered heart valves. *Progress in Pediatric cardiology*, 21(2), 193-199.
- [68] Thomas, D.W. (2003) *Advanced Biomaterials for Medical Applications*, 180, Second Edition, Nato Science Series.
- [69] Adams, C. S., Mansfield, K., Perlot, R. L., & Shapiro, I. M. (2001). Matrix Regulation of Skeletal Cell Apoptosis Role of calcium and phosphate ions. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20316-20322.
- [70] Mavis, B., Demirtaş, T. T., Gümüşderelioğlu, M., Gündüz, G., & Çolak, Ü. (2009). Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate. *Acta biomaterialia*, 5(8), 3098-3111.
- [71] Reed, C. R., Han, L., Andradý, A., Caballero, M., Jack, M. C., Collins, J. B., Saba, S.C., Lobo, E.G., Cairns, B.A., van Aalst, J. A. (2009). Composite tissue engineering on polycaprolactone nanofiber scaffolds. *Annals of plastic surgery*, 62(5), 505-512.
- [72] Kang, S. W., La, W. G., & Kim, B. S. (2009). Open macroporous poly (lactic-co-glycolic Acid) microspheres as an injectable scaffold for cartilage tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(3), 399-409.
- [73] Krebs, M. D., Sutter, K. A., Lin, A. S., Guldberg, R. E., & Alsberg, E. (2009). Injectable poly (lactic-co-glycolic) acid scaffolds with in situ pore formation for tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 5(8), 2847-2859.
- [74] Briggs, T., Treiser, M. D., Holmes, P. F., Kohn, J., Moghe, P. V., & Arinzeh, T. L. (2009). Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on poly (ethylene glycol)-variant biomaterials. *Journal of biomedical materials research Part A*, 91(4), 975-984.
- [75] Lee, S. Y., Mohan, D. J., Kang, I. A., Doh, G. H., Lee, S., & Han, S. O. (2009). Nanocellulose reinforced PVA composite films: effects of acid treatment and filler loading. *Fibers and Polymers*, 10(1), 77-82.
- [76] Shin, J. W., Lee, Y. J., Heo, S. J., Park, S. A., Kim, S. H., Kim, Y. J., Kim, D.H., Shin, J. W. (2009). Manufacturing of multi-layered nanofibrous structures composed of polyurethane and poly (ethylene oxide) as potential blood vessel scaffolds. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(5-6), 757-771.

- [77] Sheridan, M. H., Shea, L. D., Peters, M. C., & Mooney, D. J. (2000). Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *Journal of Controlled Release*, 64(1), 91-102.
- [78] Banerjee, I., Mishra, D., & Maiti, T. K. (2009). PLGA microspheres incorporated gelatin scaffold: microspheres modulate scaffold properties. *International journal of biomaterials*, 2009.
- [79] Cho, C.S., Singh, A., Rakhmievich, A., Seroogy, C.M., Suresh, M., Sondel, P.M. (2008) The presence of tumor inhibits effector T cell expansion in response to de novo antigen. American Association for Cancer Research, San Diego, CA, February 2008.
- [80] Suh, J. K. F., & Matthew, H. W. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, 21(24), 2589-2598.
- [81] Song, Y., Ju, Y., Morita, Y., Song, G. (2013). Effect of the nanostructure of porous alumina on growth behavior of MG63 osteoblast-like cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 116(4), 509-515.
- [82] Zhang, Y., Sun, L., Jiang, J., Zhang, X., Ding, W., Gan, Z. (2010). Biodegradation-induced surface change of polymer microspheres and its influence on cell growth. *Polymer Degradation and Stability*, 95(8), 1356-1364.
- [83] Mikos, A. G., Lyman, M. D., Freed, L. E., & Langer, R. (1994). Wetting of poly (L-lactic acid) and poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials*, 15(1), 55-58.
- [84] Yang, S., Leong, K. F., Du, Z., Chua, C. K. (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue engineering*, 7(6), 679-689.
- [85] Gomes, M. E., Godinho, J. S., Tchalamov, D., Cunha, A. M., Reis, R. L. (2002). Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties. *Materials Science and Engineering: C*, 20(1), 19-26.
- [86] Holy, C. E., Shoichet, M. S., Davies, J. E. (2000). Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period. *Journal of biomedical materials research*, 51(3), 376-382.
- [87] Karp, J. M., Dalton, P. D., Shoichet, M. S. (2003). Scaffolds for tissue engineering. *MRS bulletin*, 28(04), 301-306.
- [88] Thomson, R. C., Shung, A. K., Yaszemski, M., & Mikos, A. G. (2000). Polymer scaffold processing. *Principles of tissue engineering*, 2, 251-262.

- [89] Liu, D. M. (1996). Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite granules. *Biomaterials*, 17(20), 1955-1957.
- [90] Mooney, D. J., Baldwin, D. F., Suh, N. P., Vacanti, J. P., Langer, R. (1996). Novel approach to fabricate porous sponges of poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials*, 17(14), 1417-1422.
- [91] Shea, L. D., Wang, D., Franceschi, R. T., & Mooney, D. J. (2000). Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three-dimensional scaffolds. *Tissue engineering*, 6(6), 605-617.
- [92] Mao, J. S., Zhao, L. G., Yin, Y. J., De Yao, K. (2003). Structure and properties of bilayer chitosan–gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 24(6), 1067-1074.
- [93] Mikos, A. G., Bao, Y., Cima, L. G., Ingber, D. E., Vacanti, J. P., Langer, R. (1993). Preparation of poly (glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *Journal of biomedical materials research*, 27(2), 183-189.
- [94] Kim, J. K., Mai, Y. W. (1998). Engineered interfaces in fiber reinforced composites. Elsevier.
- [95] Leong, K. F., Cheah, C. M., & Chua, C. K. (2003). Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*, 24(13), 2363-2378.
- [96] Sun, B., Long, Y. Z., Zhang, H. D., Li, M. M., Duvail, J. L., Jiang, X. Y., Yin, H. L. (2014). Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Progress in Polymer Science*, 39(5), 862-890.
- [97] Zhang, Y. Z., Venugopal, J., Huang, Z. M., Lim, C. T., Ramakrishna, S. (2006). Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer*, 47(8), 2911-2917.
- [98] Xu, C., Yang, F., Wang, S., & Ramakrishna, S. (2004). In vitro study of human vascular endothelial cell function on materials with various surface roughness. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 71(1), 154-161.
- [99] Bini, T. B., Gao, S., Wang, S., & Ramakrishna, S. (2006). Poly (l-lactide-co-glycolide) biodegradable microfibers and electrospun nanofibers for nerve tissue engineering: an in vitro study. *Journal of materials science*, 41(19), 6453-6459.
- [100] Riboldi, S. A., Sampaolesi, M., Neuenschwander, P., Cossu, G., Mantero, S. (2005). Electrospun degradable polyesterurethane membranes: potential scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Biomaterials*, 26(22), 4606-4615.
- [101] Ji, W., Sun, Y., Yang, F., van den Beucken, J. J., Fan, M., Chen, Z., & Jansen, J. A. (2011). Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. *Pharmaceutical research*, 28(6), 1259-1272.

- [102] Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M. H., Ramakrishna, S. (2008). Electrospun poly (ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials*, 29(34), 4532-4539.
- [103] Schofer, M. D., Veltum, A., Theisen, C., Chen, F., Agarwal, S., Fuchs-Winkelmann, S., Paletta, J. R. (2011). Functionalisation of PLLA nanofiber scaffolds using a possible cooperative effect between collagen type I and BMP-2: impact on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22(7), 1753-1762.
- [104] Başargan, T. (2010) Püskürtmeli Kurutucuda Hidroksiapatit- Polimer Malzemelerin Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 1-137.
- [105] Özmen, M. (2012) Hidroksiapatit Zirkonya Kompozitlerinin Üretim ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 1-91.
- [106] Neuendorf, R. E., Saiz, E., Tomsia, A. P., Ritchie, R. O. (2008). Adhesion between biodegradable polymers and hydroxyapatite: Relevance to synthetic bone-like materials and tissue engineering scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 4(5), 1288-1296.
- [107] Rakovsky, A., Gutmanas, E. Y., & Gotman, I. (2010). Ca-deficient hydroxyapatite/polylactide nanocomposites with chemically modified interfaces by high pressure consolidation at room temperature. *Journal of materials science*, 45(23), 6339-6344.
- [108] Barakat, N. A., Khalil, K. A., Sheikh, F. A., Omran, A. M., Gaihre, B., Khil, S. M., Kim, H. Y. (2008). Physiochemical characterizations of hydroxyapatite extracted from bovine bones by three different methods: Extraction of biologically desirable HAp. *Materials Science and Engineering: C*, 28(8), 1381-1387.
- [109] Geesink, R. G., Hoefnagels, N. H. (1995). Six-year results of hydroxyapatite-coated total hip replacement. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 77(4), 534-547.
- [110] Jansen, J. A., Van De Waerden, J. P. C. M., Wolke, J. G. C., De Groot, K. (1991). Histologic evaluation of the osseous adaptation to titanium and hydroxyapatite-coated titanium implants. *Journal of biomedical materials research*, 25(8), 973-989.
- [111] Stephenson, P. K., Freeman, M. A. R., Revell, P. A., Germain, J., Tuke, M., & Pirie, C. J. (1991). The effect of hydroxyapatite coating on ingrowth of bone into cavities in an implant. *The journal of arthroplasty*, 6(1), 51-58.
- [112] Bauer, T. W., Geesink, R. C., Zimmerman, R., McMahon, J. T. (1991). Hydroxyapatite-coated femoral stems. Histological analysis of components retrieved at autopsy. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 73(10), 1439-1452.

- [113] Rodriguez, R., Estevez, M., Vargas, S., Gonzalez, M., Salazar, R., Pacheco, F. (2009). Synthesis and characterization of HAp-based porous materials. *Materials Letters*, 63(17), 1558-1561.
- [114] Yang, C. C., Lin, C. T., Chiu, S. J. (2008). Preparation of the PVA/HAP composite polymer membrane for alkaline DMFC application. *Desalination*, 233(1), 137-146.
- [115] Cao, T., Tang, W., Zhao, J., Qin, L., Lan, C. (2014). A Novel Drug Delivery Carrier Based on α -eleostearic Acid Grafted Hydroxyapatite Composite. *Journal of Bionic Engineering*, 11(1), 125-133.
- [116] Zhou, H., Lee, J. (2011). Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 7(7), 2769-2781.
- [117] Amer, W., Abdelouahdi, K., Ramanananarivo, H. R., Zahouily, M., Fihri, A., Coppel, Y., Varma, R.S. (2013). Synthesis of mesoporous nano-hydroxyapatite by using zwitterions surfactant. *Materials Letters*, 107, 189-193.
- [118] Bajpai, P., Margaritis, A. (1985). Improvement of inulinase stability of calcium alginate immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells by treatment with hardening agents. *Enzyme and microbial technology*, 7(1), 34-36.
- [119] Capello, W. N., D'ANTONIO, J. A., Feinberg, J. R., Manley, M. T. (1997). Hydroxyapatite-Coated Total Hip Femoral Components in Patients Less Than Fifty Years Old. Clinical and Radiographic Results after Five to Eight Years of Follow-up*. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 79(7), 1023-9.
- [120] Boccaccini, A. R., Ma, P. X. (2014). *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers*. Elsevier.
- [121] Hayek, E., Newesely, H., Rumpel, M. L. (2007). Pentacalcium monohydroxyorthophosphate. *Inorganic Syntheses*, Volume 7, 63-65.
- [122] Tas, A. C. (2000). Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37 C in synthetic body fluids. *Biomaterials*, 21(14), 1429-1438.
- [123] Weng, J., Liu, Q., Wolke, J. G., Zhang, D., De Groot, K. (1997). The role of amorphous phase in nucleating bone-like apatite on plasma-sprayed hydroxyapatite coatings in simulated body fluid. *Journal of materials science letters*, 16(4), 335-337.
- [124] Santos, M. H., Oliveira, M. D., Souza, L. P. D. F., Mansur, H. S., Vasconcelos, W. L. (2004). Synthesis control and characterization of hydroxyapatite prepared by wet precipitation process. *Materials Research*, 7(4), 625-630.
- [125] Aizawa, M., Ueno, H., Itatani, K., Okada, I. (2006). Syntheses of calcium-deficient apatite fibres by a homogeneous precipitation method and their characterizations. *Journal of the European Ceramic Society*, 26(4), 501-507.

- [126] Panda, R. N., Hsieh, M. F., Chung, R. J., Chin, T. S. (2003). FTIR, XRD, SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nanoparticles synthesized by hydroxide-gel technique. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 64(2), 193-199.
- [127] Park, E., Condrate, R. A., Lee, D. (1998). Infrared spectral investigation of plasma spray coated hydroxyapatite. *Materials Letters*, 36(1), 38-43.
- [128] Kannan, S., Rocha, J. H. G., Agathopoulos, S., Ferreira, J. M. F. (2007). Fluorine-substituted hydroxyapatite scaffolds hydrothermally grown from aragonitic cuttlefish bones. *Acta biomaterialia*, 3(2), 243-249.
- [129] Itatani, K., Iwafune, K., Howell, F. S., Aizawa, M. (2000). Preparation of various calcium-phosphate powders by ultrasonic spray freeze-drying technique. *Materials research bulletin*, 35(4), 575-585.
- [130] Wei, G., Ma, P. X. (2004). Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 25(19), 4749-4757.
- [131] Poinern, G. E., Brundavanam, R. K., Mondinos, N., Jiang, Z. T. (2009). Synthesis and characterisation of nanohydroxyapatite using an ultrasound assisted method. *Ultrasonics sonochemistry*, 16(4), 469-474.
- [132] Bakan, F., Laçin, O., Sarac, H. (2013). A novel low temperature sol-gel synthesis process for thermally stable nano crystalline hydroxyapatite. *Powder Technology*, 233, 295-302.
- [133] Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., Boccaccini, A. R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(18), 3413-3431.
- [134] Malafaya, P. B., Silva, G. A., Reis, R. L. (2007). Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced drug delivery reviews*, 59(4), 207-233.
- [135] Liu, Y., Li, J., Fan, J., Wang, M. (2014). Preparation and Characterization of Electrospun Human Hair Keratin/Poly (ethylene oxide) Composite Nanofibers. *Revista Materia*, 19(4), 383-389.
- [136] Choi, J., Panthi, G., Liu, Y., Kim, J., Chae, S. H., Lee, C., Park, M., Kim, H. Y. (2015). Keratin/poly (vinyl alcohol) blended nanofibers with high optical transmittance. *Polymer*, 58, 146-152.
- [137] Li, J., Li, Y., Li, L., Mak, A. F., Ko, F., Qin, L. (2009). Preparation and biodegradation of electrospun PLLA/keratin nonwoven fibrous membrane. *Polymer Degradation and Stability*, 94(10), 1800-1807.

- [138] Zeydanlı, S. (2013) Keratin Based Poly (Acrylonitrile-co-EthyleneGlycol) Synthesis and Characterization. M.Sc. Thesis, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye, 1-89.
- [139] Kemp, P. D. (2000). Tissue engineering and cell-populated collagen matrices. In *Extracellular Matrix Protocols* (pp. 287-293). Humana Press.
- [140] Asran, A. S., Henning, S., Michler, G. H. (2010). Polyvinyl alcohol–collagen–hydroxyapatite biocomposite nanofibrous scaffold: mimicking the key features of natural bone at the nanoscale level. *Polymer*, 51(4), 868-876.
- [141] Hoyer, M., Drechsel, N., Meyer, M., Meier, C., Hinüber, C., Breier, A., Hahner, J., Heinrich, G., Rentsch, C., Garbe, L.A., Ertel, W., Schulze-Tanzil, G., Lohan, A. (2014). Embroidered polymer–collagen hybrid scaffold variants for ligament tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 43, 290-299.
- [142] Hsu, F. Y., Hung, Y. S., Liou, H. M., Shen, C. H. (2010). Electrospun hyaluronate–collagen nanofibrous matrix and the effects of varying the concentration of hyaluronate on the characteristics of foreskin fibroblast cells. *Acta biomaterialia*, 6(6), 2140-2147.
- [143] Çam, S.T. (2011) Keratin İçeren Biyolojik örneklerin Değişik Tür ve Enerjilerdeki Radyasyon Maruziyetinde Dozimetre Olarak Kullanım Potansiyelinin Araştırılması. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 1-216.
- [144] Atasever, B. (2008) Beta Talesemi Majörlü Hastalarda Naturel Killer (NK) Aktivitesini Etkileyen Faktörlerin. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 1-130.
- [145] Şaşmaz, H.T. (2007) Üç- boyutlu Biyozunur / Biyobozunur Olmayan Polimerik Taşıyıcıların Biyosinyallerle Plazma Modifikasyonu ve Hücre Kültürü Uygulamaları. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 1-247.
- [146] Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1), 55-63.
- [147] Sailaja, G. S., Ramesh, P., Kumary, T. V., Varma, H. K. (2006). Human osteosarcoma cell adhesion behaviour on hydroxyapatite integrated chitosan–poly (acrylic acid) polyelectrolyte complex. *Acta biomaterialia*, 2(6), 651-657.
- [148] Luo, Q., Chen, Z., Hao, X., Zhu, Q., Zhou, Y. (2013). Preparation and properties of nanometer silk fibroin peptide/polyvinyl alcohol blend films for cell growth. *International journal of biological macromolecules*, 61, 135-141.
- [149] Bhat, S., Kumar, A. (2012). Cell proliferation on three-dimensional chitosan–agarose–gelatin cryogel scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of bioscience and bioengineering*, 114(6), 663-670.

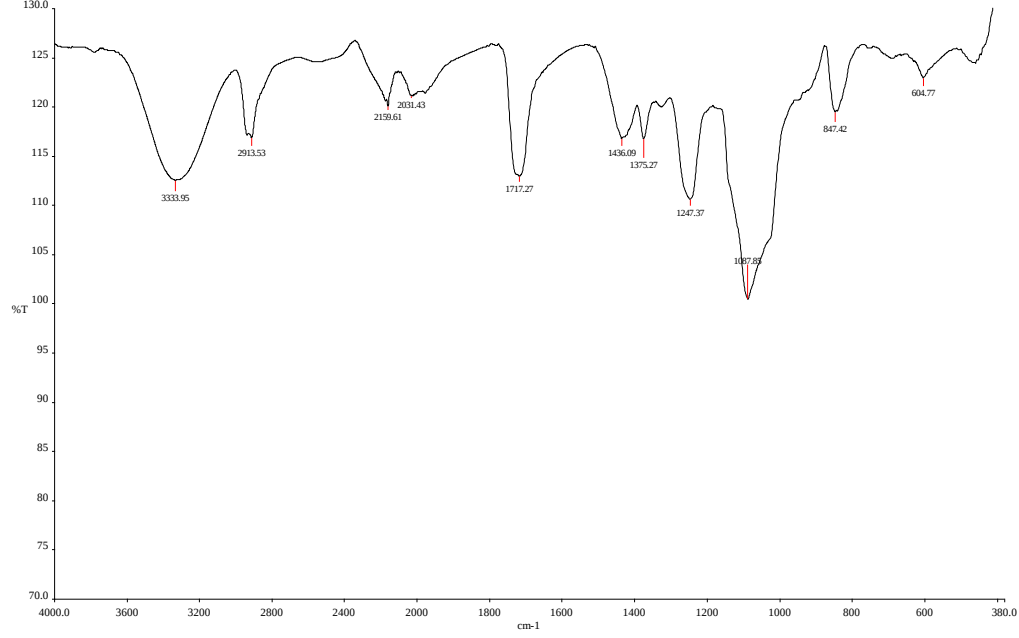
- [150] Hong, Z., Zhang, P., He, C., Qiu, X., Liu, A., Chen, L., Chen, X., Jing, X. (2005). Nano-composite of poly (L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials*, 26(32), 6296-6304.
- [151] Madhumathi, K., Shalumon, K. T., Rani, V. D., Tamura, H., Furuike, T., Selvamurugan, N., Nair, S.V., Jayakumar, R. (2009). Wet chemical synthesis of chitosan hydrogel–hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(1), 12-15.
- [152] Tomoaia, G., Soritau, O., Tomoaia-Cotisel, M., Pop, L. B., Pop, A., Mocanu, A., Horovitz, O., Bobos, L. D. (2013). Scaffolds made of nanostructured phosphates, collagen and chitosan for cell culture. *Powder Technology*, 238, 99-107.
- [153] Duan, B., Yuan, X., Zhu, Y., Zhang, Y., Li, X., Zhang, Y., Yao, K. (2006). A nanofibrous composite membrane of PLGA–chitosan/PVA prepared by electrospinning. *European Polymer Journal*, 42(9), 2013-2022.
- [154] Wang, M., Fang, D., Wang, N., Jiang, S., Nie, J., Yu, Q., Ma, G. (2014). Preparation of PVDF/PVP core–shell nanofibers mats via homogeneous electrospinning. *Polymer*, 55(9), 2188-2196.
- [155] Ito, Y., Hasuda, H., Kamitakahara, M., Ohtsuki, C., Tanihara, M., Kang, I. K., Kwon, O. H. (2005). A composite of hydroxyapatite with electrospun biodegradable nanofibers as a tissue engineering material. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(1), 43-49.
- [156] Liu, S., Zhao, J., Ruan, H., Wang, W., Wu, T., Cui, W., Fan, C. (2013). Antibacterial and anti-adhesion effects of the silver nanoparticles-loaded poly (l-lactide) fibrous membrane. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3), 1176-1182.
- [157] Gallego, D., Ferrell, N., Sun, Y., Hansford, D. J. (2008). Multilayer micromolding of degradable polymer tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 28(3), 353-358.
- [158] Choi, H. W., Lee, H. J., Kim, K. J., Kim, H. M., Lee, S. C. (2006). Surface modification of hydroxyapatite nanocrystals by grafting polymers containing phosphonic acid groups. *Journal of colloid and interface science*, 304(1), 277-281.
- [159] Phillips, M. J., Duncanson, P., Wilson, K., Darr, J. A., Griffiths, D. V., Rehman, I. (2005). Surface modification of bioceramics by grafting of tailored allyl phosphonic acid. *Advances in applied ceramics*, 104(5), 261-267.
- [160] Çakmakçı, E., Güngör, A., Kayaman-Apohan, N., Kuruca, S. E., Çetin, M. B., Dar, K. A. (2012). Cell growth on in situ photo-cross-linked electrospun acrylated cellulose acetate butyrate. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 23(7), 887-899.

- [161] Maheshwari, S. U., Samuel, V. K., Nagiah, N. (2014). Fabrication and evaluation of (PVA/HAp/PCL) bilayer composites as potential scaffolds for bone tissue regeneration application. *Ceramics International*, 40(6), 8469-8477.
- [162] Baştürk, E., Kahraman, M. V. (2012). Thermal and morphological properties of PVA/4-vinylbenzene boronic acid hybrid nanofibrous. *Polymer Composites*, 33(5), 829-837.
- [163] Skoog, D. A., West, D. M. (1980). *Principles of instrumental analysis* (5th Edition). Philadelphia: Saunders College Publishing.
- [164] Singh, V. K., Reddy, B. R. (2012). Synthesis and characterization of bioactive zirconia toughened alumina doped with HAp and fluoride compounds. *Ceramics International*, 38(7), 5333-5340.
- [165] Mostafa, N. Y. (2005). Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes. *Materials chemistry and physics*, 94(2), 333-341.
- [166] Pande, C. M. (1994). FT-Raman spectroscopy: applications in hair research. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 45(5), 257-268.
- [167] Lima, P. A. L., Resende, C. X., de Almeida Soares, G. D., Anselme, K., Almeida, L. E. (2013). Preparation, characterization and biological test of 3D-scaffolds based on chitosan, fibroin and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 33(6), 3389-3395.
- [168] Abdal-hay, A., Tijing, L. D., Lim, J. K. (2013). Characterization of the surface biocompatibility of an electrospun nylon 6/CaP nanofiber scaffold using osteoblasts. *Chemical Engineering Journal*, 215, 57-64.
- [169] Akdemir, Z. S., Akçakaya, H., Kahraman, M. V., Ceyhan, T., Kayaman-Apohan, N., Güngör, A. (2008). Photopolymerized Injectable RGD-Modified Fumarated Poly (ethylene glycol) Diglycidyl Ether Hydrogels for Cell Growth. *Macromolecular bioscience*, 8(9), 852-862.
- [170] Aronov, D., Rosenman, G., Karlov, A., Shashkin, A. (2006). Wettability patterning of hydroxyapatite nanobioceramics induced by surface potential modification. *Applied physics letters*, 88(16), 163902.
- [171] Mene, R. U., Mahabole, M. P., Sharma, R., Khairnar, R. S. (2011). Enhancement in CO gas sensing properties of hydroxyapatite thick films: Effect of swift heavy ion irradiation. *vacuum*, 86(1), 66-71.
- [172] Pirzada, T., Arvidson, S. A., Saquing, C. D., Shah, S. S., Khan, S. A. (2012). Hybrid silica-PVA nanofibers via sol-gel electrospinning. *Langmuir*, 28(13), 5834-5844.

EKLER

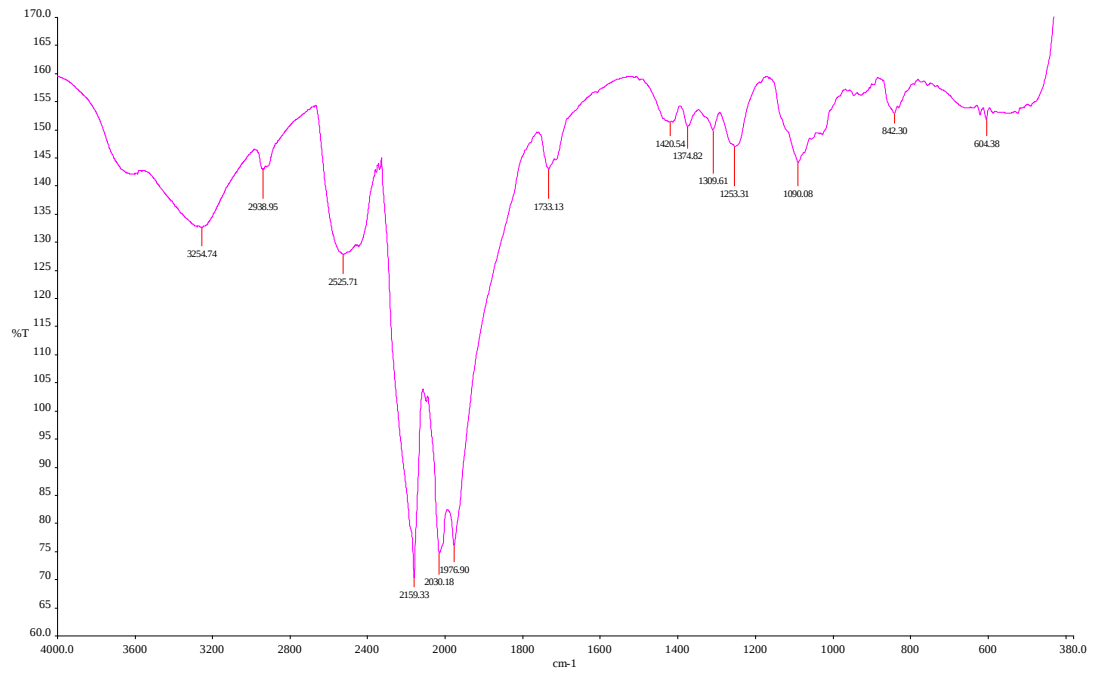
Ek 1- Şekil 1

F0- Kollajen formülasyonuna ait FT-IR spektrumu



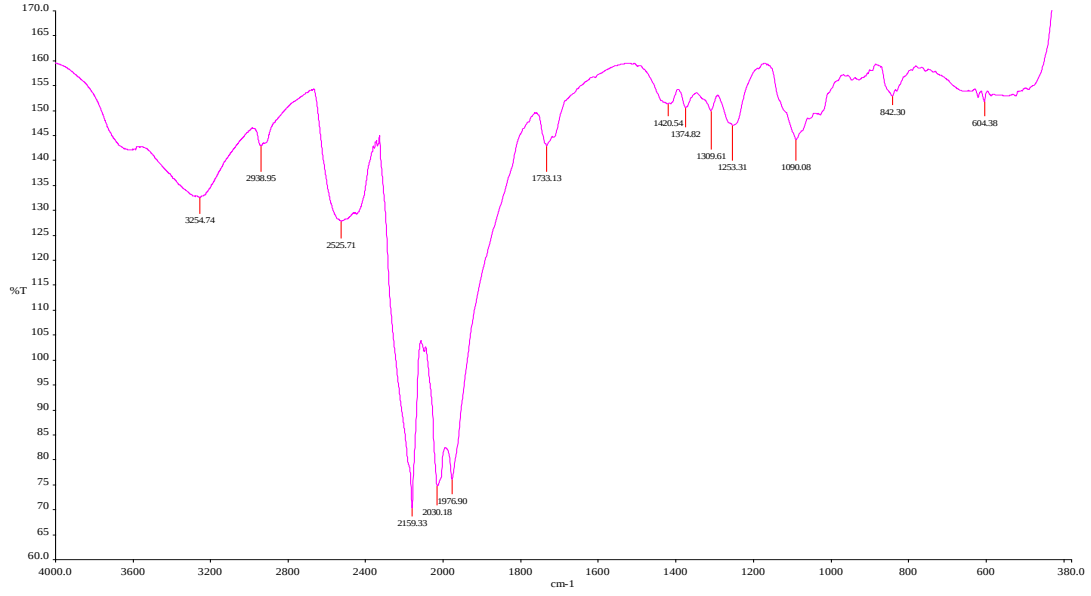
Ek 1- Şekil 2

F1- Kollajen formülasyonuna ait FT-IR spektrumu



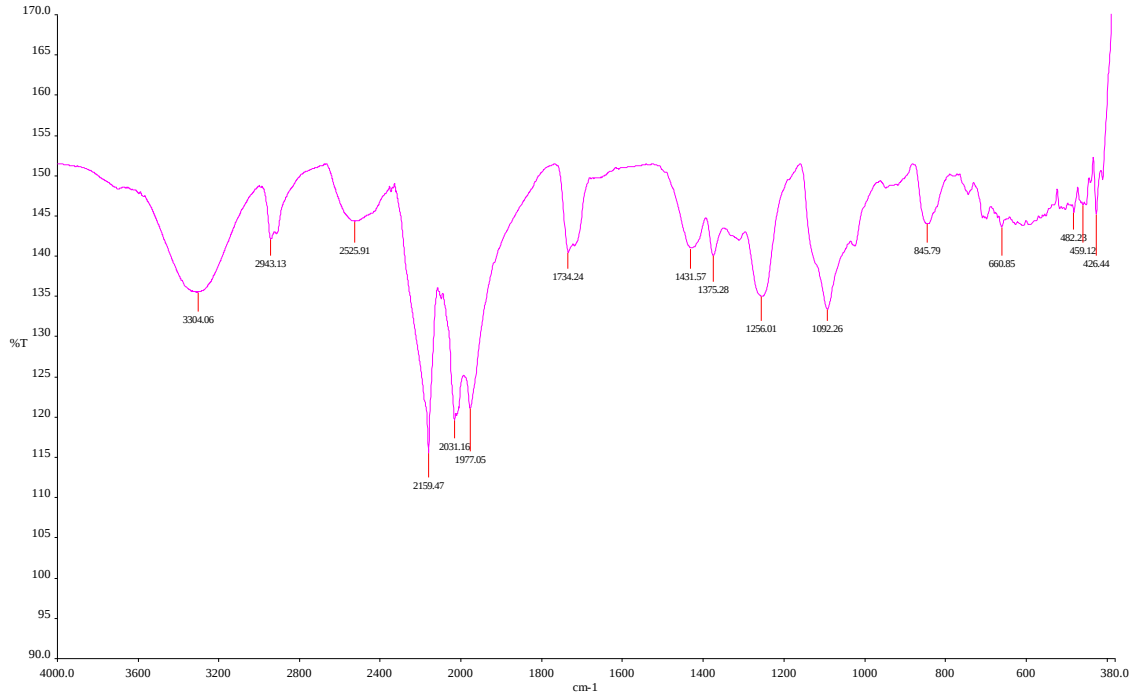
Ek 1- Şekil 3

F2- Kollajen formülasyonuna ait FT-IR spektrumu



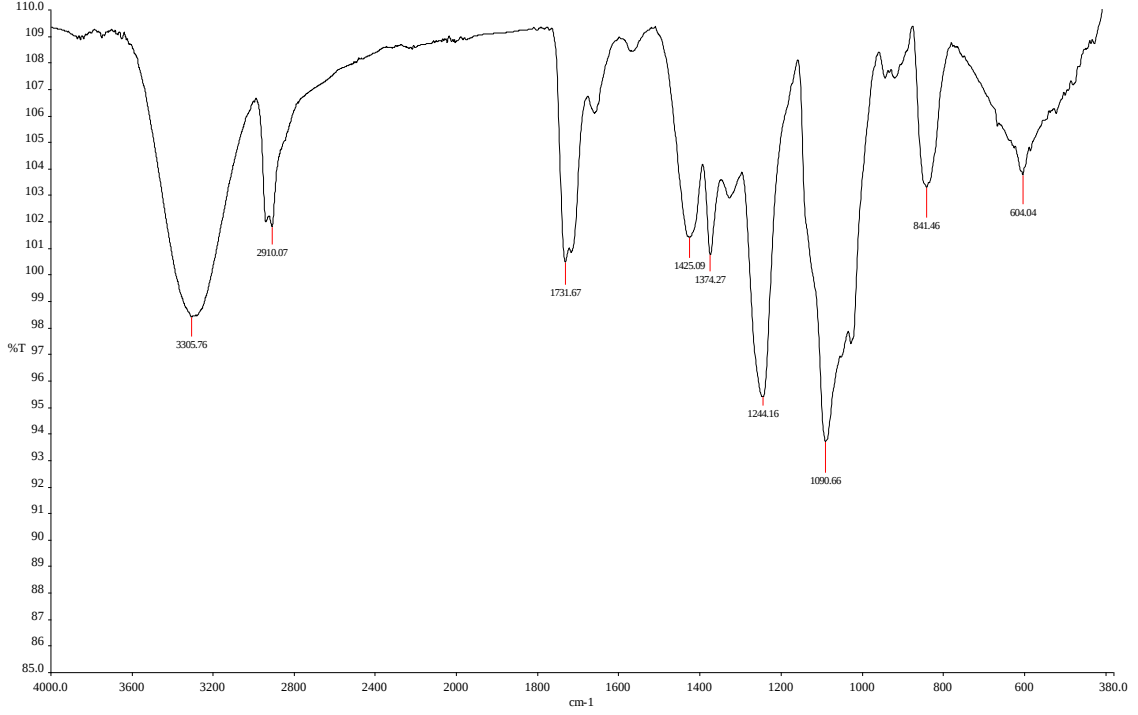
Ek 1- Şekil 4

F3- Kollajen formülasyonuna ait FT-IR spektrumu



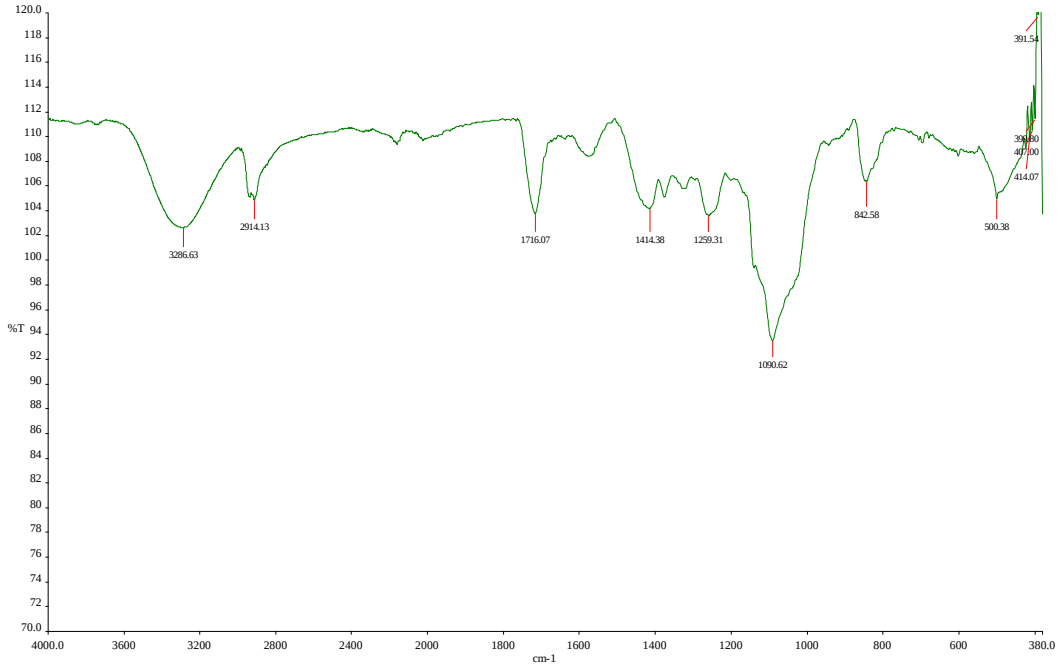
Ek 1- Şekil 5

F5- Kollajen formülasyonuna ait FT-IR spektrumu



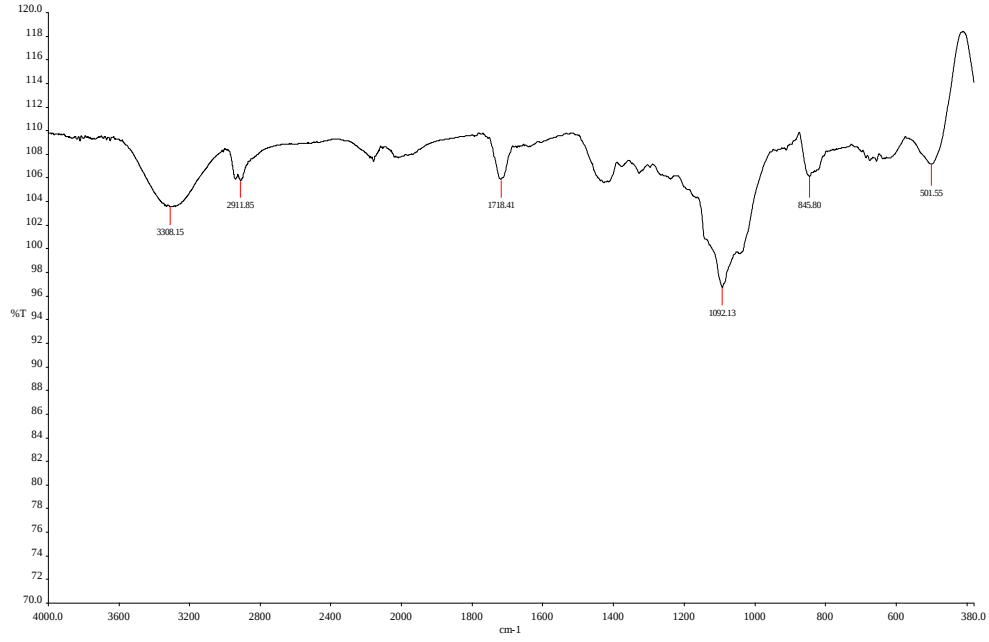
Ek 1- Şekil 6

F0- Keratin formülasyonuna ait FT-IR spektrumu



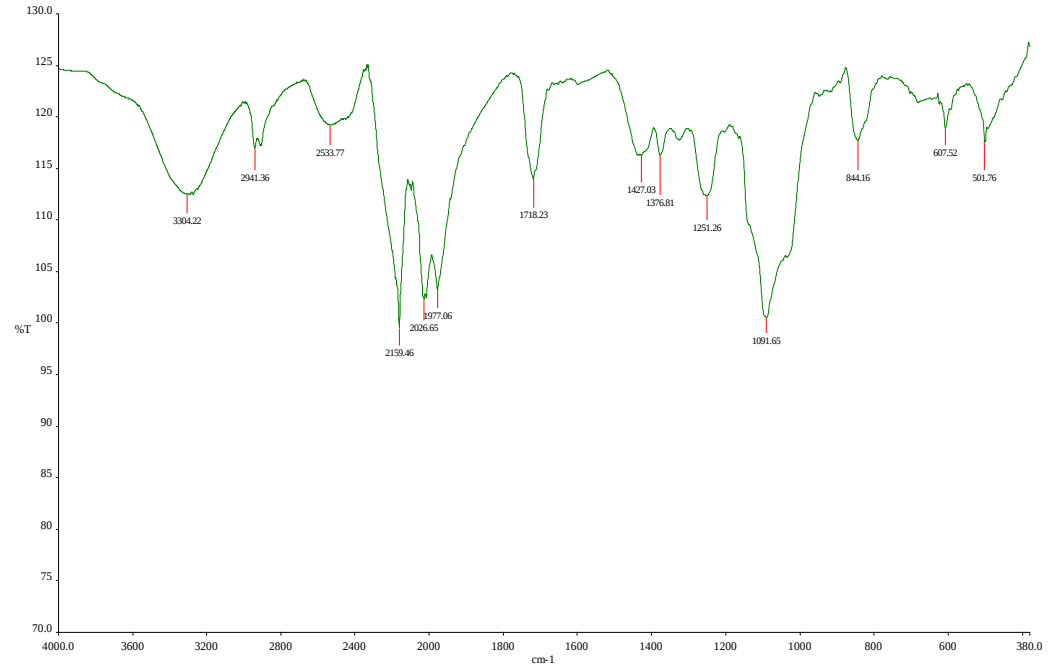
Ek 1- Şekil 7

F1- Keratin formülasyonuna ait FT-IR spektrumu



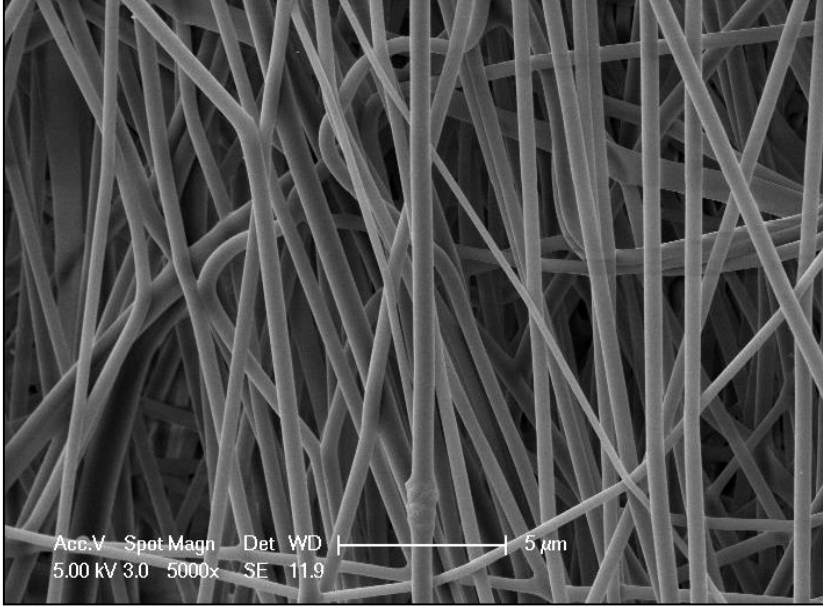
Ek 1- Şekil 8

F3- Keratin formülasyonuna ait FT-IR spektrumu



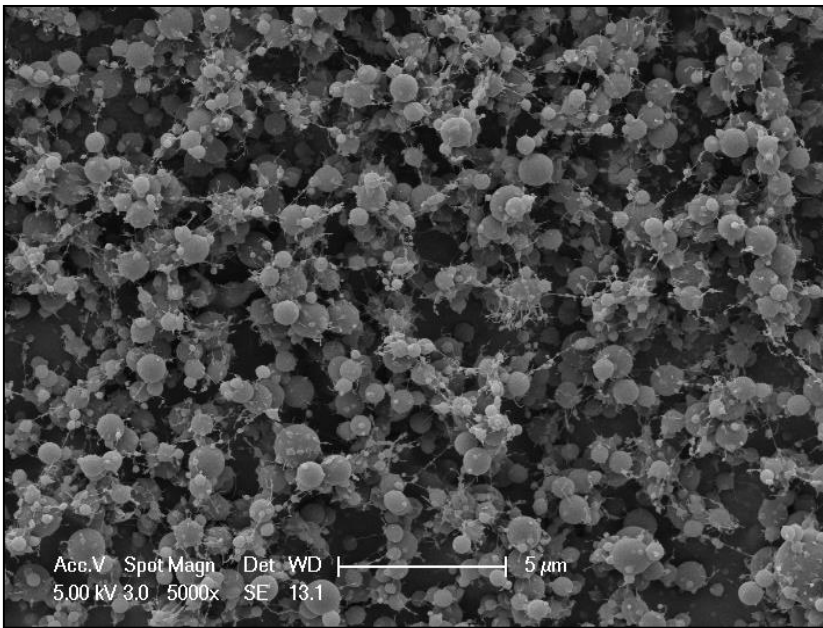
EK 2- Şekil 1

F0- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X5.000)



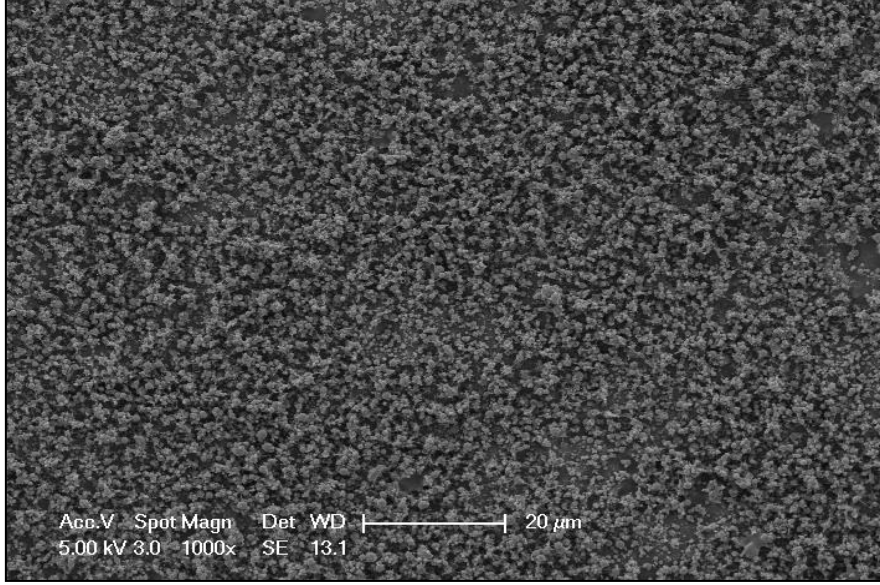
EK 2- Şekil 2

F1- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X5.000)



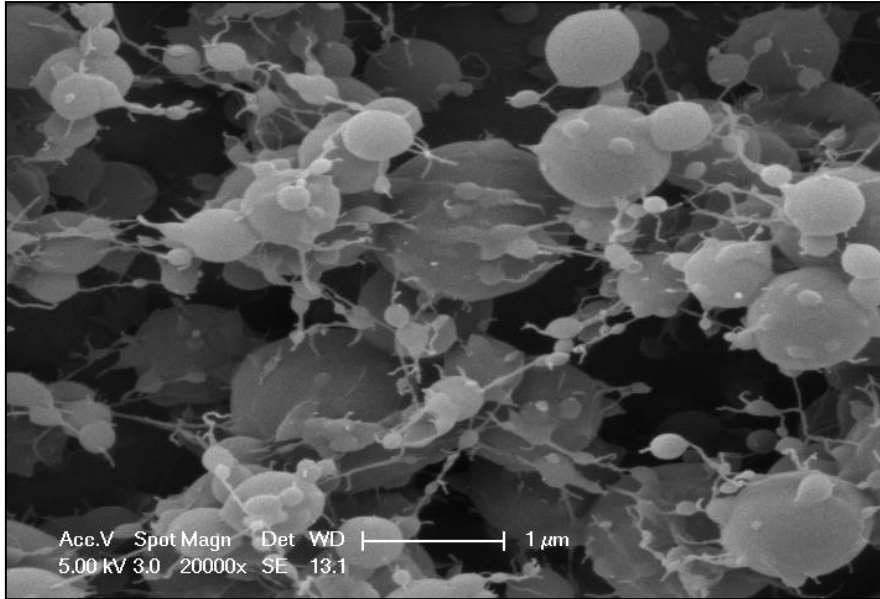
EK 2- Şekil 3

F2- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X1.000)



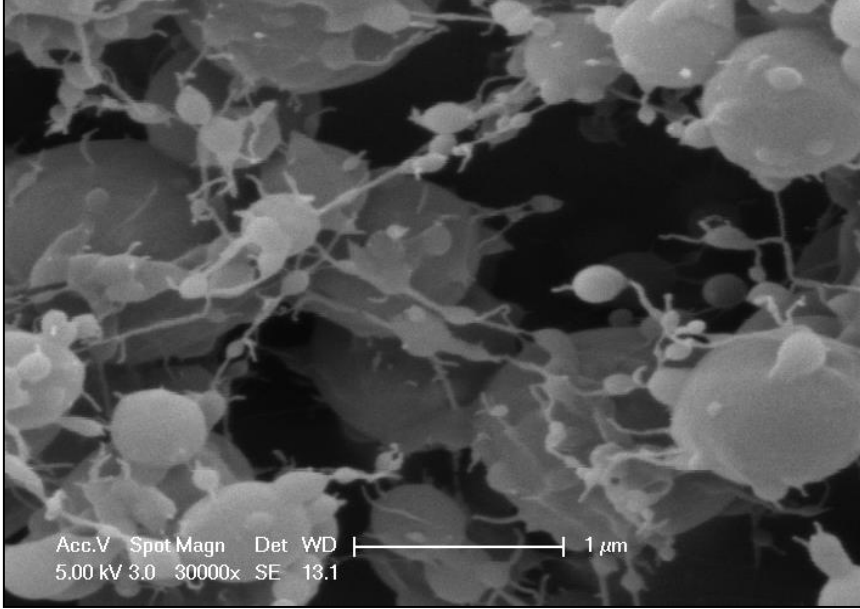
EK 2- Şekil 4

F2- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X20.000)



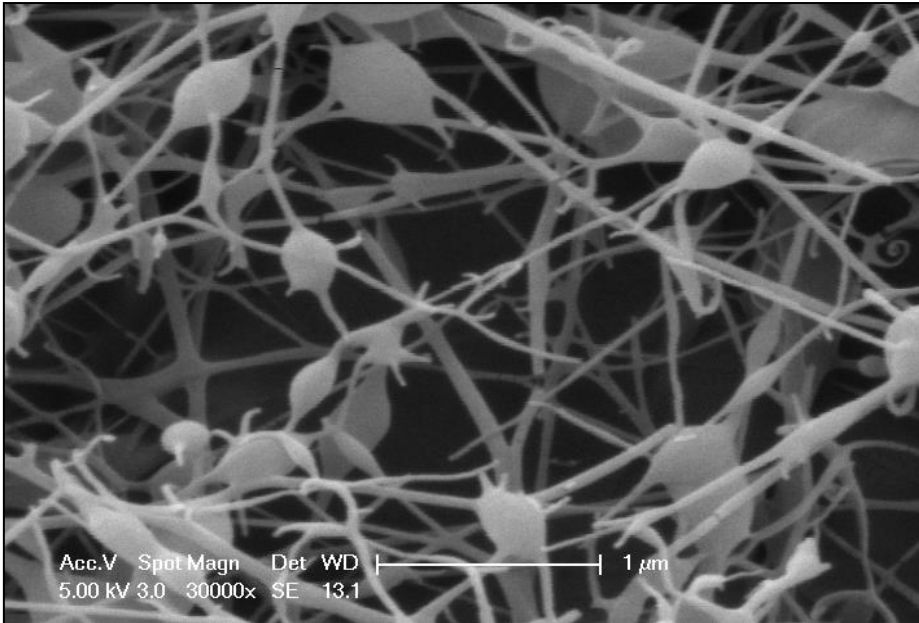
EK 2- Şekil 5

F2- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X30.000)



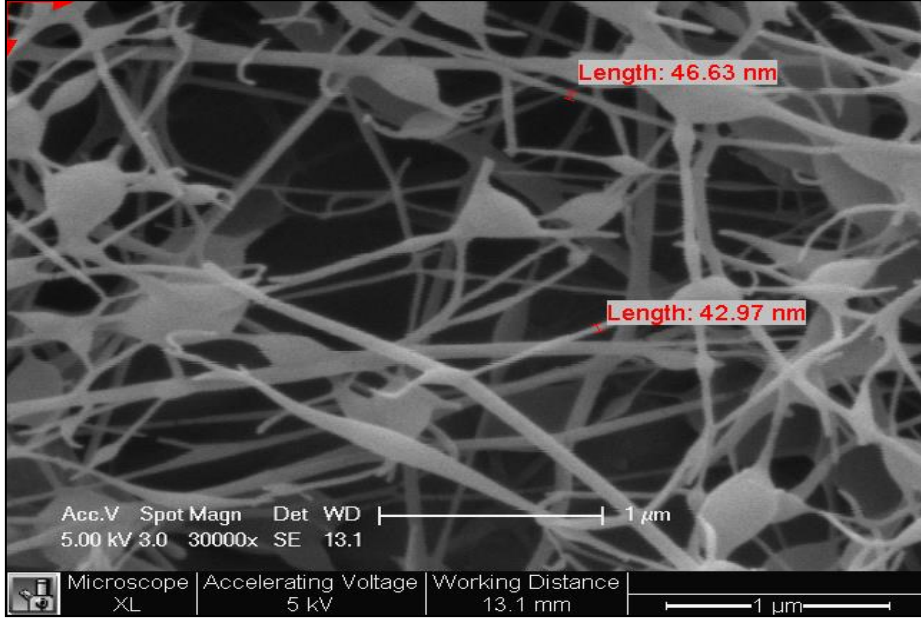
EK 2- Şekil 6

F3- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X30.000)



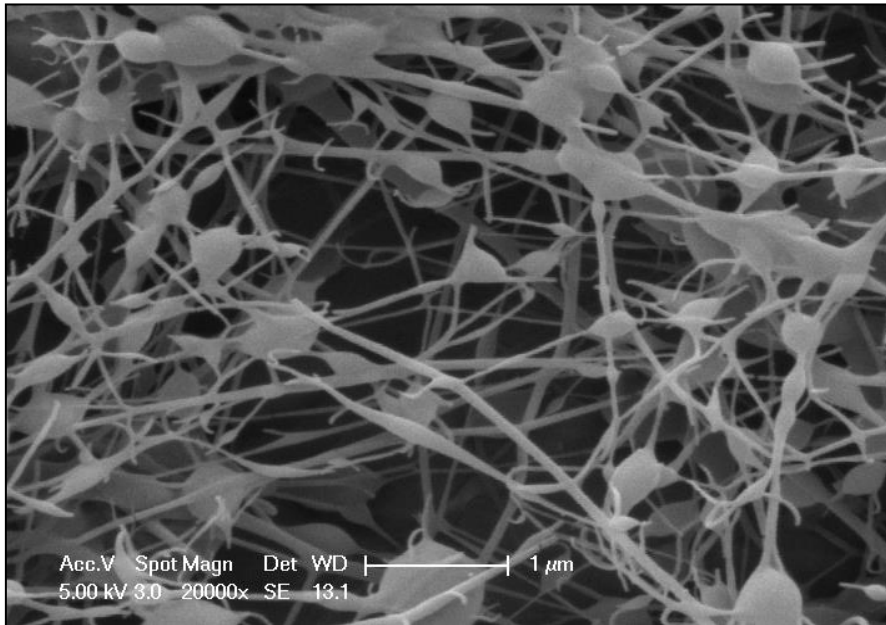
EK 2- Şekil 7

F3- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X30.000)



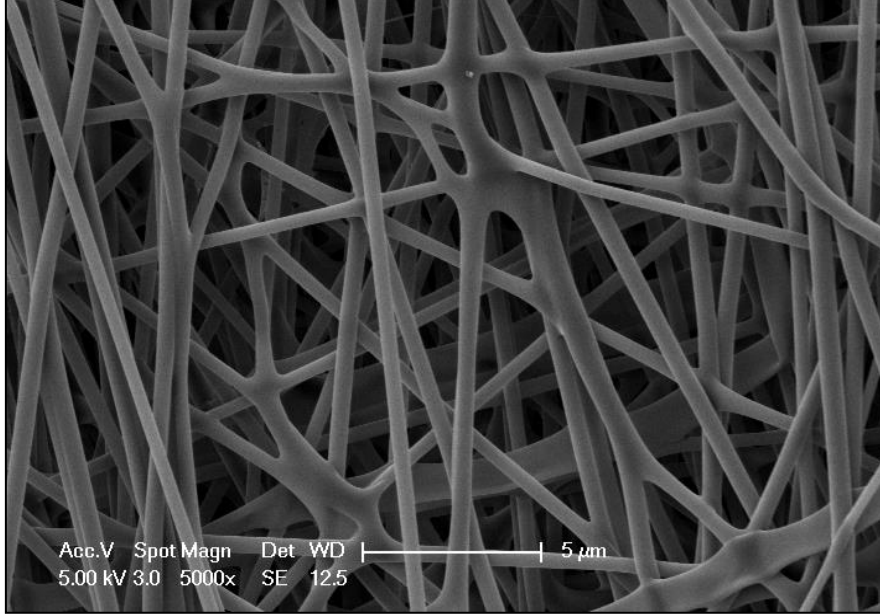
EK 2- Şekil 8

F3- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X20.000)



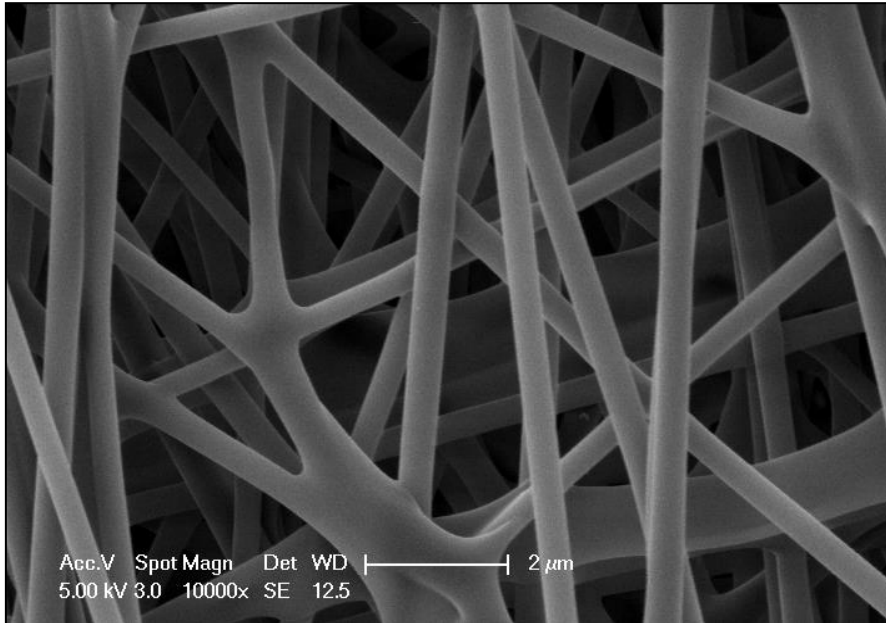
EK 2- Şekil 9

F4- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X5.000)



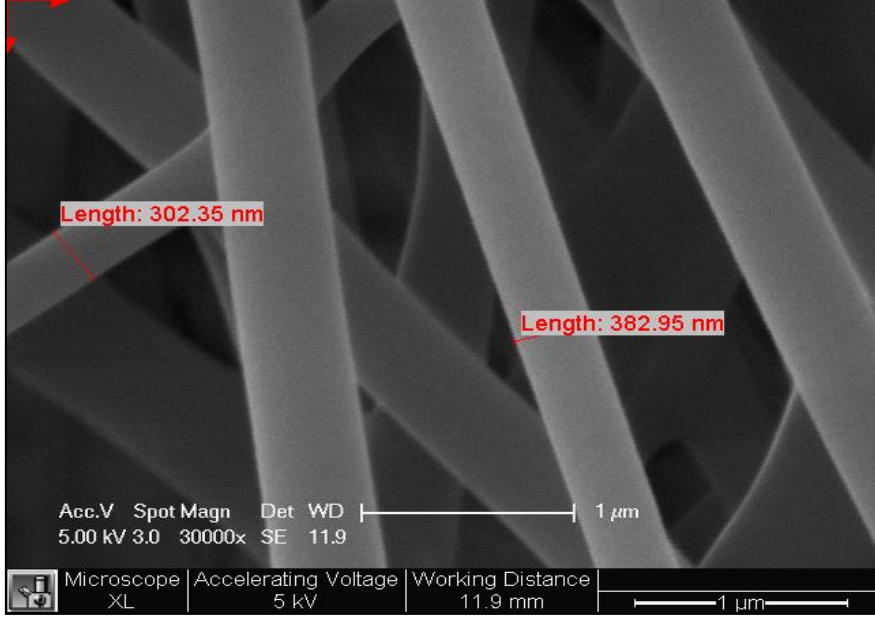
EK 2- Şekil 10

F4- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X10.000)



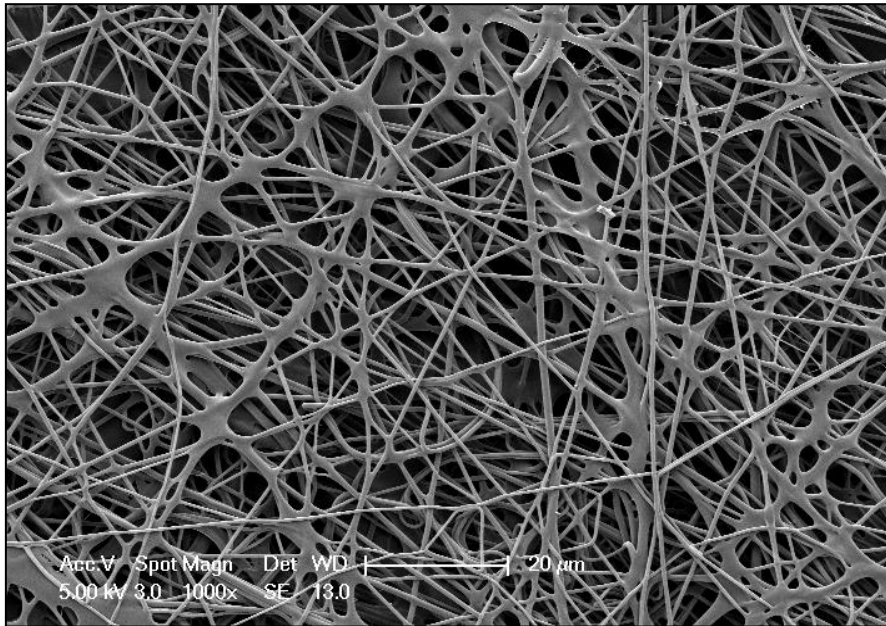
EK 2- Şekil 11

F4- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X30.000)



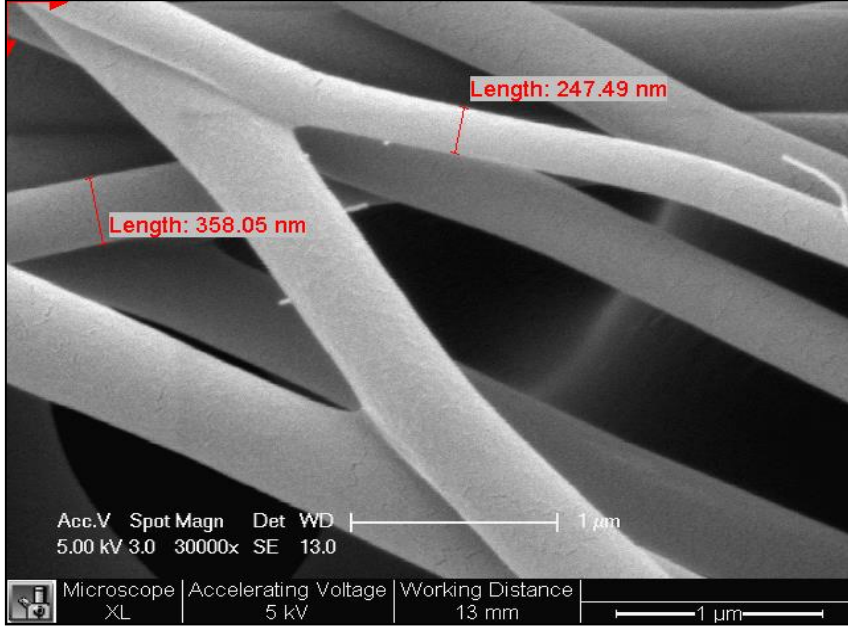
EK 2- Şekil 12

F5- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X1.000)



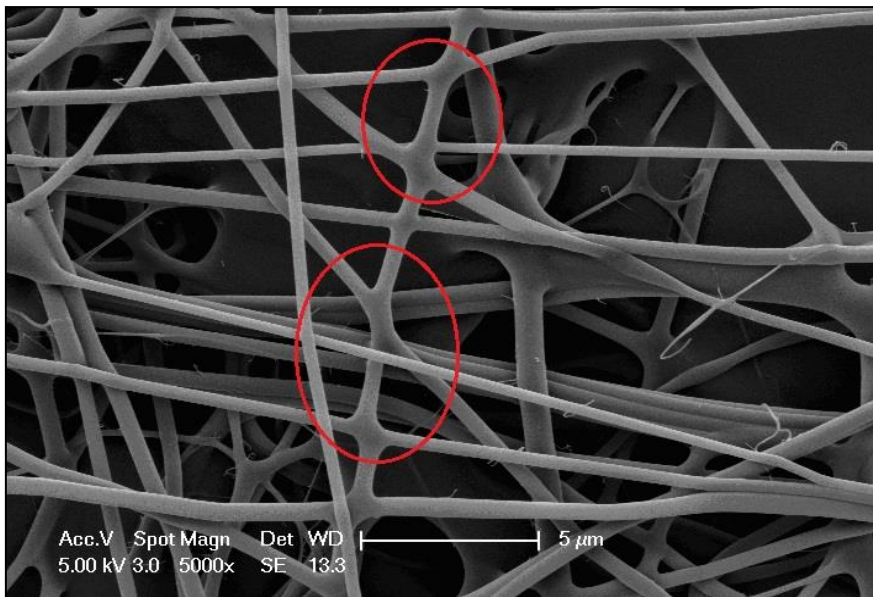
EK 2- Şekil 13

F5- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X30.000)



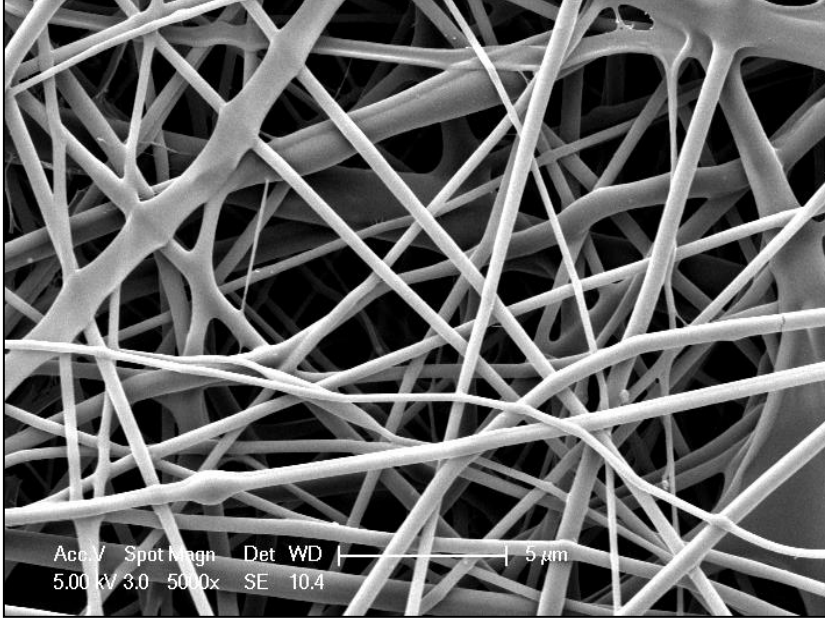
EK 2- Şekil 14

F5- Kollajen formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X5.000)



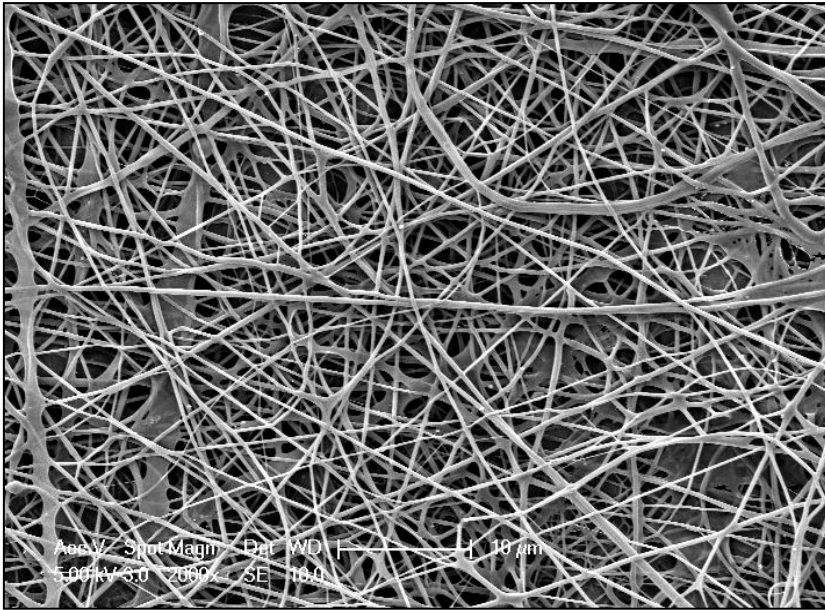
EK 2- Şekil 15

F0- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X5.000)



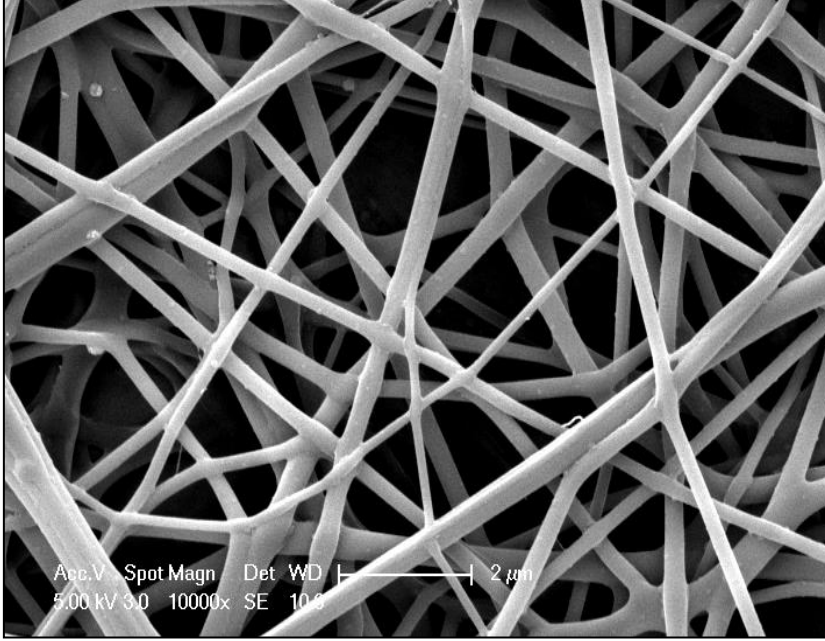
EK 2- Şekil 16

F1- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X2.000)



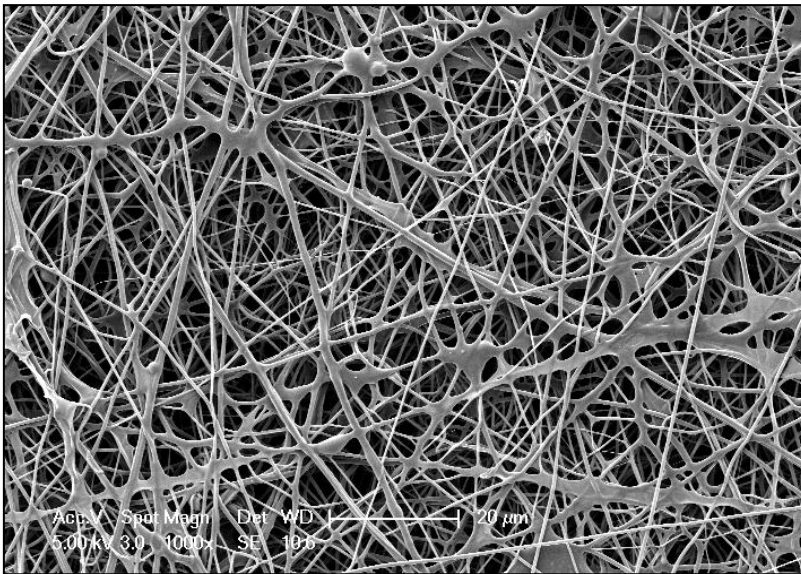
EK 2- Şekil 17

F1- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X10.000)



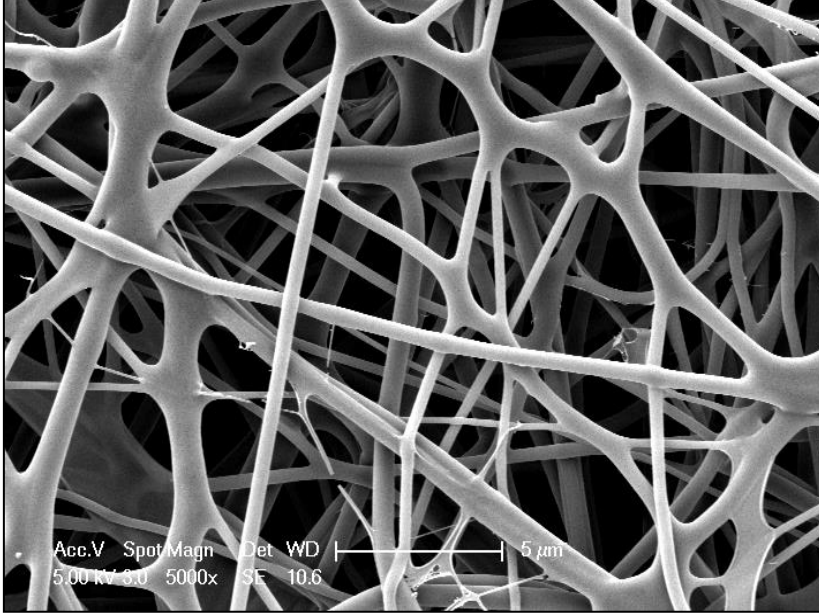
EK 2- Şekil 18

F3- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X1.000)



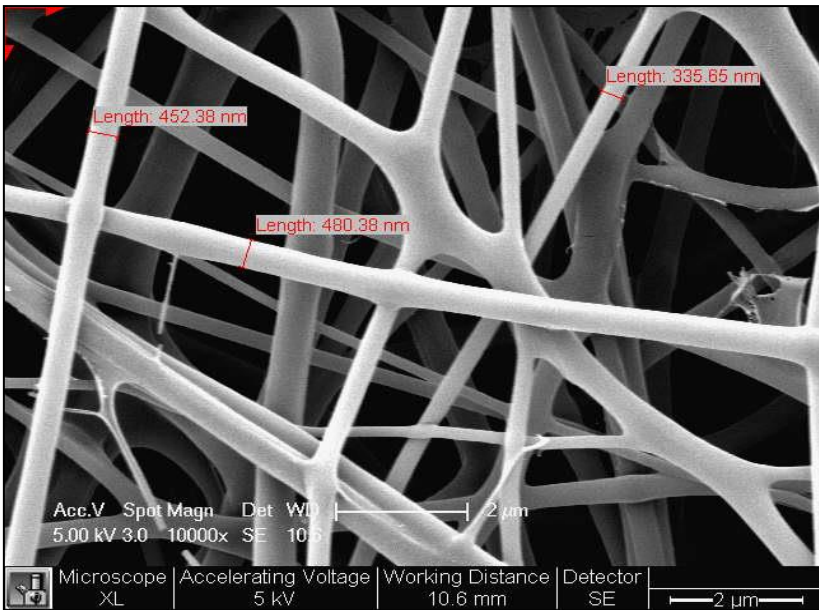
EK 2- Şekil 19

F3- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X5.000)



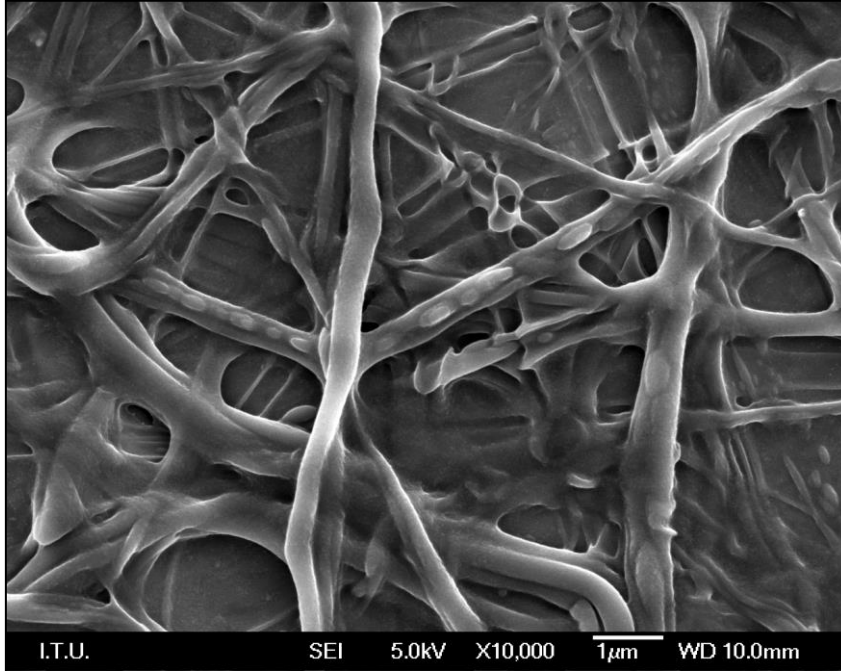
EK 2- Şekil 20

F3- Keratin formülasyonu hücre ekimi öncesine ait SEM fotoğrafı (X10.000)



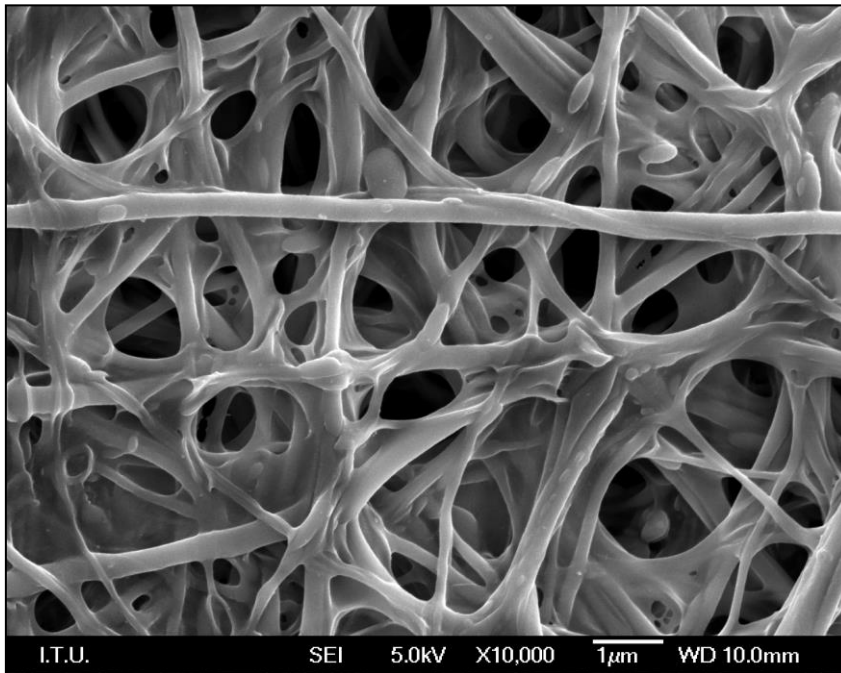
Ek 3- Şekil 1

F4- Kollajen -ECV 304 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X10.000)



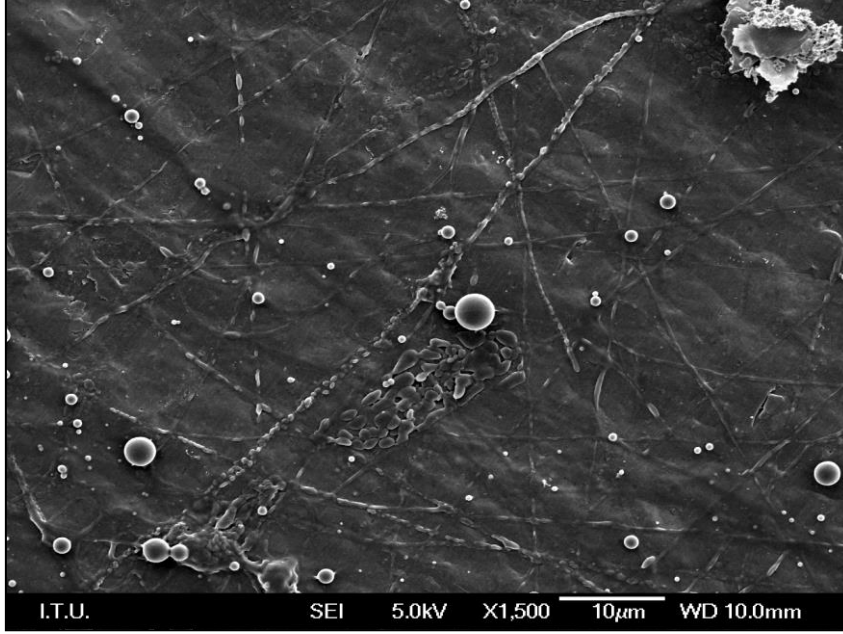
Ek 3- Şekil 2

F5- Kollajen –SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X10.000)



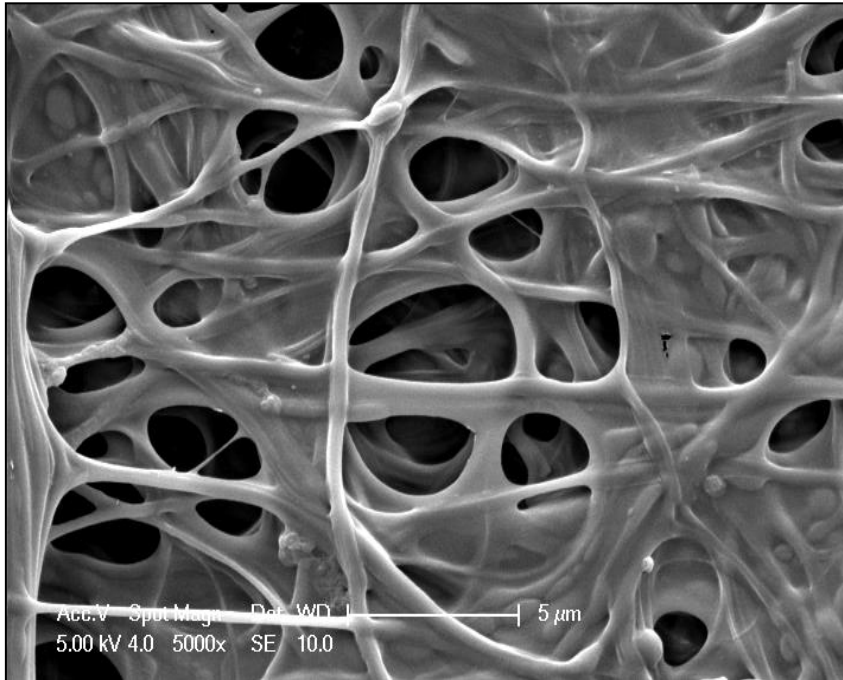
Ek 3- Şekil 3

F4- Kollajen -3T3 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X10.000)



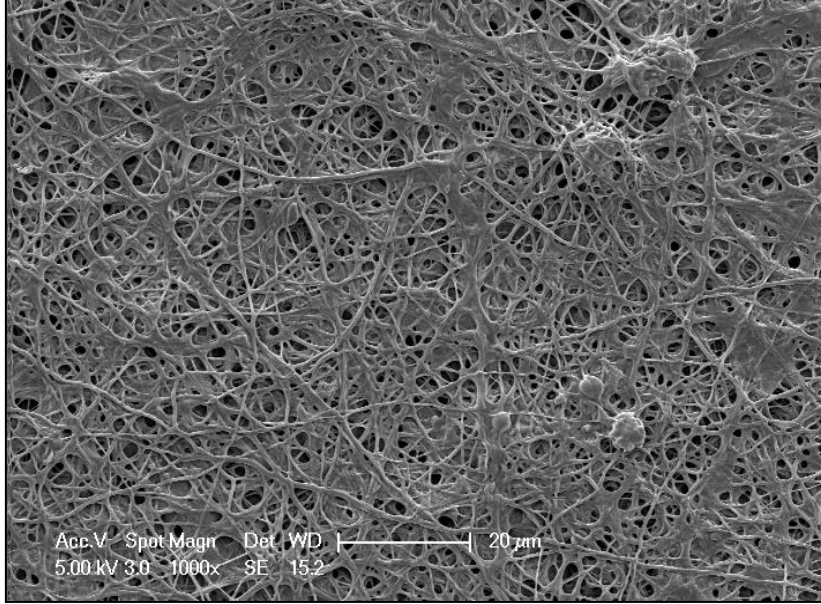
Ek 3- Şekil 4

F5- Kollajen –ECV formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X10.000)



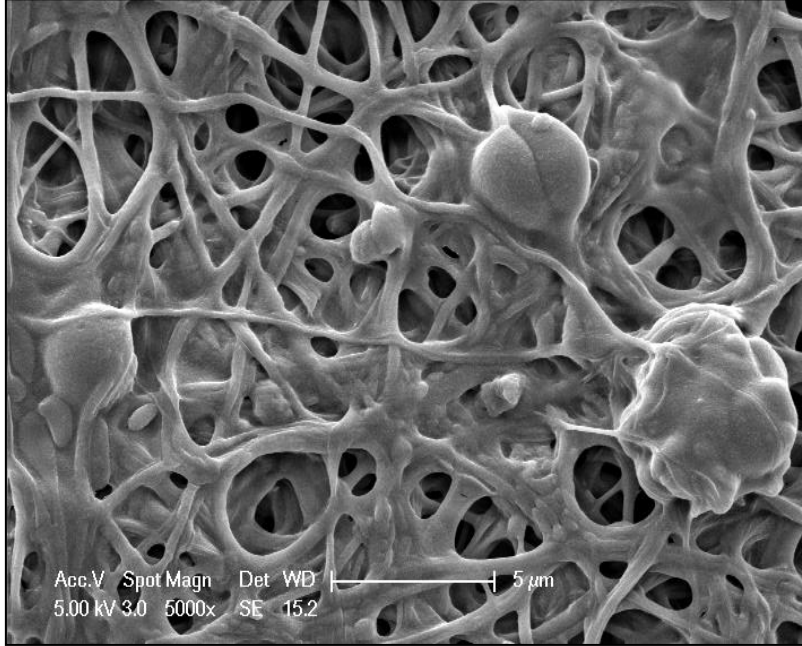
Ek 3- Şekil 5

F0- Keratin –SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X1.000)



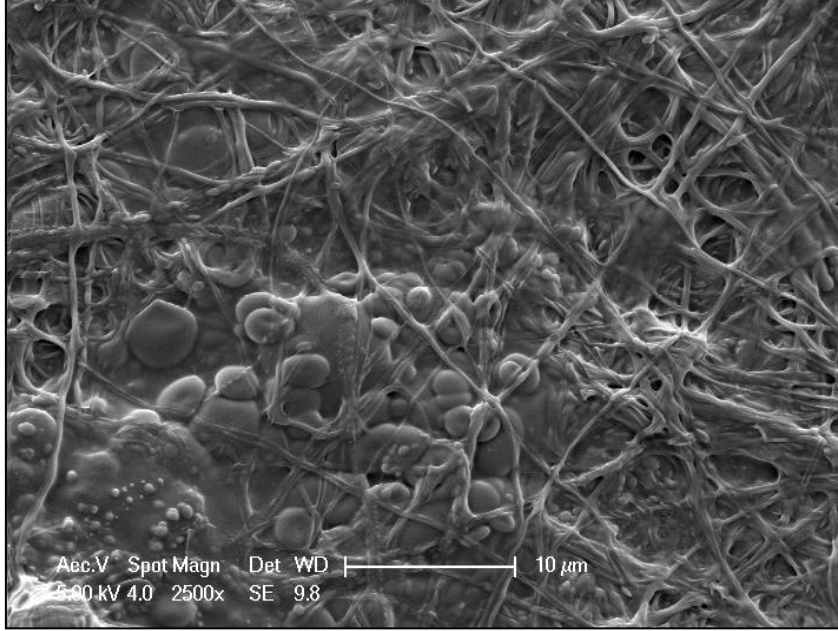
Ek 3- Şekil 6

F0- Keratin –SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000)



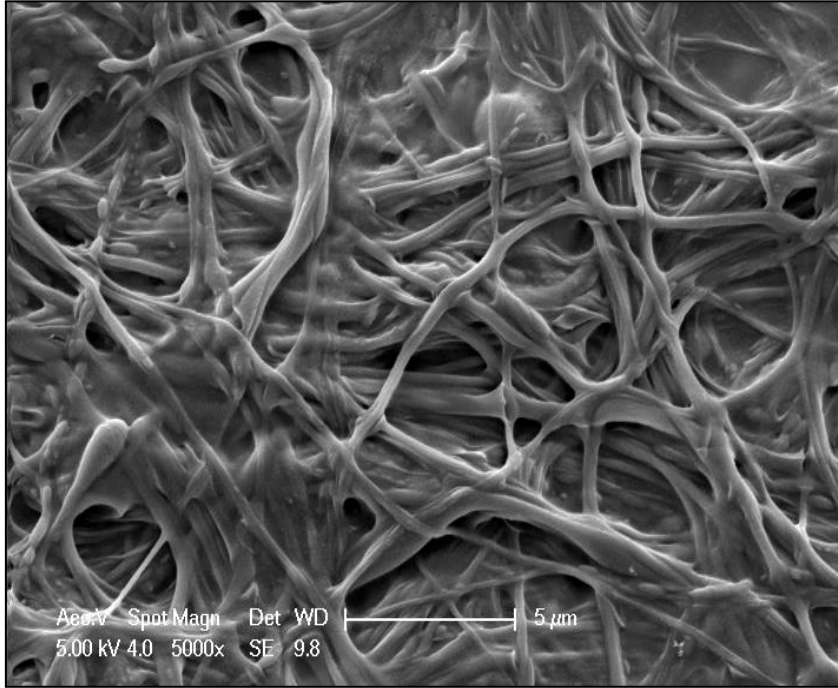
Ek 3- Şekil 7

F0- Keratin –ECV 304 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X2.500)



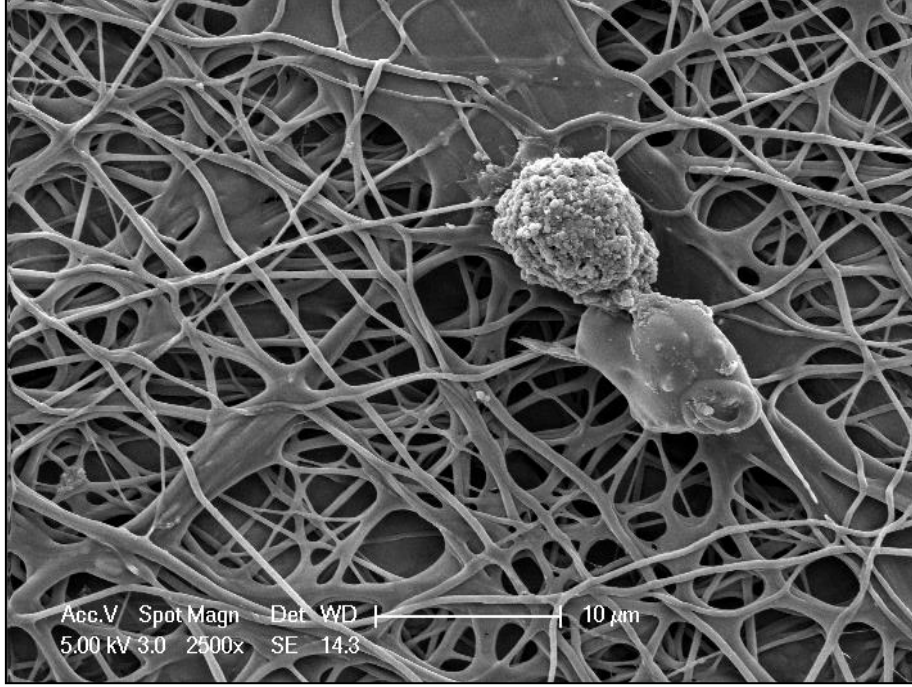
Ek 3- Şekil 8

F0- Keratin –ECV 304 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000)



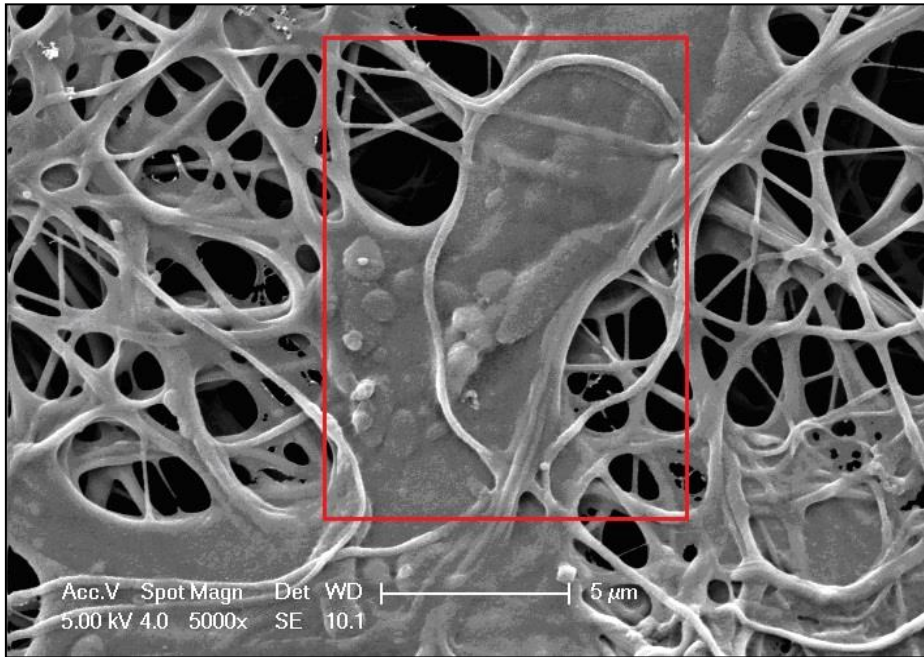
Ek 3- Şekil 9

F0- Keratin –3T3 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X2.500)



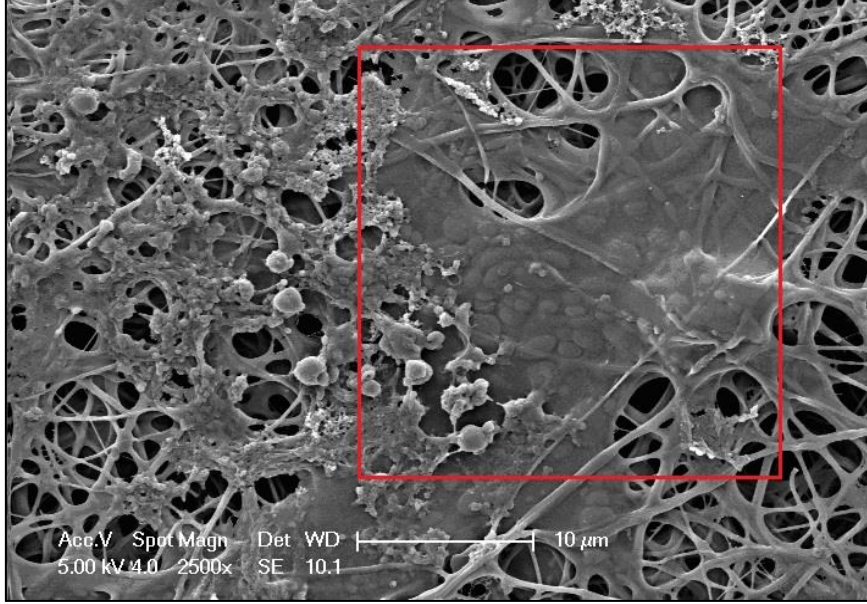
Ek 3- Şekil 10

F1- Keratin –SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000)



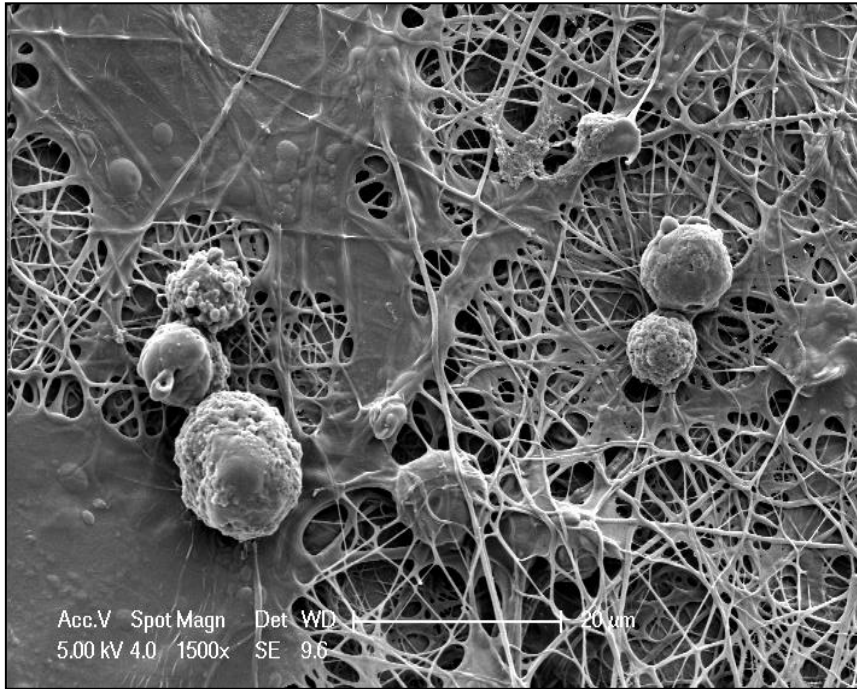
Ek 3- Şekil 11

F1- Keratin –SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X2.500)



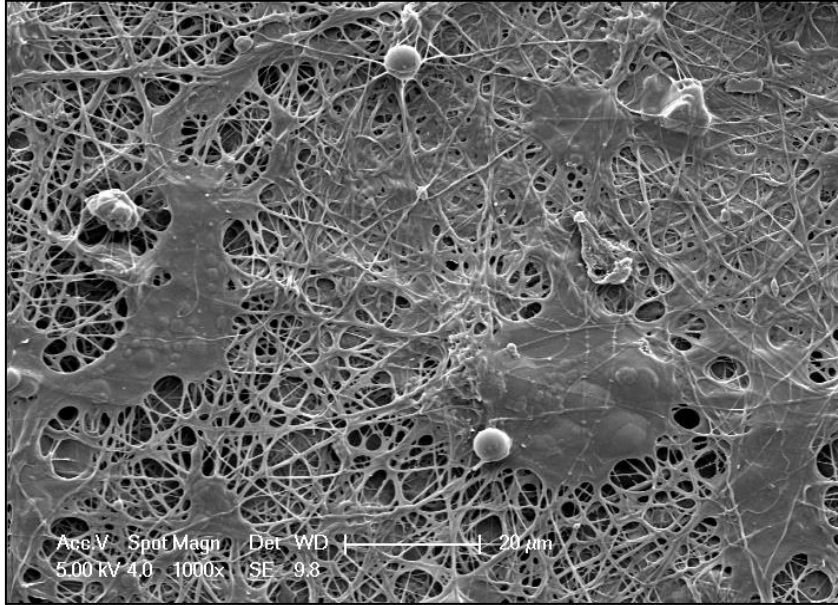
Ek 3- Şekil 12

F1- Keratin –ECV 304 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X1.500)



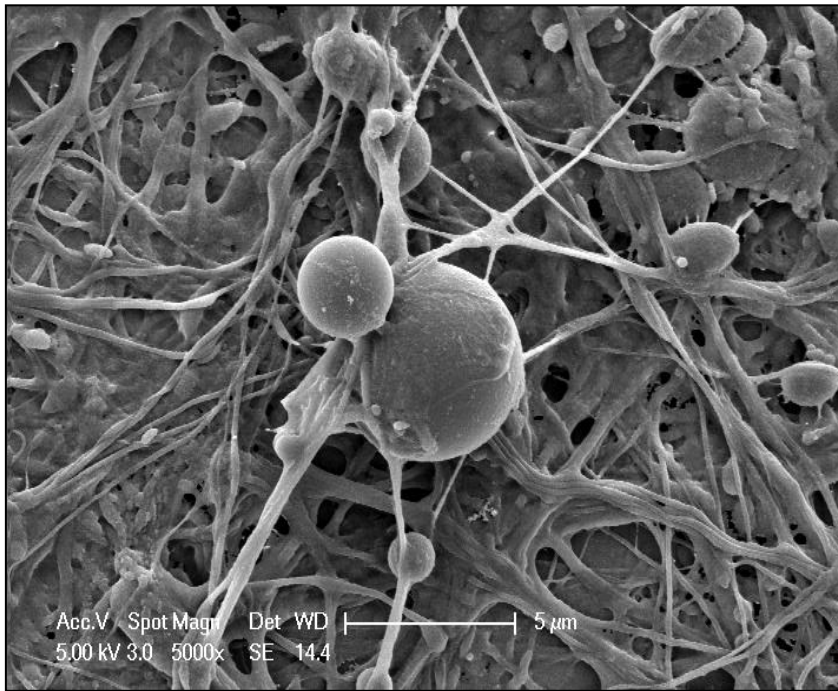
Ek 3- Şekil 13

F1- Keratin –ECV 304 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X1.000)



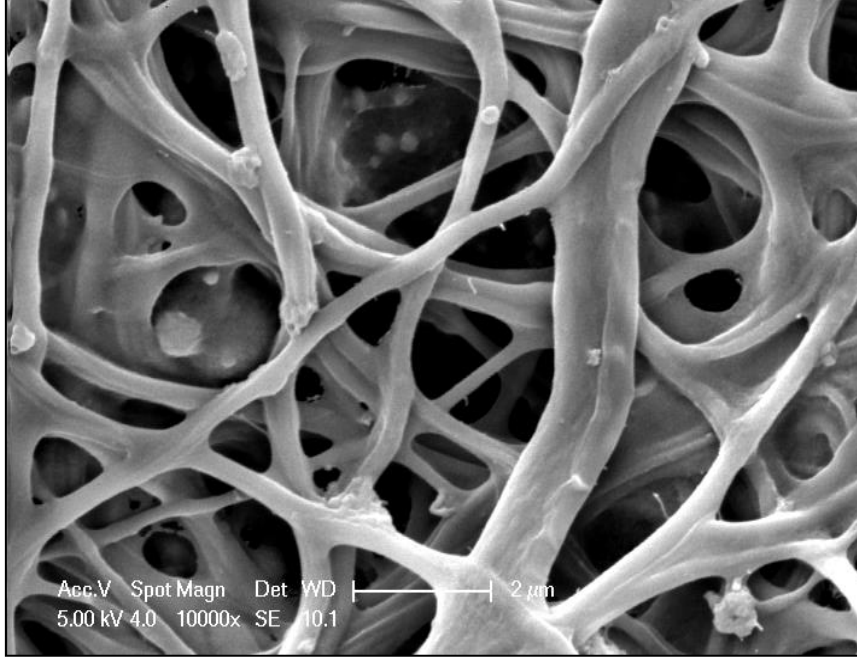
Ek 3- Şekil 14

F1- Keratin –3T3 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000)



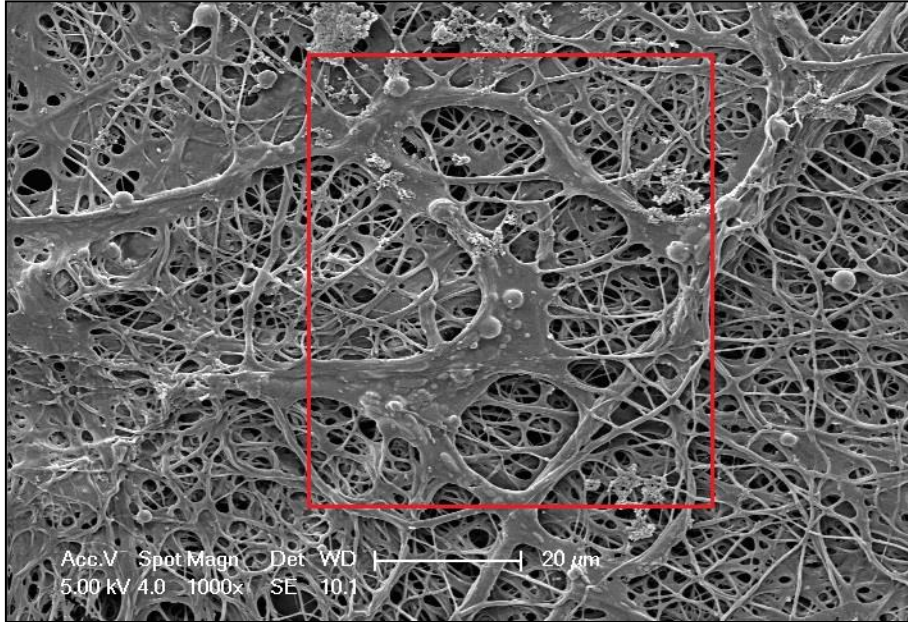
Ek 3- Şekil 15

F2- Keratin –SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X10.000)



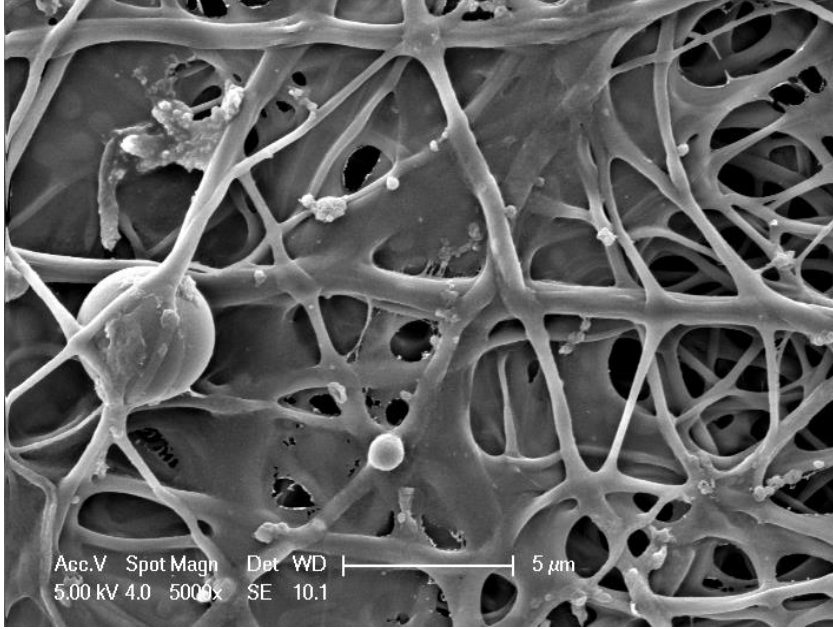
Ek 3- Şekil 16

F2- Keratin –SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X1.000)



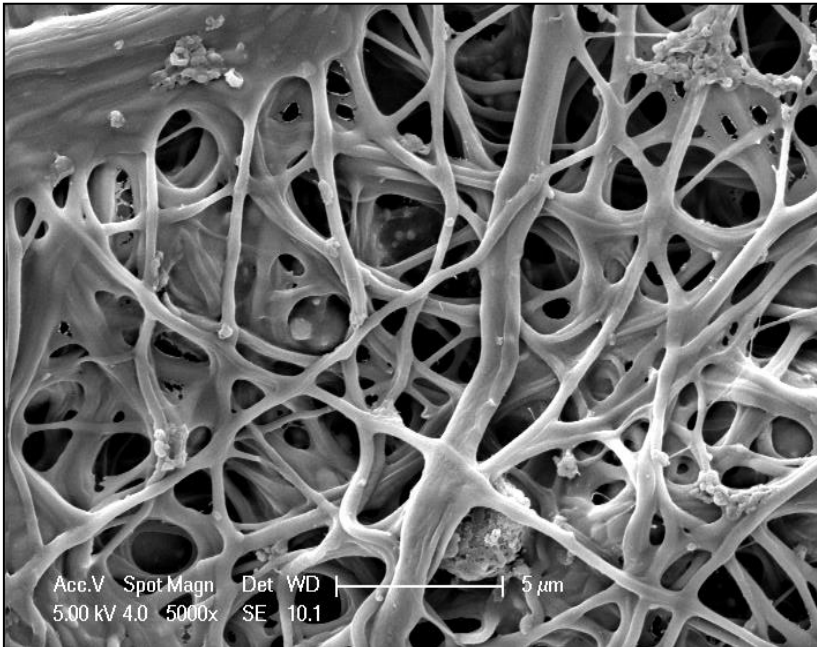
Ek 3- Şekil 17

F2- Keratin –SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000)



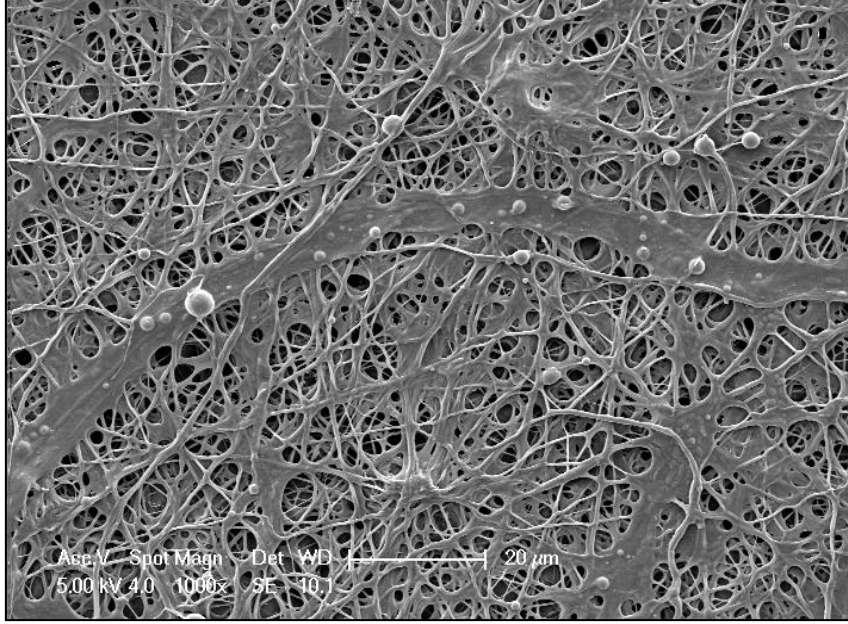
Ek 3- Şekil 18

F2- Keratin –SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000)



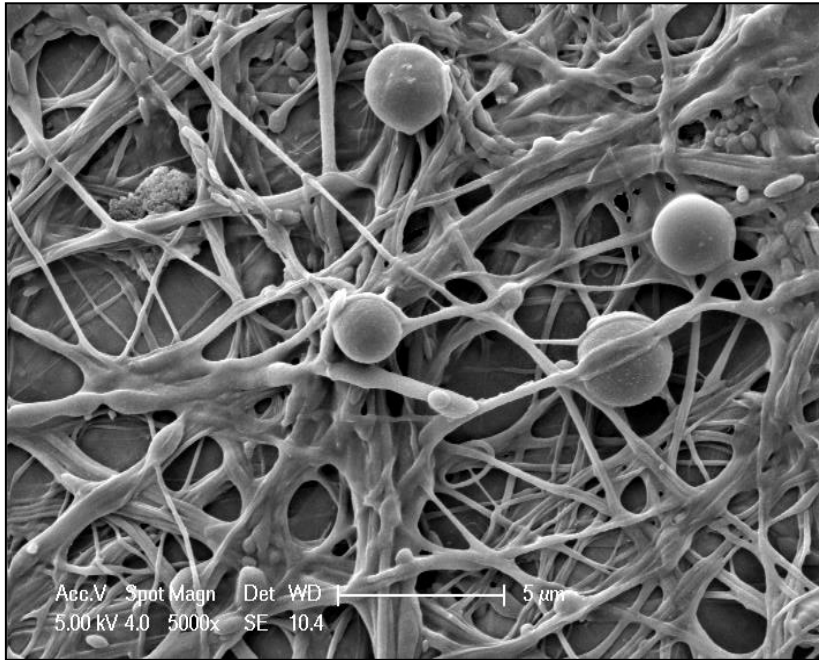
Ek 3- Şekil 19

F2- Keratin –ECV 304 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X1.000)



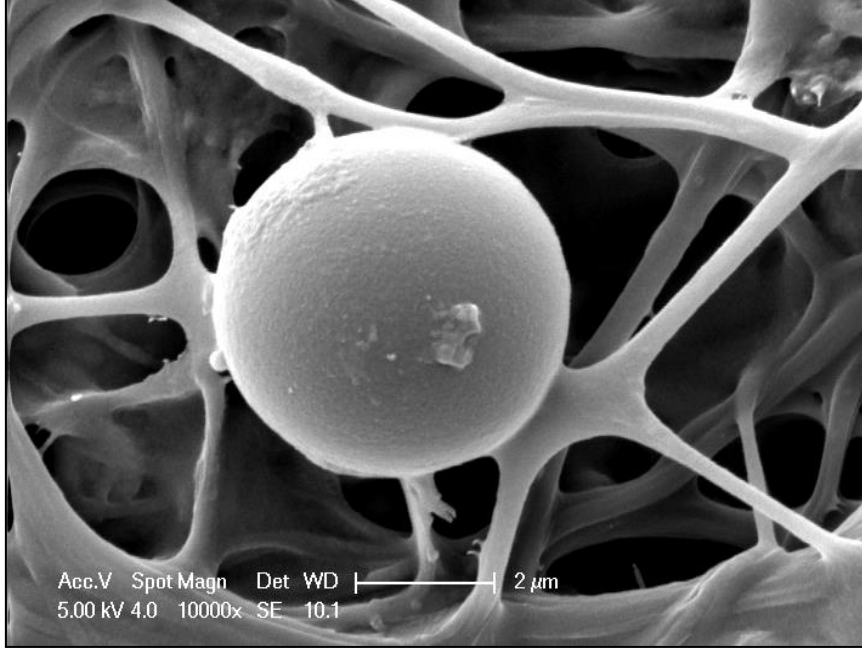
Ek 3- Şekil 20

F2- Keratin –3T3 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı(X5.000)



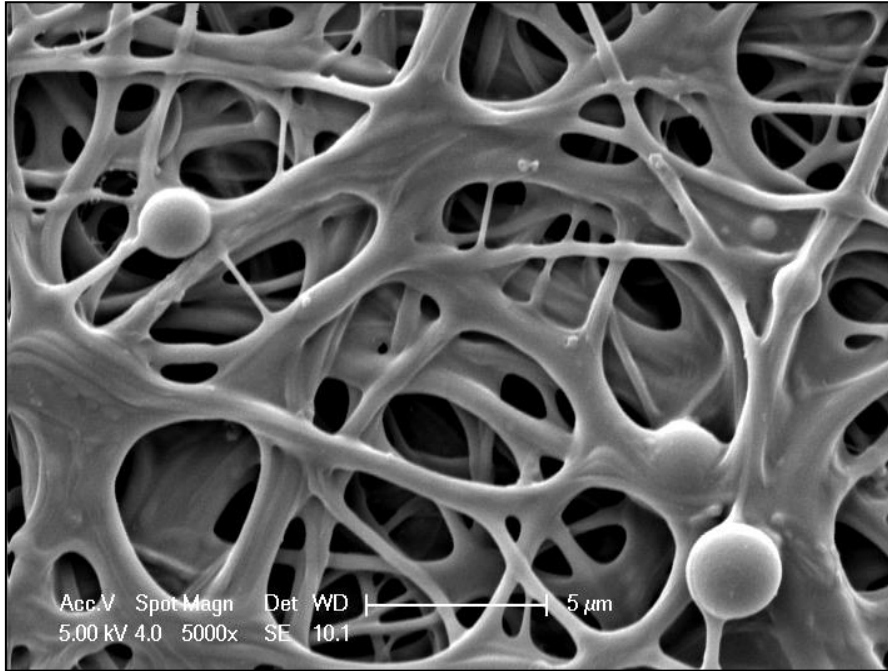
Ek 3- Şekil 21

F3- Keratin –SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X10.000)



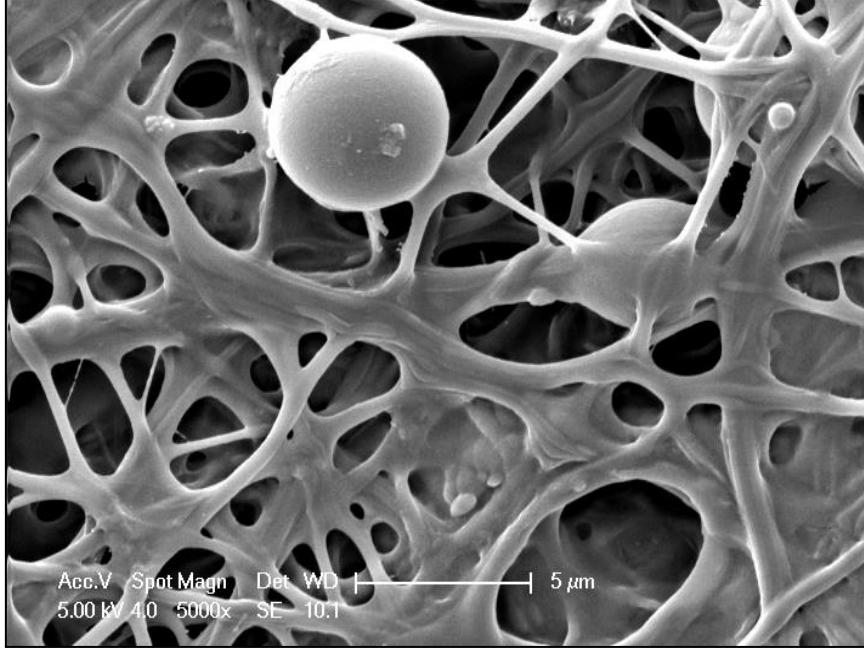
Ek 3- Şekil 22

F3- Keratin –SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000)



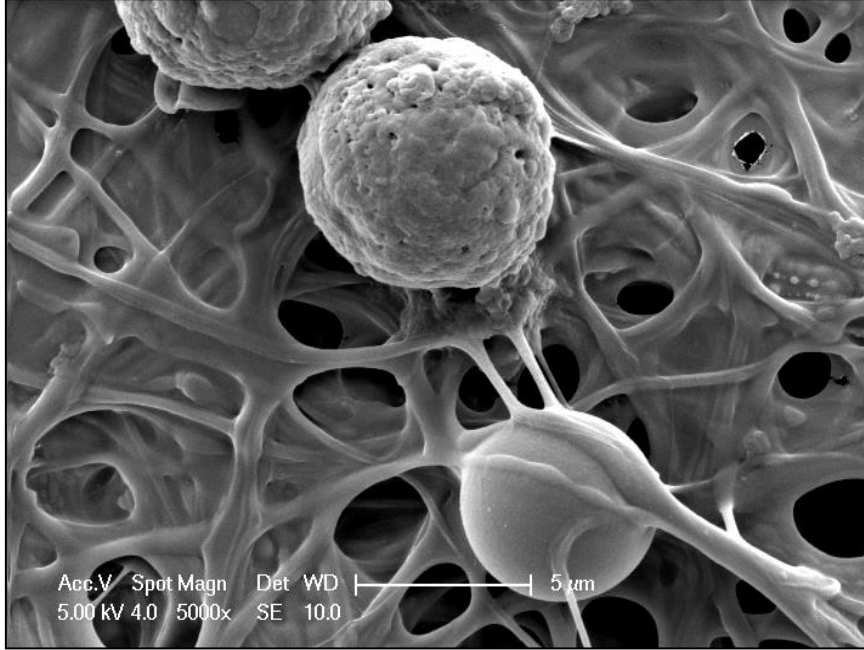
Ek 3- Şekil 23

F3- Keratin –SAOS formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000)



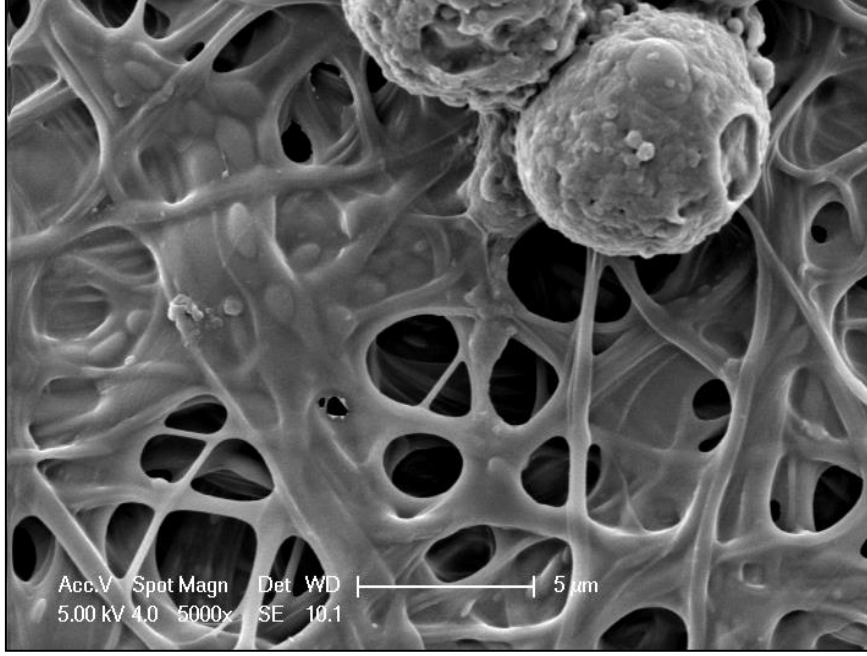
Ek 3- Şekil 24

F3- Keratin –ECV 304 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000)



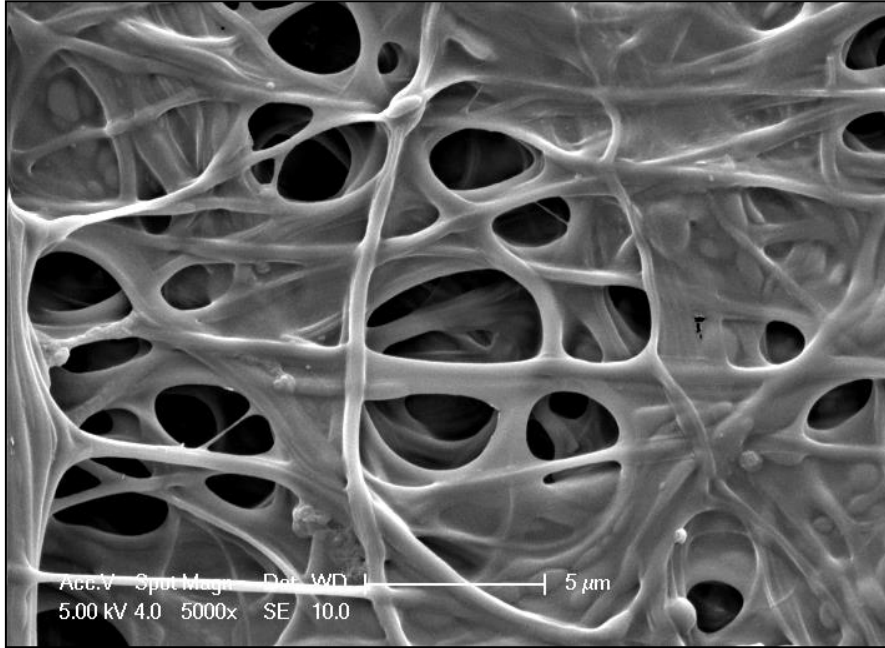
Ek 3- Şekil 25

F3- Keratin –ECV 304 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000)



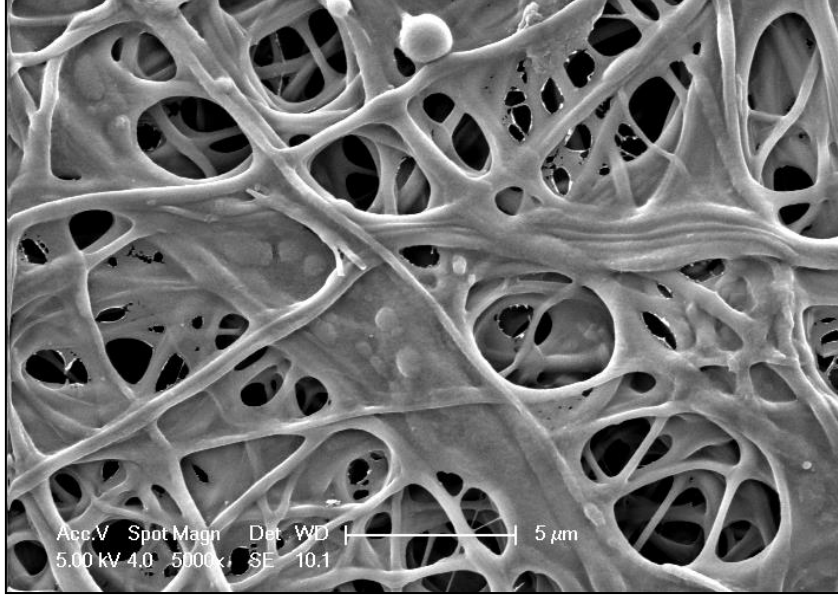
Ek 3- Şekil 26

F0- Keratin –3T3 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000)



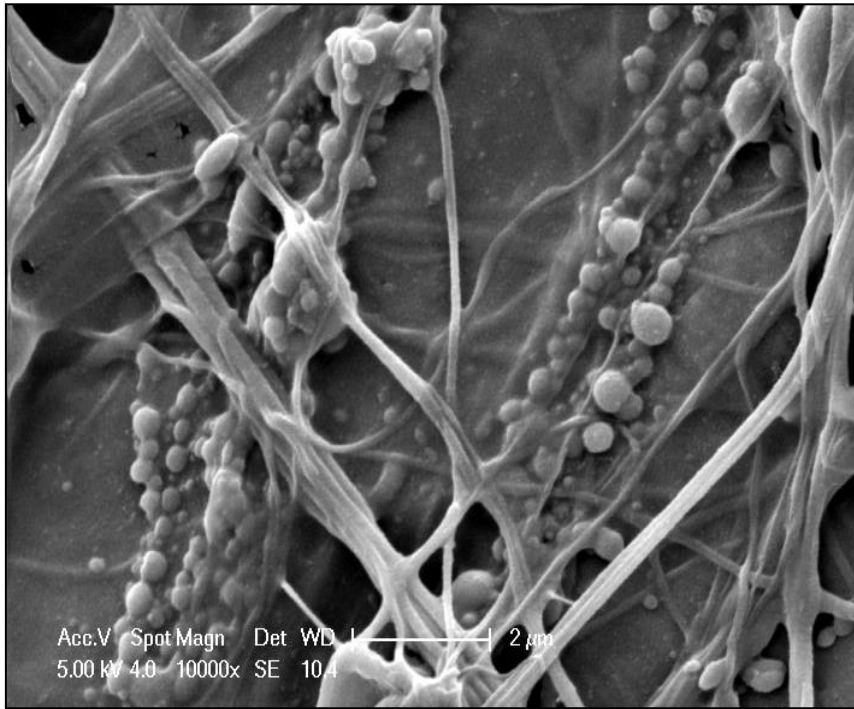
Ek 3- Şekil 27

F1- Keratin –3T3 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X5.000)



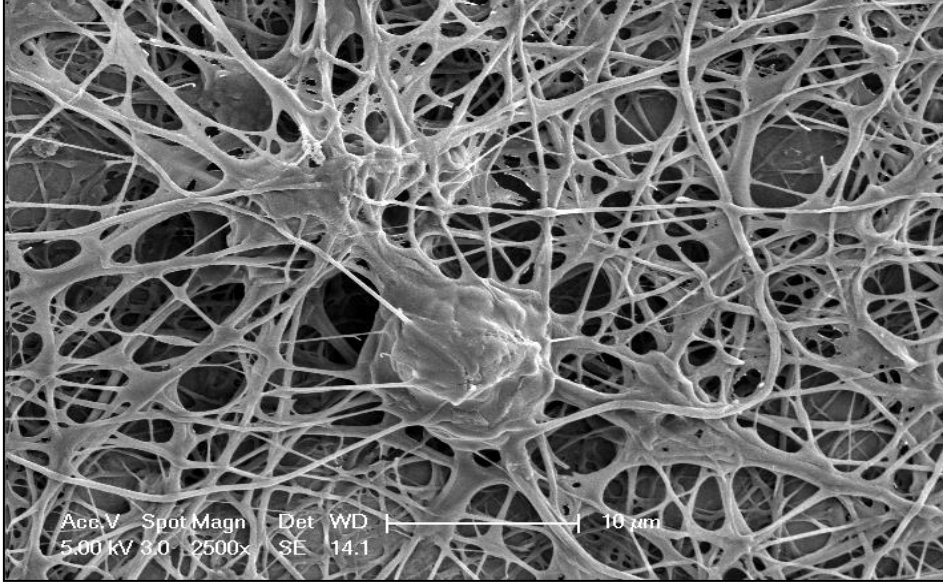
Ek 3- Şekil 28

F2- Keratin –3T3 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X10.000)



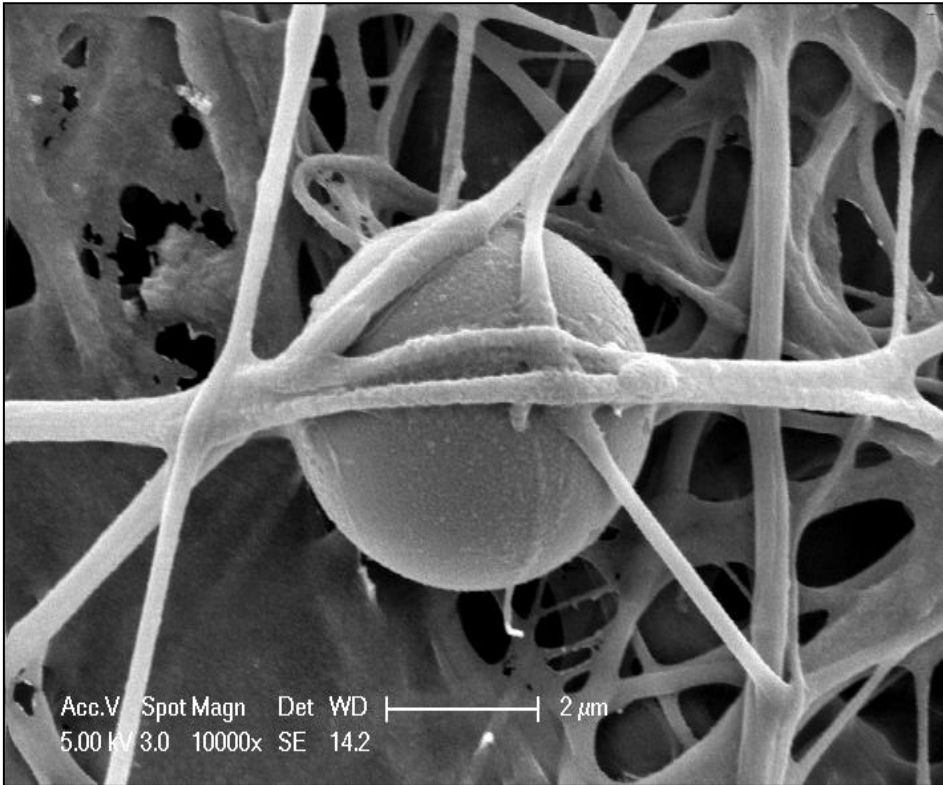
Ek 3- Şekil 29

F3- Keratin –3T3 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X2.500)



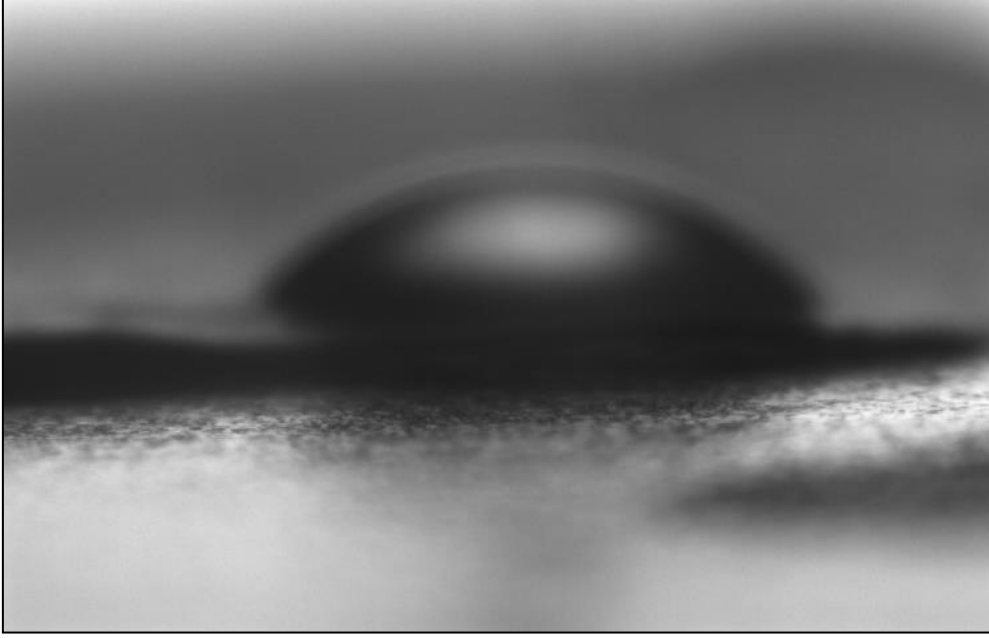
Ek 3- Şekil 30

F2- Keratin –ECV 304 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (X10.000)



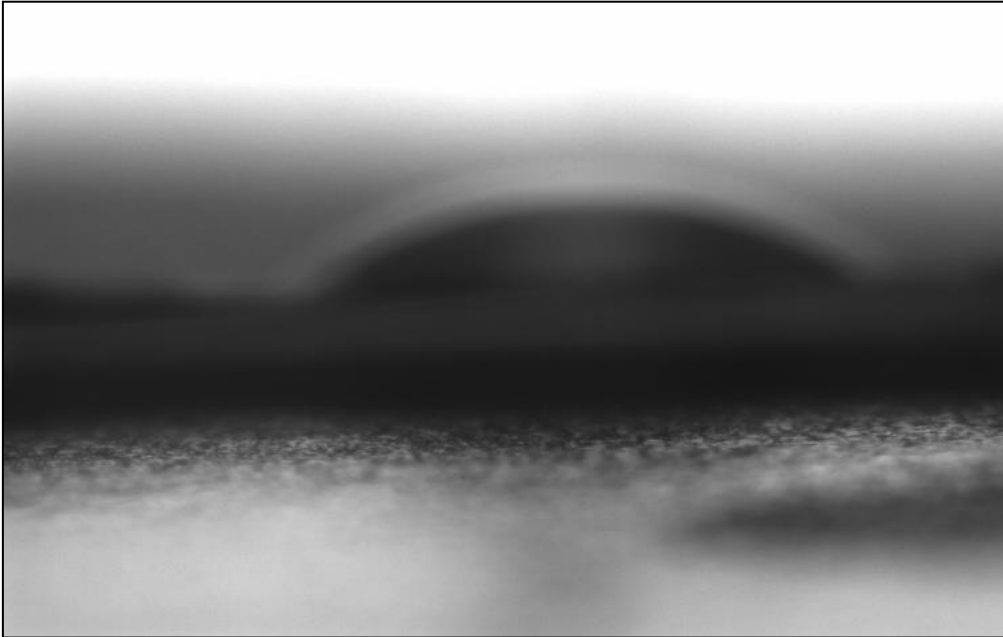
EK 4- Şekil 1

F5- Kollajen formülasyonuna ait temas açısı fotoğrafı



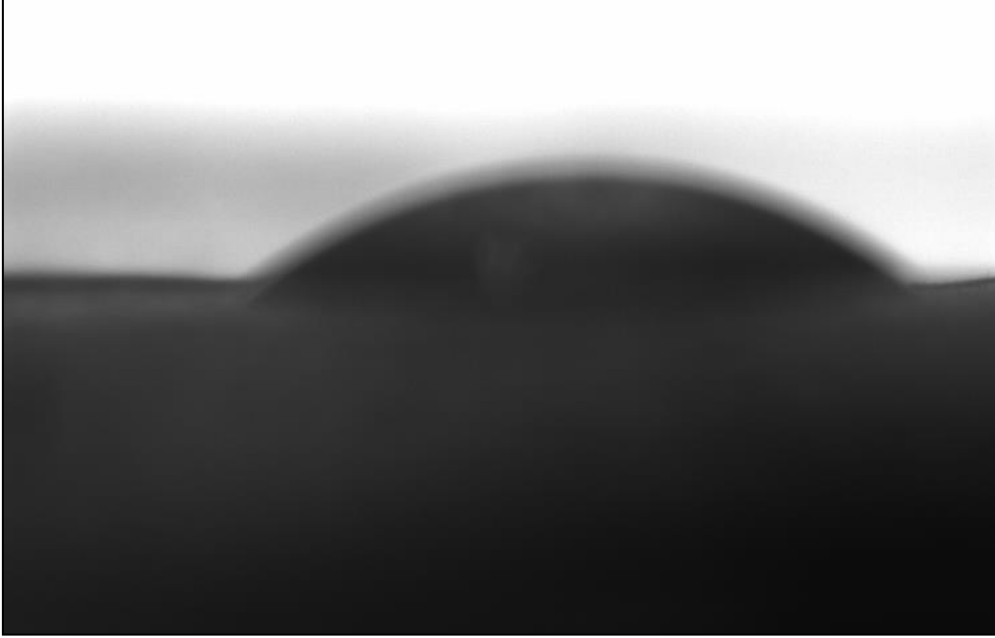
EK 4- Şekil 2

F5- Kollajen formülasyonuna ait temas açısı fotoğrafı



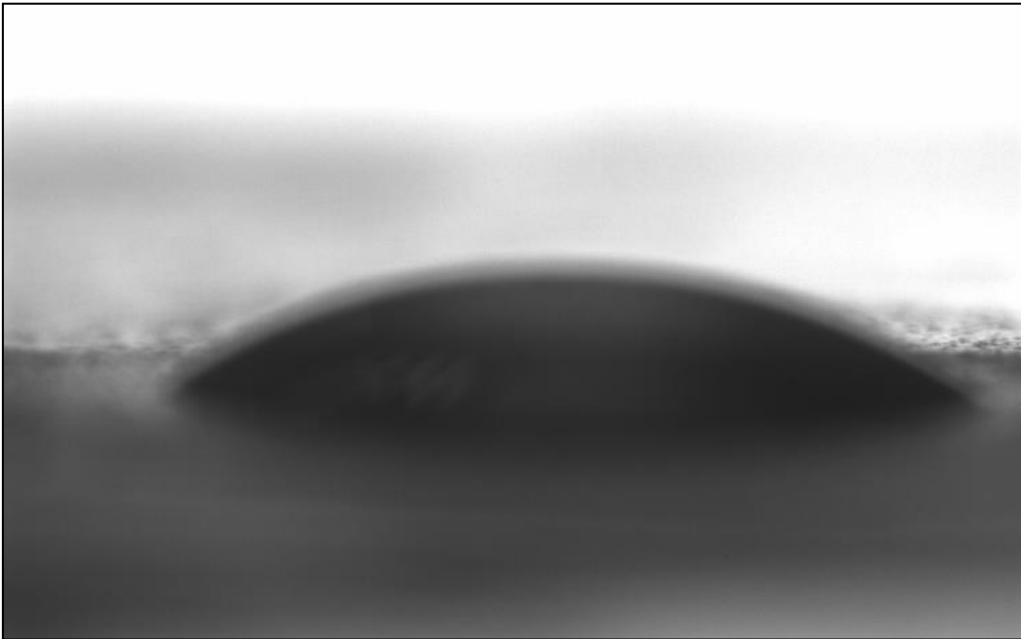
EK 4- Şekil 3

F0- Keratin formülasyonuna ait temas açısı fotoğrafı



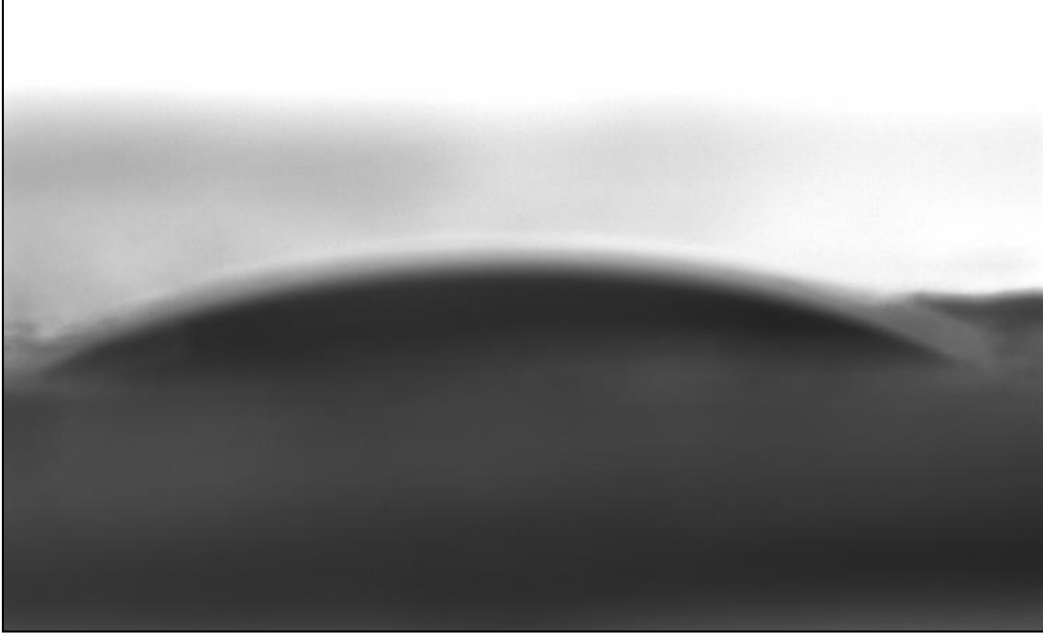
EK 4- Şekil 4

F1- Keratin formülasyonuna ait temas açısı fotoğrafı



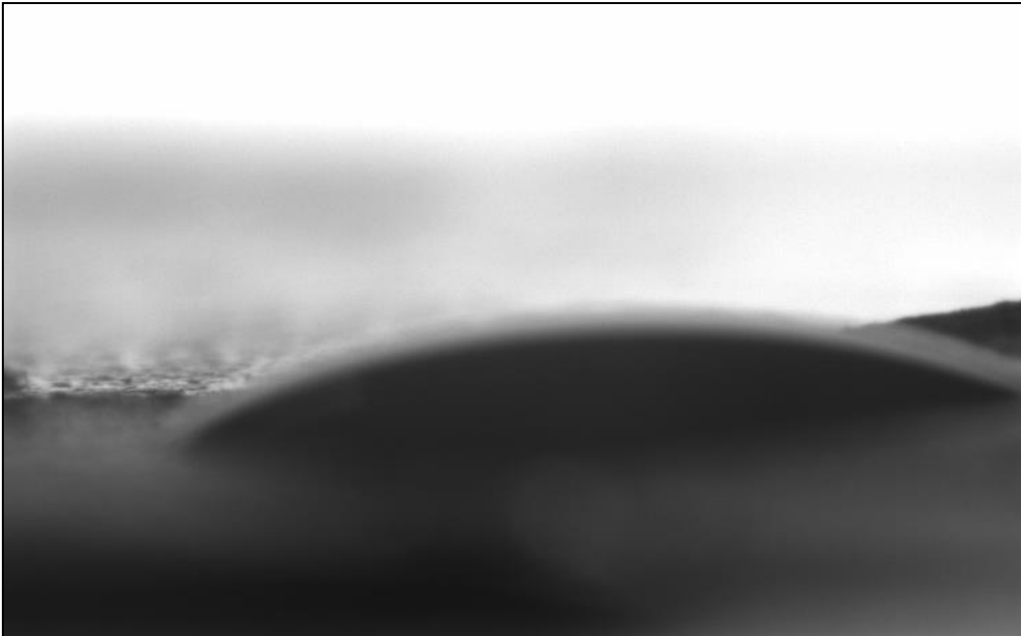
EK 4- Şekil 5

F2- Keratin formülasyonuna ait temas açısı fotoğrafı



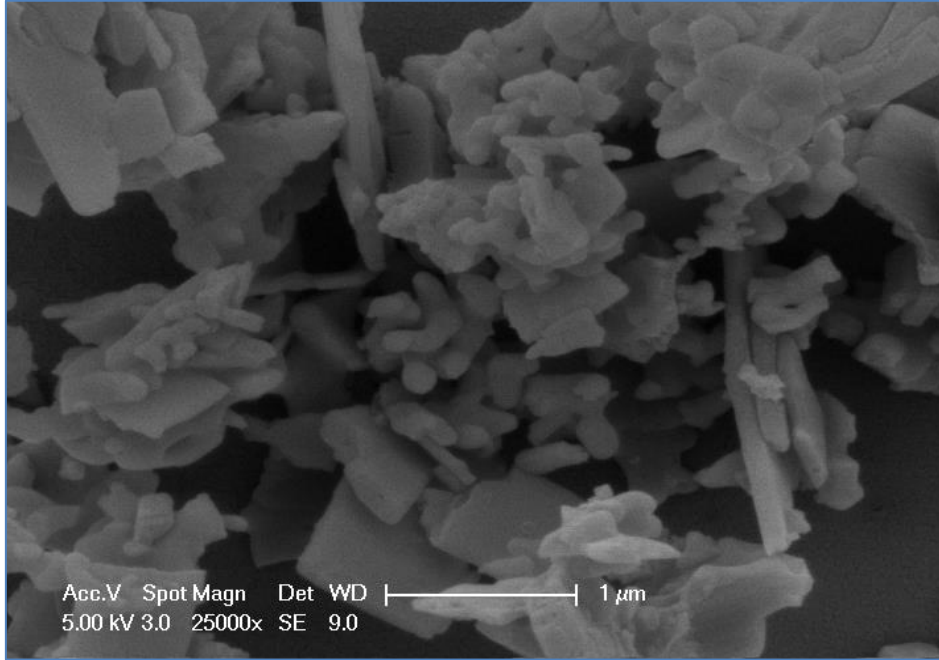
EK 4- Şekil 6

F3- Keratin formülasyonuna ait temas açısı fotoğrafı



EK 5- Şekil 1

Hidroksiapatite ait SEM fotoğrafı (X25.000)



ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında İstanbul’ da doğdu. Ortaokul ve liseyi T.V. Özel Şişli Terakki Lisesi’ nde okudu. 2002 yılında mezun oldu ve aynı yıl Marmara Üniversitesi Kimya bölümünü kazandı. 2006 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Marmara Üniversitesi Mühendislik Yönetimi bölümünde yüksek lisansına başladı. 2008 yılında mezun oldu. 2009 yılı şubat ayında Marmara Üniversitesi Organik Kimya bölümünde doktora programına kabul edildi. Bildiği yabancı diller arasında ileri düzeyden orta düzeye doğru İngilizce, İtalyanca ve Almanca bulunmaktadır. İş hayatına 2008 yılında Eczacıbaşı- Baxter ‘ da Kalite Güvence Uzman Yardımcısı olarak başlamış ve sonrasında sırasıyla GlaxoSmithKline’ da Pazarlama departmanında, Huntsman Tioxide’ da ise Satış Uzmanı olarak çalışmıştır. 2012 yılından bu yana Sisthema-EGM firmasında Teknik Müdür olarak görev almaktadır.

Eserler:

1. 4-Vinylbenzene Boronic Acid–Hydroxy Apatite/Polyvinyl Alcohol Based Nanofiber Scaffold Synthesized by UV-Activated Reactive Electrospinning, International Journal of Polymeric Materials and Biomaterials, D. Yüksel Deniz, M. V. Kahraman, S. Erdem Kuruca, M. Süleymanoğlu, A. Güngör, 64: 14, 2015, 727-732.
2. UV reactive electrospinning human hair keratin / 4-Vinyl Benzene Boronic Acid–Hydroxyapatite / Poly (Vinyl Alcohol) composite” Polymer Composites (2015) DOI 10.1002/pc.23703.

Kongre Bildirimleri:

1. “Advanced Materials World Congress” : Preparation of Hybrid Nanofibers: Characterization and Cell Culture Applications, Poster Sunumu
2. 9th International Materials Technology Conference and Exhibition” :Preparation of Hybrid Nanofibers: Characterization and Cell Culture Applications, Poster Sunumu
3. “ICAMET 2015: 17th International Conference on Advanced Material Engineering and Technology Dubai” : UV-Reactive Electrospinning: Preparation, Characterization and Cell Culture Applications of Nanofiber Scaffolds Containing Keratin, Sözlü Sunum
4. “2015 International Congress on Chemical, Biological and Environmental Sciences” Keratin Containing Nanofiber Scaffolds by Using UV-Reactive Electrospinning, Poster Sunumu

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

Kimyagerler Derneği Marmara Şubesi –Üye