



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOAKTİVASYON SONRASI POLİKAPROLAKTON/İPEK FİBROİNİ ESASLI
NANOFİBERLERİN ZEBRA BALIĞI EMBRİYOLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

GÜZİN GÖKSUN SİVAS

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. TUĞBA TUNALI AKBAY

2021-İSTANBUL

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Güzin Göksun Sivas

İmza

TEŞEKKÜR

Tüm yüksek lisans hayatım boyunca benden yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, bana verdiği destek ve tecrübelerinden faydalanma olanağı sayesinde akademik açıdan gelişmemde yardımcı olan, bu çalışmanın oluşmasını ve katkılarıyla şekillenmesini sağlayan, çalışmayı sabır ve titizlikle takip eden çok değerli hocam **Sayın Prof. Dr. Tuğba Tunalı Akbay’a,**

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan **Prof. Dr. Ayşen Yarat’a, Prof. Dr. Ebru Işık Alturfan’a, Doç. Dr. Şehkar Oktay’a ve Prof. Dr. Azize Şener’e**

Zebra Balığı Araştırma Laboratuvarı imkanlarını kullanmama olanak sağlayan Prof.Dr. Ebru Işık Alturfan’a ve embriyo deneylerinde yardımcı olan başta İsmail Ünal olmak üzere tüm ekibine teşekkür ederim. Çalışmamızda yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım **Begüm Gürel Gökmen, Sümeyye Yılmaz Karaoğlu, Elif Tufan’a** katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve hep yanımda olup bana destek olan sevgili **anneme, babama ve kardeşime** sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
RESİM LİSTESİ	x
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Nanofiberler	6
4.1.1. Nanofiber Üretim Yöntemleri	6
4.1.1.1. Temel Elektro Dokuma	6
4.1.1.2. Eriyik Elektro Dokuma	7
4.1.1.3. Gaz Çeketi Elektro Dokuma.....	7
4.1.1.4. Kabarcık Elektro Dokuma.....	8
4.1.1.5. Manyetik Elektro Dokuma	9
4.1.1.6. Konjugat Elektro Dokuma	9
4.1.1.7. Koaksiyel Elektro Dokuma	10
4.1.1.8. Santrifüj Dokuma	11
4.1.1.9. Islak Çekim Tekniği	11
4.1.1.10. Çizim Tekniği.....	12
4.1.2. Nanofiberlerin Endüstriyel Uygulama Alanları	12
4.2. İmmobilizasyon.....	13
4.2.1. İmmobilizasyon Yöntemleri.....	14
4.2.1.1. Fiziksel İmmobilizasyon	15
4.2.1.1.1. Adsorpsiyon	15
4.2.1.1.2. Tuzak (Kafes).....	16
4.2.1.1.3. Membran hapsedme (Kapsülleme).....	17

4.2.1.2 Kimyasal İmmobilizasyon.....	18
4.2.1.2.1. Çapraz bağlama (Kopolimerizasyon).....	18
4.2.1.2.2. Kovalent bağlanma.....	18
4.2.1. Enzimler ve Endüstriyel Uygulamaları	20
4.2.2. Gıda Endüstrisinde İmmobilize Enzimlerin Kullanımı	21
4.2.3. Laktaz Enzimi ve Endüstriyel Kullanımı	21
4.2.2. Antikorların Endüstriyel Uygulamaları.....	22
4.2.3.İmmobilize Enzim veya Antikor İçeren Biyomalzemeler ve Toksisite Testleri	25
4.2.4. İn vitro Toksisite Değerlendirmesi.....	25
4.3.1.Zebra Balığı ve Embryolarının Toksikoloji Araştırmalarında Kullanımı	27
5. GEREÇ ve YÖNTEM	32
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
5.2. Kullanılan Cihazlar	33
5.3. Yöntem aşamaları.....	34
5.4. PCL/SF esaslı nanofiberin hazırlanması	34
5.5. Polikaprolakton esaslı nanofibere antikor immobilizasyonu	35
5.6. Nanofibere Antikor İmmobilizasyonu	36
5.7. PCL/SF esaslı nanofibere laktaz enziminin immobilizasyonu.....	36
5.8.Nanofibere Enzim İmmobilizasyonu.....	36
5.9. İmmobilize laktaz enzimi ile E3 embriyo ortamında bekletilmesi.....	36
5.10. İmmobilize BPA antikor ile E3 embriyo ortamında bekletilmesi.....	37
5.11. Zebra Balıkları Bakım ve Beslenme Prosedürü	37
5.12. Zebra Balıklarından Embriyo Eldesi.....	38
5.13 Zebra Balığı Embriyoları ile Oluşturulan Gruplar	38
5.14. Kullanılan Tayin Yöntemleri	39
5.14.1. Protein tayini	39
5.14.2. Lipid peroksidasyonu (LPO) tayini.....	41
5.14.3. Total nitrik oksid tayini	42
5.14.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini.....	43
5.14.5. Glutatyon-S-Transferaz (GST) Aktivitesi Tayini.....	44
5.15. İstatistiksel Değerlendirme	

6. BULGULAR.....	46
6.1. Kontrol ve Nanofiber Esaslı Maruziyet Gruplarında (Ham Nanofiber, Laktaz Enzim İmmobilize Nanofiber ve BPA Antikoru İmmobilize Nanofiber Gruplarında) Mortalite Yüzdeleri	46
6.2. Gruplar arasında Kuluçkadan Çıkma Yüzdeleri	47
6.3. Kontrol ve Nanofiber Esaslı Gruplarda Malformasyon Analizi Sonuçlarının Karşılaştırılması	49
6.5. Kontrol ve Nanofiber Esaslı Maruziyet Gruplarında Lipid Peroksidasyon Değerlerinin Karşılaştırılması	51
6.6. Kontrol Grubu ve Nanofiber Esaslı Maruziyet Gruplarının Nitrik Oksit Değerlerinin Karşılaştırılması	52
6.7. Kontrol Grubu ve Nanofiber Esaslı Maruziyet Gruplarının SOD Aktivitelerinin Karşılaştırılması	52
6.8. Kontrol Grubu ve Nanofiber Esaslı Maruziyet Gruplarının Glutasyon S- Transferaz (GST) Aktivitelerinin Karşılaştırılması.....	53
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	55
8.KAYNAKLAR	61

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

BPA: Bisfenol A

CBB: Coomassie Brilliant Blue

CDNB: 1-kloro-2,4-dinitro-benzenin

DCM: Diklorometan

DMF: Dimetilformamid

DTNB: 5-5'-ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit

EDTA-Na: Etilen diamin tetra asetik asit sodyum tuzu

FDA: Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)

GSH: Glutasyon

GST: Glutasyon S- Transferaz

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HCl: Hidroklorik asit

hpf: hours post fertilization, üreme sonrası saat

K: Kör

LPO: Lipit peroksidasyon

MDA: Malodialdehit

N: Numune

Na₂HPO₄.2H₂O: İki sulu disodyum fosfat

NO: Nitrit oksit

PBS: Fosfat tamponu

PCL: Polikaprolakton

SF: Silk Fibroin

SOD: Süper oksit dismutaz

DEHP: Di-2-Etilhekzil ftalat

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1:Eriyik Elektro Dokuma

Şekil 2:Gaz Ceketı Elektro Dokuma

Şekil 3:Kabarcık Elektro Dokuma

Şekil 4:Manyetik Elektro Dokuma

Şekil 5:Konjugat Elektro Dokuma

Şekil 6:Ko-aksiyel Elektro Dokuma

Şekil 7:Islak Çekim Tekniği

Şekil 8:Çizim Tekniği

Şekil 9:Nanofiberlerin kullanım alanları

Şekil 10:İmmobilizasyon Yöntemleri

Şekil 11:Altın Nanopartiküllerine Antikorların Fiziksel Adsorpsiyonu

Şekil 12:Kapsülleme Yöntemi ile İmmobilizasyon

Şekil 13:Kovalent Bağlanma ile İmmobilizasyon

Şekil 14:Enzimlerin Kullanım Alanları

Şekil 15:Antikorların Kullanım Alanları

Şekil 16:Antikor İmmobilizasyon Yöntemleri

Şekil 17:Zebra balığının embryonal gelişim aşamaları

Şekil 18:Embriyo elde etme yöntemi

Şekil 19:Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının 72 hpf sonu mortalite yüzdeleri karşılaştırılması.

Şekil 20:Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının 72, hpf sonu kuluçkadan çıkma yüzdeleri karşılaştırılması

Şekil 21: Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının embriyolarında 24,48 ve 72 hpf'de alınan görüntüler.

Şekil 22:Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının total protein değerlerinin karşılaştırılması.

Şekil 23:Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının MDA değerlerinin karşılaştırılması

Şekil 24:Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının nitrit oksit değerleri

Şekil 25: Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının süperoksit dismutaz aktivitelerinin karşılaştırılması

Şekil 26:Kontrol ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının GST aktiviteleri



TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Adsorpsiyon Yönteminin Avantajları ve Dezavantajları (Roberts ve ark., 2020)

Tablo 2: İmmobilizasyon Tekniklerinin Avantajları ve Dezavantajları (Roberts ve ark., 2020)

Tablo 3: Kullanılan Aletlerin Listesi

Tablo 4: Yöntem aşamaları

Tablo 5: Elektro-dokuma cihazı kullanılarak nanofiber üretim şartları

Tablo 6: Protein Tayin Yöntemi

Tablo 7: Lipid Peroksidasyon Tayini

Tablo 8: Total Nitrik Oksid Tayini

Tablo 9: Süperoksit Dismutaz Tayin Yöntemi

RESİM LİSTESİ

Resim 1: ZEBTEC Mini Akvaryum sistemi



1. ÖZET

Biyoaktivasyon sonrası polikaprolakton/ipek fibroini nanofiberlerin zebra balığı embriyoları üzerine etkilerinin incelenmesi

Öğrenci Adı: Güzin Göksun Sivas

Danışman Adı: Prof. Dr. Tuğba TUNALI AKBAY

Amaç: Çalışmamızın amacı polikaprolakton/ipek fibroini (PCL/İF) esaslı nanofiber hazırlanırken kullanılan çözücülerin ve antikoru, enzim immobilizasyonu gibi işlemler sırasında kullanılan kimyasal maddelerin toksik etkisi olup olmadığını ve ayrıca oksidatif hasar oluşturma potansiyalinin zebra balığı embriyo modeli kullanılarak tespit etmektir.

Gereç ve yöntem: Elektro dokuma yöntemi ile hazırlanan PCL/İF esaslı nanofibere laktaz enzimi ve BPA antikoru immobilize edilmiştir. Zebra balığı embriyoları kontrol, ham nanofiber, laktaz enzimi immobilize edilmiş nanofiber, bisfenol a (BPA) antikoru immobilize edilmiş nanofiber olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Nanofiber esaslı maruziyet gruplarında, ilgili nanofiberler ayrı ayrı embriyoların gelişme ortamına bırakılıp belirli süre bu ortamda bekletilmiştir. Daha sonra embriyolar bu ortamların içerisinde gelişmeye bırakılıp 72 saat süre ile gelişmeleri izlenmiştir. 72 saatin sonunda tüm gruptaki 100 adet embriyo, 1 mL serum fizyolojik ile homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlara biyokimyasal analizler uygulanmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda Ham nanofiber ve Laktaz immobilize edilen nanofiberin mortalite ve kuluçkadan çıkış yüzdeleri 24, 48, 72 hpf 'de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. BPA antikoru immobilize edilen nanofiber 10 saat süre ile E3 ortamında bekletildikten sonra ortama bırakılan embriyoların hepsi 24 hpf sonunda ölüirken, 1 saat süre ile E3 ortamında bekletilen BPA antikoru immobilize edilen nanofiber grubunda ise 24, 48 ve 72 hpf'de mortalite ve kuluçkadan çıkış yüzdeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir.

Sonuç: Hazırladığımız biyomalzemelerin toksikolojik etkisinin olup olmadığı deney hayvanı kullanımına gerek kalmadan zebra balığı embriyoları kullanılarak tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Nanofiber, zebra balığı, toksisite, polikaprolakton, ipek fibroin.

2. SUMMARY

Investigation of the effects of polycaprolactone/silk fibroin based nanofibers on zebrafish embryos after bioactivation

Student Name: Güzin Göksun Sivas

Name of Supervisor: Prof. DR. Tuğba TUNALI AKBAY

Objective: The purpose of our study is to determine whether the solvents used in the preparation of PCL/silk fibroin-based nanofibers and the chemicals used during processes such as antibody and enzyme immobilization may have toxic effects, and also to determine the oxidative damage potential by using a zebrafish embryo model.

Material and Methods: Lactase enzyme and BPA antibody were immobilized on PCL / SF based nanofibers prepared by electrospinning. Zebrafish embryos were divided into four groups: control, raw nanofiber, lactase enzyme immobilized nanofiber, and bisphenol a antibody immobilized nanofiber. Nanofiber-based exposure groups contained the relevant nanofibers separately in the embryonic development environment and kept in this environment for a period of time. Subsequently, the embryos were left to these develop environments for 72 hours, they were homogenized with 1 mL of physiological saline and homogenates were then analyzed using biochemical methods.

Results: In our study, compared to the control group, there were no statistically significant differences in mortality and hatching percentages of raw nanofibers and lactase immobilized nanofibers at 24, 48, and 72 hpf. Nanofiber immobilized with BPA antibody was left in E3 medium for 10 hours, but all of the embryos left in the development environment died at 24 hpf. Compared with control group and the nanofiber immobilized with BPA antibody no statistically significant difference was observed.

Conclusion: Instead of using experimental animals, we used zebrafish embryos to study the toxicological effects of our biomaterials.

Keywords: Nanofiber, zebrafish, toxicology, polycaprolactone, silk fibroine.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

İmmobilizasyon tekniğinin kullanıldığı teknolojik sistemlerde tıp, kimya, biyoloji, mühendislik alanlarını içine alan multidisipliner çalışma olanakları ortaya çıkmaktadır. Günümüzde enzim, antikor ve hücre immobilizasyonu teknikleri biyoteknolojide sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Makaraviciute ve Ramanaviciene, 2013). Biyolojik olarak fonksiyonel olan bir molekülün veya hücrenin, taşıyıcı bir yüzey üzerinde sabitlendiği immobilizasyon yönteminde, immobilize kompleks yapı fiziksel olarak taşıyıcı yüzeyin özelliğini taşır ve immobilize edilen molekülün veya hücrenin temel aktivitesine sahip olur. İmmobilizasyon sonrası taşıyıcı yüzeye tutunan molekülün veya hücrenin yapısı veya karakteristiği değişime uğramamaktadır. Çalışmamızda kullanacağımız kovalent bağlama yöntemi protein yapılı molekül ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu molekülün immobilizasyonu için oldukça sık kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem enzimin veya antikorun suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent bağlanmasına dayanmaktadır. Genellikle bağlanma, enzim veya antikorun nükleofilik grubuyla taşıyıcının fonksiyonel grubu arasında gerçekleşmektedir. Bağlanmada rol alan fonksiyonel gruplar; amino grubu (NH_2), karboksil grubu (CO_2H), sülfhidril grubu (SH), hidroksil grubu (OH), imidazol grubu, fenolik grup, tiyol grubu, treonin grubu ve indol grubudur (Uhlig, 1998). Kovalent bağlanmada immobilize edilecek molekül ve taşıyıcı arasındaki bağlar diğer immobilizasyon yöntemlerine göre daha kuvvetlidir. Bu teknik enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiye geçmesini engeller (Carr ve Bowers, 1980). Ayrıca enzim veya antikor taşıyıcının üzerine tutturulmuş olduğundan, immobilize edilmiş molekül substratla çok kolay bağlantı kurabilir.

Çalışmamızda taşıyıcı yüzey olarak kullandığımız polikaprolakton (PCL) ve ipek fibroini esaslı nanofiber elektro dokuma yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. PCL, yüksek biyoyumluluğa sahip olması ve biyobozunur olması nedeniyle biyomedikal malzemelerin üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır (Woodruff ve Hutmacher, 2010). Çalışmamızda kullandığımız hibrid nanofiberin ikinci polimeri olan ipek fibroini, lif yapısında bir protein olup üstün malzeme özelliklerinin yanı sıra biyoyumluluğu,

biyobozunurluğu, yüksek derecede dayanıklı ve tok oluğu, kolaylıkla işlenebilirliği ile öne çıkan bir malzemedir. İpek fibroin biyomedikal malzeme olarak hücre kültürü, yara örtüsü ve ilaç salınımı çalışmalarında, enzim immobilizasyonunda destek materyali ve kemik hücre mühendisliğinde iskelet olarak kullanım alanı bulmaktadır (Hardy ve ark., 2008, Vollrath ve Porter , 2009).

Canlı organizma hücrelerinde kimyasal maddelere maruz kalma nedeniyle önemli yapı ve fonksiyon değışikliklerinin tespit edilmesi ve yorumlanması amacıyla deneysel toksikolojik araştırmalar yapılmaktadır (Loomis, 1978). Her ne kadar PCL ve fibroin polimerlerinin kullanımının tıbbi malzeme üretimi için uygun olduğu belirtilse de hibrid polimerin hazırlanması sırasında kullanılan çözücüler ve nanofiber üretiminde kullanılan elektro dokuma işleminin nanofiber yapıda bir toksik veya oksidan bir etkisi olup olmadığının kullanıma geçmeden tespit edilmesi gerekmektedir. Toksikolojik testler günümüzde deney hayvanları kullanılarak yapılmaktadır. Bu test türünde toksik maddelerin canlıların gelişimine gösterdiği etki incelenmektedir (Ünsal, 1998). Zebra balıkları dayanıklı bir tür olmaları, kolay bulunmaları, laboratuvar ortamında yumurta bırakabilmeleri, kolay beslenebilmeleri ve çoğalmaları, ergin dişilerin haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakabilmeleri, dış döllenme ile üremeleri, yumurta ve embriyolarının saydam oluğu, yumurta ve larvaların gelişimlerinin kolay izlenebilmesi, jenerasyon zamanlarının kısa olması, insan ve diğer omurgalıların genom yapılarının benzer oluğu, metabolizma ve embriyonik gelişimlerinin hemen hemen aynı olması nedeniyle toksikoloji çalışmalarında en sık kullanılan model organizmalardan biridir (Atasayar, 2011).

Bu bilgilerin ışığında, çalışmamızın amacı, PCL/ipek fibroini esaslı nanofiber elde etmek, elde edilen nanofibere antikor veya enzim immobilize ederek sonrasında elde edilen biyoaktif nanofiberin toksikolojik ve oksidatif özellikleri zebra balığı embriyoları kullanılarak belirlemektir. Böylece nanofiber esaslı tıbbi malzemelerin kullanıma yönelik uygunluğu için bir yol belirlenmiş olacaktır. Nanofiberlerin toksikolojik testlerinin zebra balığı embriyoları kullanılarak yapılması, hem araştırmalara hem de biyomalzeme üretimine yönelik yeni bir test metodu geliştirilmesine zemin hazırlamaktadır. Bu nedenle, zebra balığı embriyoları yalnızca

yetişkin balıklarla yapılan deneyler için değil, aynı zamanda memeli türleri ile yapılan deneyler için de bir alternatif olarak hizmet edebileceğinden, zebra balığı modelinin klinik araştırmalarda kullanımı desteklenmelidir.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Nanofiberler

Günümüzde nano boyutlu malzemelerin çeşitli uygulamalara yönelik olarak kullanımı nanoteknoloji alanındaki gelişmeler sayesinde ortaya çıkmıştır. Nanofiberler benzersiz mekanik, elektriksel ve kimyasal özellikleri ile gelişmiş nano boyutlu malzemeler arasında yer almaktadırlar. Nanofiberlerin farklı üretim yöntemlerinin geliştirilmesi ve bu yöntemlerin spesifik uygulamaya göre kullanılması uygulamanın başarısı için oldukça önemlidir (Sabraa ve ark., 2020).

4.1.1. Nanofiber Üretim Yöntemleri

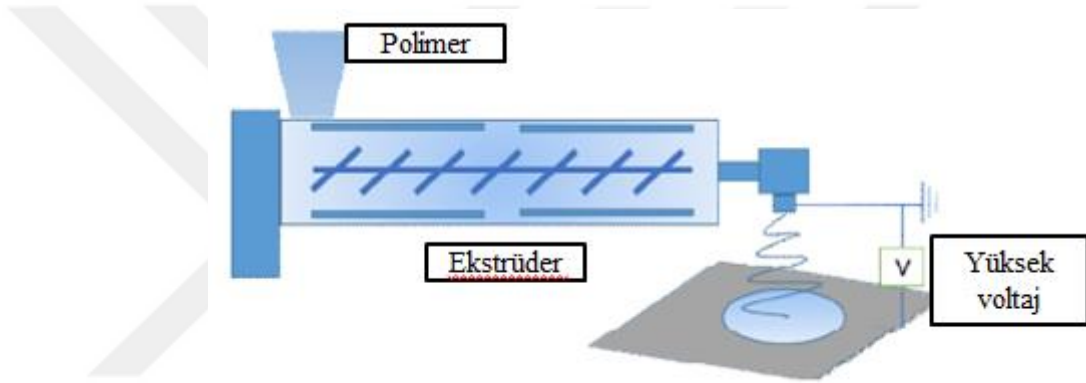
4.1.1.1. Temel Elektro Dokuma

Temel elektro dokuma yöntemi ile nanometre aralığına kadar boyut kontrollü fiberler üretilmektedir. Polimer çözeltisi, dar bir iğne veya nozül (elektrot) aracılığı ile 20-100 kV arasında yüksek voltaj alanına gönderilir. Genel olarak, tipik laboratuvar kurulumunda elektrottan toplayıcıya olan mesafe 10-25 cm'dir. Elektro dokuma işlemi sırasında akım nanoamperden mikroampere değişir. (Greiner ve Wendorff., 2007).

Bir elektrota yüksek voltaj uygulandığı zaman, toplayıcı ile elektrot arasında bir elektrik alanı oluşur. Kritik voltaj değerinden sonra elektrostatik kuvvet yüzey gerilimini yener ve yüklü polimer çözeltisi nozül veya iğne ucundan ayrılmaya zorlanır. Polimer çözeltisi elektrostatik kuvvet nedeniyle bir uzama ve kararsızlık fazından geçer. Aynı zamanda, çözücü buharlaşır ve katılaşma gerçekleşerek toplayıcının yüzeyinde birbirine bağlı bir fiber (lif) tabakası oluşur. Eriyik durumunda, püskürtülen polimer çözeltisi havada hareket ederken katılaşır (Patanaik ve ark., 2007).

4.1.1.2. Eriyik Elektro Dokuma

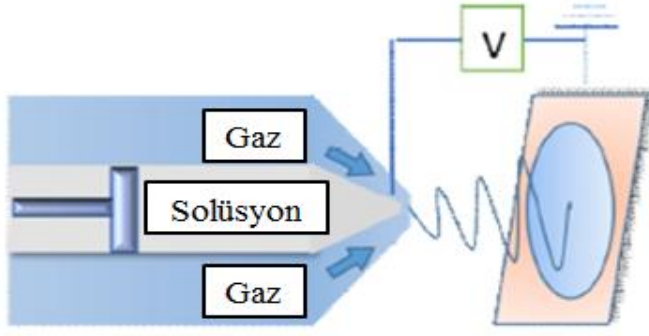
Bir nozüle yüksek voltaj uygulandığında koni oluşur. Kritik voltajda elektro statik kuvvetler yüzey gerilimini yener. Viskoelastik davranış sayesinde, küçük deliklerden ince bir lfiberin çekilmesi gerçekleşir. (Lyons ve ark., 2004). Eriyik elektro dokumada, polimerin erimiş halde kalması için polimer çözeltisini içeren hazneye sabit bir ısı beslemesi olmalıdır. Nozülden toplayıcıya olan mesafe tipik olarak temel elektro dokumadan daha kısadır. Polimer erimiş halde olduğu için başlatma için daha fazla yük gerekir (Lyons ve ark., 2004). Şekil 1, tipik eriyik elektro dokuma tasarımını göstermektedir.



Şekil 1: Eriyik Elektro Dokuma (Lyons ve ark., 2004)

4.1.1.3. Gaz Ceketi Elektro Dokuma

Çözeltinin aşırı yüzey gerilimi veya yüksek viskozite sahip olduğu durumlarda, elektro statik kuvvet, nanolif üretmek için çözeltiyi germek için tek başına yeterli olmayabilir. Kolay buharlaşan çözücüler tercih edilirse, çevreye maruz kalma ve çözücünün hızlı buharlaşması çözeltinin dönmesini zorlaştırabilir (Larsen ve ark., 2004).

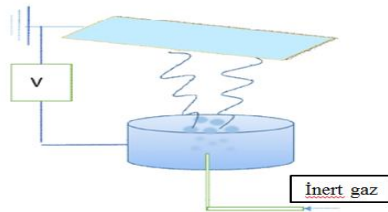


Şekil 2: Gaz Ceketi Elektro Dokuma (Teo ve ark., 2011)

Bu nedenle, Şekil 2'de gösterildiği gibi, döndürmeyi başlatmak için, püskürtme nozulünün ucunda, çözeltiye çarpan ve bir gerdirme kuvvetini devreye sokan bir gaz ceketi kullanılır. Örneğin yüksek viskoziteye sahip hiyaluronik asit bu sistemde elektro dokuma yönteminde kullanılabilir. Yüksek sıcaklık çözeltinin viskozitesinin düşmesine neden olduğu için fiber üretimi, ısıtılmış bir gaz kullanılarak ilerletilir (Um ve ark., 2004). Soy gaz, havuzdan alınarak gaz akışını stabilize eden tampon hazneden geçirilir. Gaz akışı ayrıca, enjektör tarafından bir kılcal damara yavaşça enjekte edilen ve belirli bir uzunlukta bir kılcal damar içinden akan polimer çözeltisinin gerilmesine de katkıda bulunur. Gaz elektro-dokuma işleminde, yüksek voltajlı anota bağlı olan nozülünden belirli bir konsantrasyondaki polimer çözeltisi çıkarılır. Ayrıca elektro üfleme tekniği de aynı üretim yöntemi olarak kabul edilebilir (Teo ve ark., 2011).

4.1.1.4. Kabarcık Elektro Dokuma

Kabarcık elektro dokuma tekniği yüzey gerilimini en aza indirmek için tasarlanmıştır. Bu yeni sistem, gaz tüplü dikey bir çözelti rezervuarı içerir. Tüpün ortasına sabitlenmiş bir metal elektrot ile alttan besler. Topraklanmış bir toplayıcı rezervuarın üzerine monte edilir (Şekil 3).

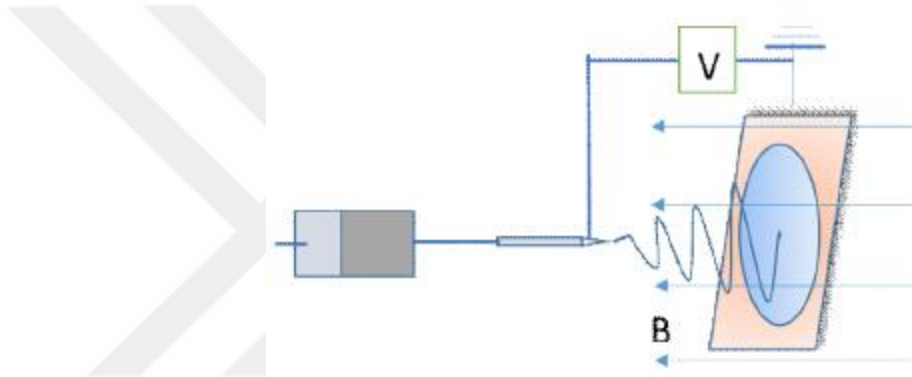


Şekil 3: Kabarcık Elektro Dokuma (He, 2008)

Bu elektro dokuma yönteminin mekanizması oldukça basittir. Elektrik alan havalandırma sistemi yüzeyinde çeşitli kabarcıklar üretir ve kabarcık yüzeyine yükler indükler. Yüzey yükü ve harici elektrik bağlantısı alan teğetsel bir stres yaratır, bu da küçük kabarcıkların çıkıntıya dönüşmesine neden olur (He, 2008).

4.1.1.5. Manyetik Elektro Dokuma

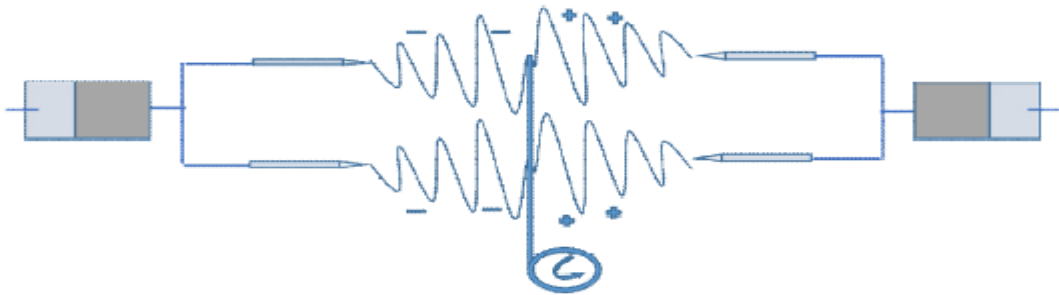
Elektro dokuma işleminde amper kuvveti üreterek bir manyetik alan kullanılır. Bir manyetik alan uygulanırsa, manyetik elektro dokuma yöntemi gerçekleştirilir (Şekil 4) (He, 2005).



Şekil 4: Manyetik Elektro Dokuma (He, 2005)

4.1.1.6. Konjugat Elektro Dokuma

Konjugat elektro dokumada kullanılan sistem Şekil 5'da gösterilmiştir. Zıt kutuplu iki veya üç yüksek voltajlı güç kaynağı, iki veya üç memecik ve bir alıcı tamburdan oluşur (Şekil 5).



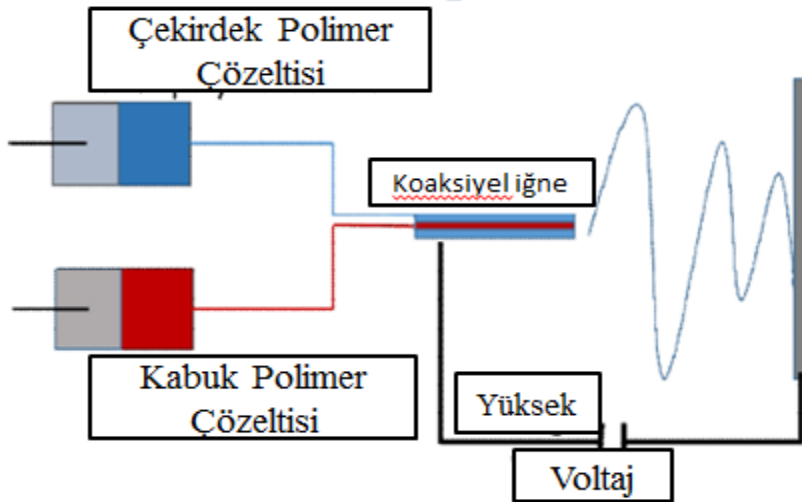
Şekil 5: Konjugat Elektro Dokuma (Li X ve ark., 2008)

Çözeltilerin dağıtım hızını kontrol etmek için iki veya üç programlanabilir pompa kullanılır.

Güç kaynakları sırasıyla iplik nozülle bağlanır. Spinneretler aynı yatay çizgi üzerinde zıt konumlarda düzenlenmiştir. Nozüller arası mesafe ayarlanabilir olarak tasarlanmıştır. Çözelti, şırıngalarla iki veya üç nozüle ayrı ayrı verilir. Alıcı, kademeli bir motor tarafından kontrol edilen dönen bir tamburdur. İki veya üç zıt yüklü elektro dokuma düzesinden gelen lifler, tambur alıcısı tarafından sabit bir hızla toplanır ve gerilir. Bu teknikle üretilen nanofiber iplikler, oda sıcaklığında vakum altında kurutulur (Li X ve ark., 2008).

4.1.1.7. Koaksiyel Elektro Dokuma

Koaksiyel elektrodokuma tekniğinde iki sıvı, polimer çözeltisi nozüllerden uzaklaşır (Şekil 6).



Şekil 6: Ko-aksiyel Elektro Dokuma (Wu ve ark., 2007)

Sıvılar birbirleriyle sadece koaksiyel iğne veya kapiler ucunda temas eder. Dokuma işlemi sırasında çözücüler buharlaşır ve bileşik jet katılaşır. Bu katılaşmanın bir sonucu olarak, çekirdek-kabuk nanofiber üretilir. Bu teknikte, polimer çözeltilerinin karışmasını önlemek oldukça önemlidir. Bu teknikle, çekirdek-kabuk nanofiber elde etmek için temel elektro dokuma ile yapılamayan polimer tercih edilir. Bu tip liflerin mikroelektronik, optik ve tıpta potansiyel uygulamaları vardır. Ayrıca, polimer nanotüpler üretilir (Wu ve ark., 2007).

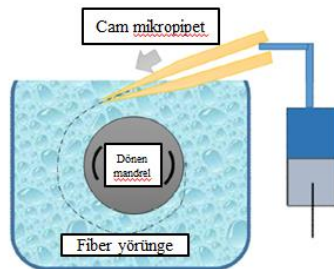
4.1.1.8. Santrifüj Dokuma

Bu yöntem elektrik yükü yerine bir polimer çözeltisinin tipik bir çözelti üzerine damlatılması sayesinde gerçekleşir. Bu dokuma prosedürü, içi boş polimer boncuklar elde etmek ve farklı polimer türlerine uygulanabilir olmak gibi teknolojik olarak ilgili birçok fırsat sunmaktadır.

Sıvı malzeme içeren bir hazneye sahip bir nozül, yüksek devirde bir eksen üzerinde santrifüj olarak döndürülür. Döze dönerken, sıvı malzeme bir delik vasıtasıyla dış duvara itilir. Bu süreçte merkezkaç ve hidrostatik kuvvetler birlikte etkilidir (Weitz ve ark., 2008).

4.1.1.9. Islak Çekim Tekniği

Bu teknik, 10 mikrondan 400 nanometreye kadar çap aralığında polimer nanolifler üretebilen geleneksel ve ticari bir yöntemdir. Çok küçük bir açıklıktan hareket eden ve oldukça viskoz bir ortama geçen bir polimer çözeltisi öncüsünün enjeksiyonu yoluyla gerçekleşir (Şekil 7).



Şekil 7: Islak Çekim Tekniği (Gorantla M ve ark., 2006)

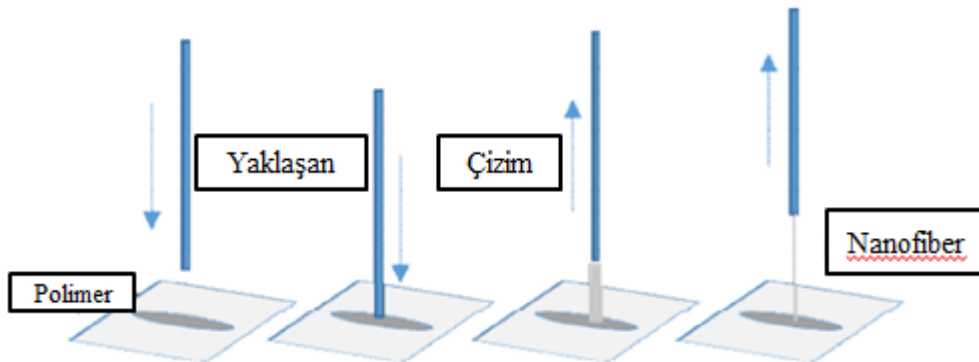
Ortam, dönen mandrel tarafından hareket ettirilir ve mandrel nanofiberi çeker. Ekstrüzyon ucu uygun şekilde konumlandırılırsa, ekstrüde edilen fiber spiral bir yörüngede hareket eder ve mandrel etrafında sürekli olarak biriktirilerek polimer viskoz ortamda katılaşır.

Bu modifiye edilmiş ıslak çekim tekniği, başka herhangi bir yöntemle "spinnable" olarak kabul edilebilecek lifleri döndürebilir. Ayrıca bu işlemde düşük viskoziteli bazı malzemeler kullanılabilir (Gorantla M ve ark., 2006).

4.1.1.10. Çizim Tekniği

Çizim tekniği, basit ve uygun maliyetli fotonik tel üretimi sağlar. 60 nm çapa ve 500 mm uzunluğa kadar nanofiberler üretilebilir. Şekil 8’de gösterildiği gibi çekme işlemi uygulanır. 0.1–1 m/s hızında geri çekilir.

Uzatılmış fiber teli havada hızla soğutulur ve sonunda kaplanmamış amorf bir nanofiber oluşturulur. Bu teknikle üretilen lifler sadece düşük optik kayıplar göstermekle kalmaz, aynı zamanda iyi bir esneklik sunar (Xing X ve ark., 2008).

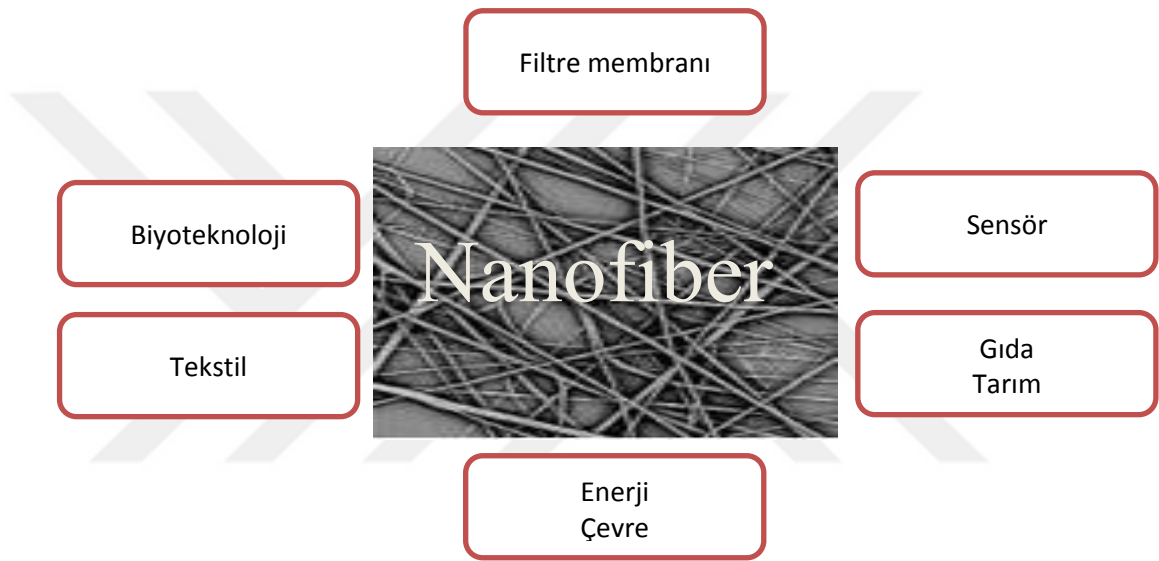


Şekil 8: Çizim Tekniği (Xing X ve ark., 2008)

4.1.2. Nanofiberlerin Endüstriyel Uygulama Alanları

Nanofiberler günümüzde biyomedikal, farmasötik ve enerji uygulamalarında kullanılan nanoteknolojik ürünlerdir. Doğal veya sentetik polimerler kullanılarak

üretirler. Hiyaluronik asit, kitosan, kondroitin sülfat, kollajen, ipek fibroin ve nişasta gibi doğal polimerlerin çoğu biyolojik olarak parçalanabilen nanofiberlerin üretiminde kullanılmaktadır. Bu polimerler ayrıca biyouyumlu olmaları nedeniyle biyomedikal ve ilaç salınımı uygulamalarında da kullanılmaktadır. Nanofiberler, yara pansumanlarının ve rejeneratif tıbbın üretimine yönelik aktif farmasötik ürünlerin kontrollü ve hedefle yönelik uygulanması için potansiyel taşıyıcılar olarak da kullanılabilmektedir (Sridhar ve ark., 2015). Şekil 9 nanofiberlerin kullanım alanlarını göstermektedir.



Şekil 9: Nanofiberlerin kullanım alanları (Sabraa ve ark., 2020)

4.2. İmmobilizasyon

İmmobilizasyon, kararlılığı, etkinliği ve yeniden kullanımı artırmak için molekülleri bir matrise (destek materyali) sabitleme tekniğidir. İmmobilizasyon yönteminin başarısı, kararlı ve uygun bir hareketsizleştirme sağlamak için immobilize edilecek molekülün ve matrisin uygun olmasına bağlıdır. İmmobilizasyon yöntemi, immobilize edilen molekülün geri dönüşümünü artırmak, immobilize edilen molekülü saflaştırmak ve işlemlerin kontrolü amacıyla kullanılmaktadır.

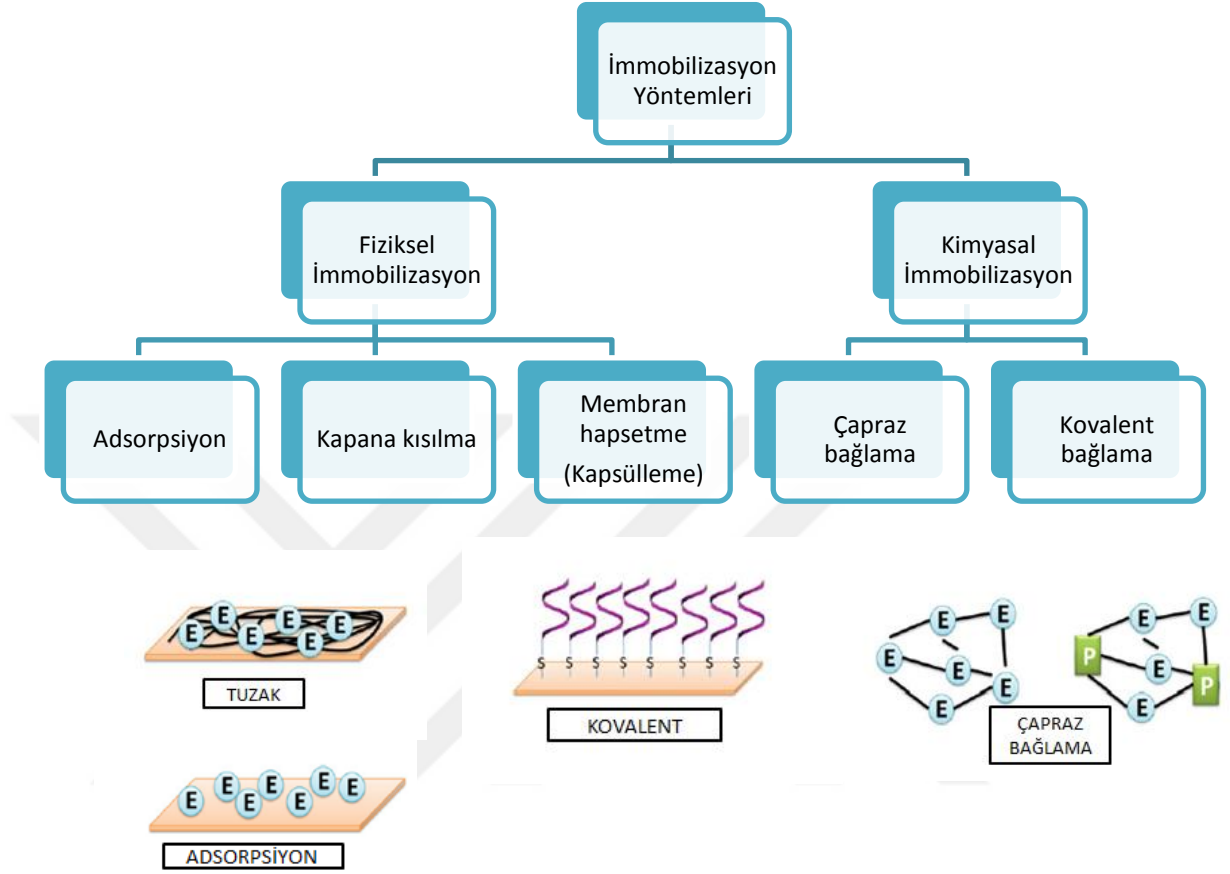
Bu yöntemin kullanımı toksikoloji (zehirlerin tespiti), kirlilik kontrolü (pestisit / insektisit / herbisit tespiti) (Wijaya ve ark., 2010; Ramansuri ve ark., 2009), narkotik

ilaç tespiti (Gandhi ve ark., 2015; Tey ve ark., 2010; Mishra ve ark., 2018) ve gıda ve sularda ağır metal içeriği kontrolü (mikroorganizmaların, ağır metallerin ve böcek ilaçlarının tespiti / böcek öldürücüler / herbisitler) (Raman Suri ve ark., 2008; Sharma ve ark., 2010) gibi alanlarda hızla artmaktadır. Adli tıpta da uygulanan immobilizasyon işlemlerine dayalı teknikler r kanıtların hızlı ve daha ekonomik bir şekilde analiz edilmesi amacıyla kullanılmaktadır.

İmmobilize edilen molekül stabilitesini kaybetmeden yeniden kullanılabilmesine olanak sağladığı için immobilizasyon teknikleri ekonomiktir. İmmobilizasyon işleminin amacı ne olursa olsun, hedefe ulaşmak için, immobilizasyon hazırlama yönteminin uygunluğu, bmmobilize edilecek molekül ve immobilizasyonun yapılacağı destek materyalinin yapısal özellikleri belirleyici faktörlerdir (Homaei ve ark., 2013).

4.2.1. İmmobilizasyon Yöntemleri

Her bir immobilizasyon tekniği, molekülün ve matris fizikokimyasal özelliklerine dayanır. (Datta ve ark., 2013). İmmobilizasyon işlemlerinde kullanılan fiziksel ve kimyasal yöntemler Şekil 10'da görülmektedir.



Şekil 10: İmmobilizasyon Yöntemleri (Roberts ve ark., 2020)

4.2.1.1. Fiziksel İmmobilizasyon

4.2.1.1.1. Adsorpsiyon

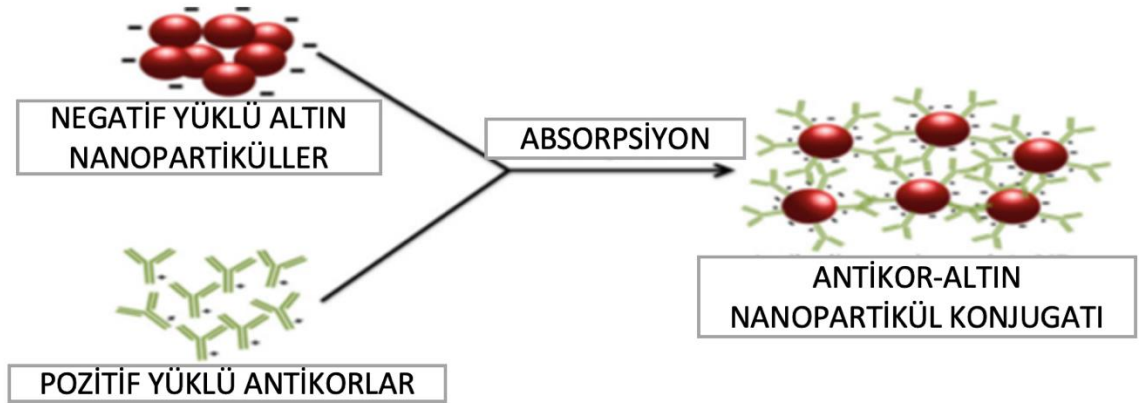
Molekülün matrise bağlanmasına dayanan en basit immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Bu yöntem esas olarak hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri ve iyonik etkileşimler gibi düşük enerjili bağları içerir. Bu yöntemde, moleküller fiziksel olarak matris yüzeyine adsorbe edilir. Aktif karbon, gözenekli cam, nişasta, dekstrin, selüloz ve kitosan, hareketsizleştirme için kullanılan matris örneklerinden bazılarıdır. Adsorpsiyon için ideal taşıyıcı, iyon değişim matrisleri, cam elyafı, gözenekli karbon, polimerik aromatik reçine ve sulu metal oksit gibi çözünmez maddelerdir.

Geri dönüşümlü bir immobilizasyon yöntemidir ve diğer yöntemlere göre nispeten daha zayıftır. Adsorpsiyon yönteminin avantajları ve dezavantajları Tablo1’de gösterilmiştir.

Tablo 1: Adsorpsiyon Yönteminin Avantajları ve Dezavantajları (Roberts ve ark., 2020)

Adsorpsiyon Yönteminin Avantajları	Adsorpsiyon Yönteminin Dezavantajları
• Kolay kullanım • Uygun maliyet • İmmobilize edilecek molekülün değişmeyen konformasyonu	• Sıcaklık, pH, iyonik güçteki değişimden etkilenir • Taşıyıcı partikül boyutunun küçük olması (0-1mm)

Altın nanopartikülleri (AuNP) üzerine antikorların immobilizasyonu fiziksel adsorpsiyonun örneklerinden biridir. Antikorlardaki pozitif yüklü gruplar, AuNP’lerin negatif yüklü yüzeyiyle etkileşime girerek kovalent olmayan iyonik veya hidrofobik bağlarla AuNP’lerin yüzeyine bağlanarak immobilize olurlar (Şekil 11).



Şekil 11: Altın Nanopartiküllerine Antikorların Fiziksel Adsorpsiyonu (Roberts ve ark., 2020)

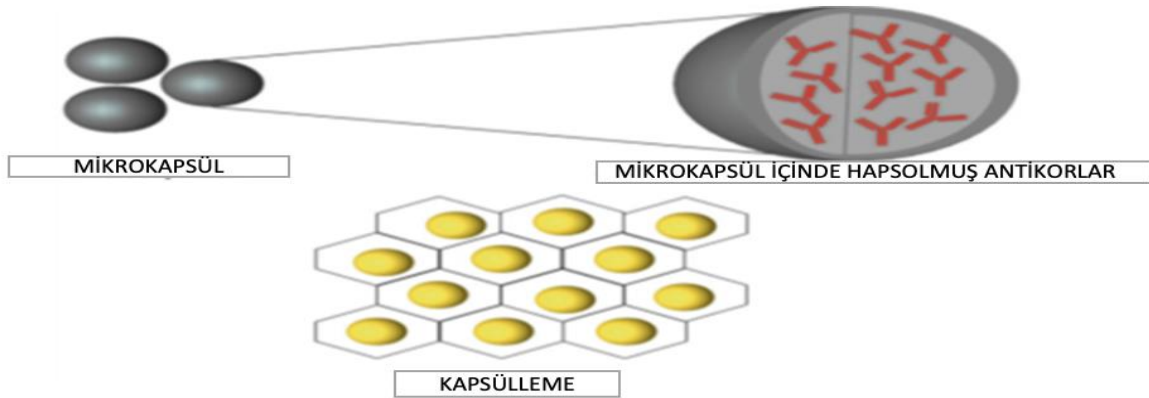
4.2.1.1.2. Tuzak (Kafes)

Moleküllerin bir polimerin içine hapsedildiği immobilizasyon tekniklerine genellikle tuzak kurma teknikleri denir. Bu immobilizasyon yöntemi, molekülü bir fiber

üzerinde veya bir jel içinde tutmak için kullanılır. Moleküllerin matrise bağlandığı diğer yöntemlerin aksine, moleküllerin birbirine bağlandığı kafes tipinde bir immobilizasyon yöntemidir. Hem kovalent hem de kovalent olmayan bağlardan oluşur. Molekülü çevreleyen matris, agar, jelatin, poliakrilamid, aljinat gibi matrisler olup genellikle hidrofilik özelliktedirler (Hassan ve ark., 2016). Nanofiberlerde kullanılan bu yöntem sayesinde kimya, biyosensör, biyoyakıt ve biyotıp alanında yeni uygulamalar geliştirilmektedir (Datta ve ark., 2013). Geri dönüşü olmayan bir immobilizasyon işlemidir, ayrıca immobilize edilen moleküle mekanik güç de sağlar. Moleküller, çapraz bağlı polimerler arasındaki ara boşlukta tutulur.

4.2.1.1.3. Membran hapsetme (Kapsülleme)

Bu immobilizasyon yönteminde moleküller yarı geçirgen bir polimer zar içine alınırlar (Nguyen 2017). Şekil 12'de antikorların kapsül içinde hapsediği boşluk gösterilmektedir. (Hemalatha ve ark. 2016). Mikrokapsüller oluşturmak için kullanılan çeşitli malzemeler (naylon ve selüloz nitrat) gibi 10–100 µm çap aralığındadır. Moleküller yarı geçirgen zara difüzyon yoluyla girerler. Bu yöntemin sakıncalarından biri, reaksiyondan çıkan ürünler hızla biriktiğinde, çok fazla molekülün difüzyonuna (kapasiteden fazla) bağlı olarak kapsülleme zarının yırtılma olasılığıdır. (Hassan ve ark., 2016).



Şekil 12: Kapsülleme Yöntemi ile İmmobilizasyon (Roberts ve ark., 2020)

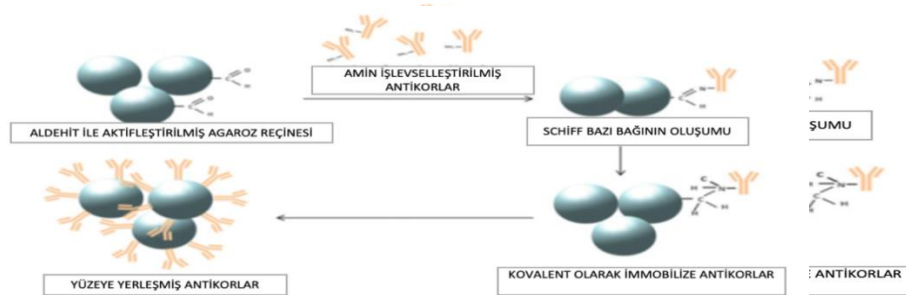
4.2.1.2 Kimyasal İmmobilizasyon

4.2.1.2.1. Çapraz bağlama (Kopolimerizasyon)

Çapraz bağlama yöntemi aynı zamanda genel olarak kopolimerizasyon olarak da adlandırılır. Küçük moleküller aralarında bağlar oluşturarak suda çözünmeyen kompleks bileşikler oluşturur. Bu immobilizasyon yöntemi proteinlerin ve kullanılan çözeltilerin konsantrasyonuna, ortamın pH'ına ve immobilize edilecek molekül ile direkt ilişkilidir. Çapraz bağlanma için glutaraldehit, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, gibi çapraz bağlayıcılar kullanılmaktadır (Nguyen 2017).

4.2.1.2.2. Kovalent bağlanma

Bu yöntemde, immobilizasyonun etkinliği immobilize edilecek olan molekülün fonksiyonel grubuna bağlıdır. Mezo-gözenekli silika ve kitosan gibi destek malzemeleri, immobilize edilecek moleküllerin yarı ömrünü ve stabilitesini artırır. Bu immobilizasyon yöntemi, stabilite ve yeniden kullanılabilirlik özelliği nedeniyle ilaç endüstrisi alanında kullanılmaktadır. Bu yöntem iyi bir stabilite, yüksek bağlanma gücü ve uzun bir süre kullanılabilirlik sağlamaktadır (Hassan ve ark., 2016). Bu yöntemde, desteğin fonksiyonel grubunun aktive olması gerekmektedir. Şekil 13'te gösterildiği gibi kovalent bağlanma verimliliğini artırmak için destek modifiye edilir. Şekil 13'te agaroz boncuk (destek), aldehit aktivasyonu kullanılarak modifiye edilmiş ve amin ligand içeren antikor immobilize edilmiştir. Bu immobilizasyon yöntemi, imalat için kimyasal modifikasyon gerektirir. Genellikle bu tür etkileşimde kullanılan matrisler selüloz ve mikro-gözenekli camdır.



Şekil 13: Kovalent Bağlanma ile İmmobilizasyon (Roberts ve ark., 2020)

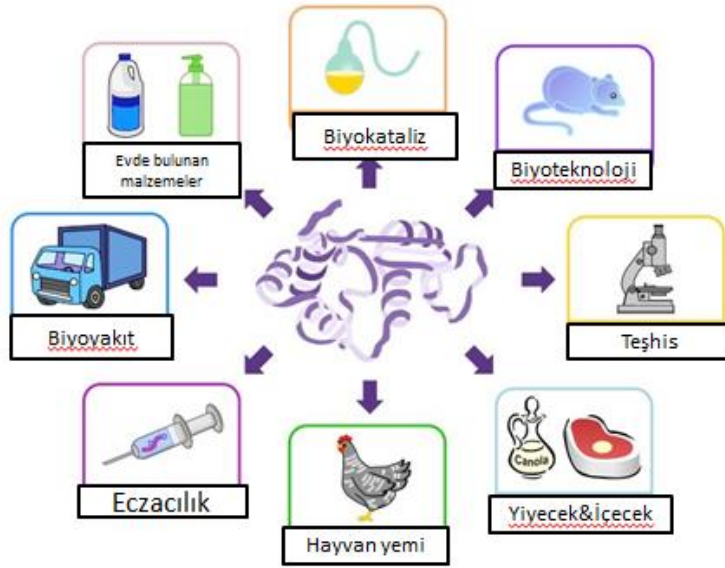
Çeşitli immobilizasyon tekniklerinin avantajları ve dezavantajları Tablo 2’de sunulmuştur.

Tablo 2: İmmobilizasyon Tekniklerinin Avantajları ve Dezavantajları (Roberts ve ark., 2020)

İmmobilizasyon Tekniği	Etkileşim	Avantajı	Dezavantajı
Adsorpsiyon	- Hidrofobik - Elektrostatik etkileşim - Van Der Walls kuvveti	- Uygun maliyet - Hızlı - Basit metot	- Kararsız - Çok zayıf bağ - pH -Sıcaklık ile değişmeye yatkındır.
Kovalent bağlanma	Kovalent bağlanma	- Kararlılık, - Yüksek bağlama gücü	-Önce modifikasyona ihtiyacı olabilir. -Geri dönüşümsüz -Pahalı -Toksik kimyasal içerebilir
Tuzak/ Mikrokapsülleme	Kitosan, akrilamid gibi polimerler içinde moleküllerin yakalanması veya kafeslenmesi	Kararlılık	Bağlanma veriminde azalma
Çapraz bağlama (Kopolimerizasyon)	Fonksiyonel reaktan ile çapraz bağlanmış moleküller	Sızıntı ve desorpsiyonu önler	-Aktif bölgede değişiklik -Aktivite kaybı

4.2.1. Enzimler ve Endüstriyel Uygulamaları

Enzimler, canlı bir organizmada meydana gelen kimyasal işlemlerin çoğunu gerçekleştiren katalizörlerdir. Günümüzde, enzimlerin uygun koşullar altında işlenebilirlik, yüksek seçicilik ve biyolojik olarak parçalanabilirlik özelliklerinin endüstriyel süreçlerde kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Son elli yılda enzimler, başta biyoteknolojik uygulamalar olmak üzere polimer kimyası ve enerji alanında, gıda teknolojisinde, su kalitesinde ve tıp alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimlerin endüstriyel kullanım alanları Şekil 14’da gösterilmiştir.



Şekil 14: Enzimlerin Kullanım Alanları (Schäfer ve ark., 2006).

Kararsız enzimlerin endüstride kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle, kararsız enzimleri stabilize eden immobilizasyon yöntemlerinden endüstriyel uygunlukta olanlar kullanılarak kararsız enzimlerin kararlılığı artırılmaktadır. Kararlı bir biyokatalizör elde etmek için, kararlı enzim kullanımı veya immobilizasyon yöntemleri kullanılarak kararsız enzimlerin kararlı hale getirildikten sonra kullanımı gerekmektedir (Schäfer ve ark., 2006).

İmmobilizasyonun ardından enzimler, reaksiyon tamamlandıktan sonra reaktanlardan kolayca ayrılabilen heterojen biyokatalizörler gibi davrandıkları için, birkaç süreç

döngüsünde kolayca yeniden kullanılabilirler ve biyoreaktörlere entegre edilebilirler. İmmobilize enzimler, meyve suyunun arıtılması ve turunçgil suyundaki acılığın giderilmesi için de kullanılır (Pramanik, 2019).

İmmobilize enzimlerin diğer bir ana uygulaması biyosensörlerdir. Çeşitli bileşenlerin içeriğini belirlemek ve ürünlerin kalitesini kontrol etmek için bu alanda kullanılmaktadır. Raf ömrünü uzatmak ve paketlenmiş gıda kalitesini artırmak için perspektif uygulama olan gıda paketlenmesinde de immobilize enzimler kullanılmaktadır. Uygulamaları ayrıca biyodizel, biyoyakıt hücreleri, polyeater ve amino asitlerin üretimini de içerir (Yushkova ve ark., 2019).

4.2.2. Gıda Endüstrisinde İmmobilize Enzimlerin Kullanımı

Gıda endüstrisinde, immobilize enzimler hem sürekli hem de aralıklı işlemlerde uygulanabilir oldukları için tercih edilmektedir (Yushkova ve ark., 2019). İmmobilize enzimler, şurupların, şekerlemelerin, sütü yiyeceklerin, alkollü ve meyveli içeceklerin, unlu mamuller için mayaların ve peynir altı suyu laktoz hidrolizatlarının üretimi dahil olmak üzere çeşitli ürünlerin gıda endüstrisinde imalatında kullanılmaktadır (Datta ve ark., 2013; Nisha ve ark., 201).

4.2.3. Laktaz Enzimi ve Endüstriyel Kullanımı

Süt ve süt ürünleri, beslenmede yer alan başlıca gıda maddeleri arasında olduğu için süt kaynaklı laktoz [4-0-(/3-o-galaktopiranosil)-D-glukopiranoz], insanların günlük karbonhidrat alımının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır.

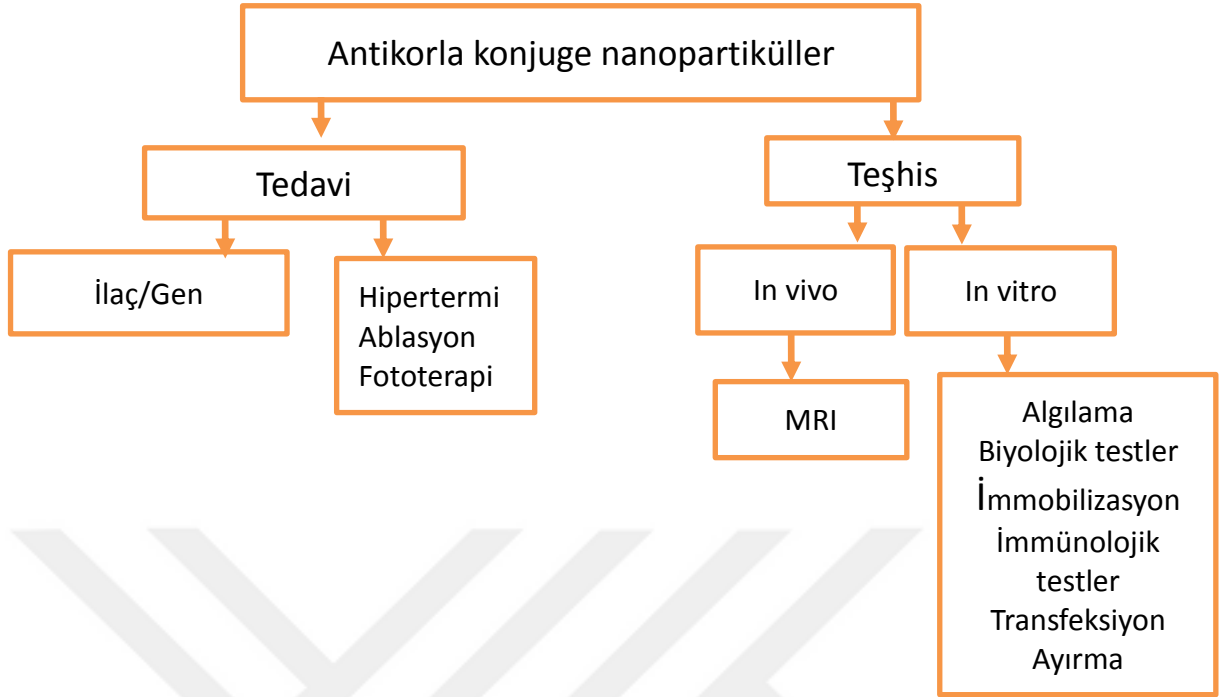
Laktoz, laktaz olarak da adlandırılan galaktosidaz enzimi tarafından glikoz ve galaktoza hidroliz edilir. Ancak sütte bulunan laktoz, insan vücudunda sindirilemediğinde “laktoz intoleransı” denilen bir sağlık problemine neden olmaktadır. Pek çok insan laktoz intoleransına sahiptir ve bu nedenle sütü tüketemezler (Kirk ve ark., 2002). Laktoz intoleransı olan kişilere, laktozsuz süt ürünlerini tüketmeleri veya laktaz enzimini kullanmaları tavsiye edilmektedir. Laktaz enzimi süt endüstrisinde çözünür halde uygun bir şekilde kullanılabilse de, işleme

maliyeti ve sürekli işleme potansiyeli nedeniyle immobilize edilmiş laktaz enziminin kullanımına ihtiyaç duymaktadır.

Örneğin Woychik ve ark. *K. lactis* kaynaklı immobilize laktazın, süt ürünlerinin işlenmesi için kullanımını sağlamak için yeterince stabil olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca sütün pH'ı ve çok çeşitli mikroorganizmaların çoğalması immobilize enzimin kullanımını zorlaştırmaktadır. Süt proteinlerinin enzimin bağlandığı matrise adsorpsiyonu, immobilize enzimi sterik olarak engelleyerek kullanımını sınırlandırabilir. Laktaz enzimi asidik pH'ta çalışabildiği için, süzme peynir imalatından elde edilen peynir altı suyu gibi asidik sıvı ürünlerde laktozun hidrolizi için immobilize formda kullanım için uygundur.

4.2.2. Antikorların Endüstriyel Uygulamaları

Antikor-antijen etkileşimi, bağışıklık sisteminin temelini oluşturmaktadır. Bu etkileşim temel alınarak bir çok modern immünolojik test yöntemi geliştirilmiştir. Antikorlar; bağlanma özellikleri, afiniteleri ve özgüllükleri sayesinde biyomedikal alanda çok sayıda uygulamada yer almaktadır. Bu biyomedikal uygulamalar toksinlerin in vivo nötralizasyonu, pasif immünizasyon görüntüleme amaçlı radyonüklitlerin verilmesi ve kanser tedavisini içerir (Whittum-Hudson ve ark., 1996). Şekil 15 antikorların kullanımı biyomedikal amaçlı kullanımlarını göstermektedir.



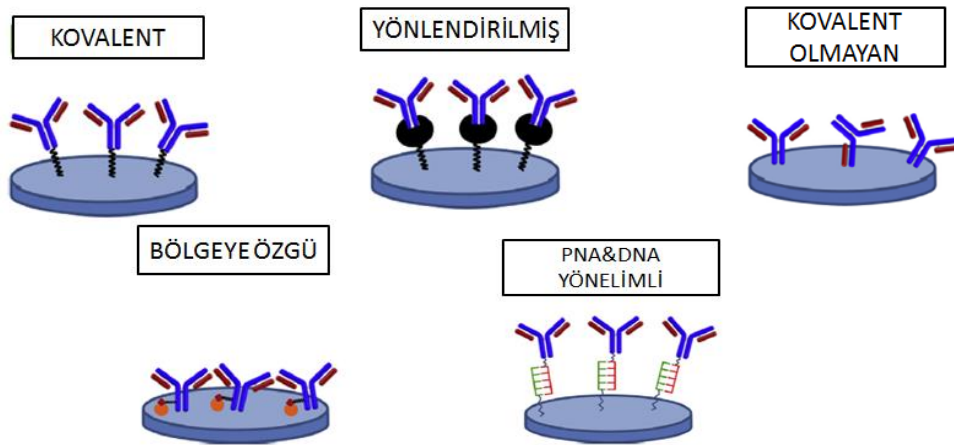
Şekil 15: Antikorların Kullanım Alanları (Whittum-Hudson ve ark., 1996)

Antikorlar mikro organizmaların ve organik kirleticilerin kontamine su ve topraktan verimli bir şekilde uzaklaştırılma işlemlerinde, gıda ve çevre endüstrilerinde mikrobiyal kontaminantların veya organik pestisitlerin çok küçük oranlarda tespit edilmesi için gerçekleştirilen rutin izlemlerde kullanılan biyosensör teknolojisinde değerlendirilmektedir (Harris, 1999).

Antikorların, kanser tedavisindeki yüksek potansiyelleri de fark edilmeye başlanmış olmakla birlikte birkaç tedavi yöntemi Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından onaylanmıştır (Leget ve Czuczman, 1998; Goldenberg, 1999). İlk terapötik monoklonal antikorun onayından bu yana FDA, 1986'da organ nakli ile ilişkili akut organ retlerin tedavisi için uygulama ve klinik kullanım için toplam yaklaşık 62 tane monoklonal antikorunu onaylanmıştır (Ecker ve ark.,2015). İmmobilize antikorlar, spesifik olarak toksik molekülleri tümör hücrelerine göndermek, sitotoksik immün hücrelerini toplamak ve apoptotik sinyal yollarını etkinleştirmek için kullanılır (Bagshaw ve ark., 1999). İmmünoanalizlerde ise immobilize edilmiş antikorlar, tespit adımlarının sayısını ve süresini kısaltmak ve

ayrıca yüksek tespit hassasiyetini ve tekrarlanabilirliği geliştirmek için göre tercih edilirler (Ecker ve ark.,2015).

Antikorların antijen bağlama bölgelerinin, antijeni bağlamak için serbest olacak şekilde yüzeye güçlü bir şekilde tutulması immobilizasyon işleminin etkinliğini arttırmaktadır. İdeal substrat hidrofilik, düşük maliyetli, biyomoleküllere karşı inert ve biyo uyumlu olarak erişilebilir olmalıdır. Tüm biyomoleküller için uygun evrensel bir substrat olmamasına rağmen, immüno analizlerde çok sayıda biyoanalitik platform veya substrat kullanılmıştır. En yaygın olarak kullanılanları polistiren mikrotitre plakaları, altın substratları, manyetik boncuklar, nanopartiküller ve siklik poliolefinler gibi şeffaf substratlardır. Sonuç olarak, bu tür malzemelerin yüzeyi, antikor ile kovalent bağ oluşturmak için işlevsel hale getirilmelidir. Antikor immobilizasyonu çalışmalarının başlangıcında, antikorlar pasif adsorpsiyon tekniği kullanılarak uzun süreli bir inkübasyondan sonra substrat üzerine basitçe adsorbe edilmiştir. Daha sonra pasif adsorpsiyon işleminde yer alan sorunları ortadan kaldırmak için çeşitli işlevselleştirme ve çapraz bağlama stratejileri geliştirilmiştir. Bu gelişme ile kovalent, kovalent olmayan, yönlendirilmiş, bölgeye özgü, afinite veya tuzak bazlı, peptit nükleik asit ve DNA yönelimli antikor immobilizasyon yöntemlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Vashist ve Luong, 2018). Antikor immobilizasyon yöntemleri Şekil 16’da gösterilmiştir.



Şekil 16: Antikor İmmobilizasyon Yöntemleri (Vashist ve Luong, 2018)

4.2.3.İmmobilize Enzim veya Antikor İçeren Biyomalzemeler ve Toksisite Testleri

Bir destek materyaline enzim ve antikor immobilizasyonu sırasında kullanılan yöntem veya kimyasal maddeler nedeniyle tek başına toksik etkiye sahip olmayan ancak diğer malzemeler ile birleştğinde toksik özellikler gösterebilecek biyo ve nano malzemeler toksikolojik olarak test edilmektedir. Hem ticari ürünlerde hem de endüstriyel ortamlarda kullanım için tasarlanmış bu biyomalzemelerin artan temas olasılığı sağlık sonuçları hakkında büyük bir endişe oluşturmaktadır (Beck-Speier ve ark., 2005). Örneğin; bu malzemeler nano boyuta sahip olduğu için vücut içinde kullanıldıklarında hücre zarını geçerek mitokondri gibi kritik organellere translokasyona ve biyopersistansa neden olabilirler. Nano boyutlu bu parçacıklar (100 nm), hücrelere girebildikleri için aynı malzemedan yapılmış daha büyük parçacıklara göre daha toksik olabilmektedir (Jeng ve Swanson, 2006) toksik olmayan ve mikron boyutundaki bazı parçacıkların boyutları nano ölçeğe küçültüldüğünde toksik hale geldiğini belirtmişlerdir. Bunun nedeni; nano malzemelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, çözünürlükleri, yüzey alanlarındaki değişiklikler ve yeni yüzeyin kimyasal özellikleri olabilir. Nanomalzemelerin küçük boyutu, fiziksel davranışlarını parçacık boyutuyla değiştirir, bu da çözünürlüğü, şeffaflığı, rengi, emilimi veya emisyon dalga boyunu, iletkenlik, erime noktasını etkiler (Duffin ve ark., 2001) karbon siyahı gibi metal içeriği düşük olan yanma partiküllerinin yüzey özelliklerinden dolayı iltihaplanmaya neden olabileceğini göstermiştir. Bazı araştırmalar ise tüm nanomalzemelerin benzer kimyasal bileşime sahip nano boyutlu parçacıklardan daha toksik olmadığını göstermektedir (Chen ve ark., 2006)

4.2.4. İn vitro Toksisite Değerlendirmesi

Nanomalzemelerin toksisiteyi veya hücre ölümünü tetikleme potansiyeli açısından değerlendirilmesi için hem in vitro hücre kültürü hem de hayvan çalışmaları kullanılmaktadır. Genel olarak, in vitro testler, alt hücre sistemleri (makromoleküller, organeller), hücresel sistemler (tek tek hücreler, ortak kültür, bariyer sistemleri) ve

tüm dokulardan (organlar, eksplantlar) oluşur. In vitro veriler, tüm hayvan çalışmalarının yerini tutmaz ancak, genel bir toksisite mekanizmasını ortaya çıkaran basit in vitro modellerin kullanımı, nanomalzemelere maruz kalma potansiyel riskinin daha ileri düzeyde değerlendirilmesi için bir temel olabilir. Toksikolojik testlerde sıklıkla memeli türleri kullanılmaktadır. Memeli olmayan türler, omurgasız ve omurgalı model organizmaların toksikolojik amaçlı kullanımına yönelik çalışmalar da devam etmektedir. Memeli olmayan türlerin toksikolojik testlerde kullanımını bazı teknik avantajları bulunmaktadır. Örneğin, zebra balığı gibi şeffaf türlerde, sinir sisteminin alt kümelerinde floresan raportör genlerinin ekspresyonu, nöronal gelişimin çeşitli yönlerini canlı hayvanlarda veya embriyolarda izleyebilme imkanı sağlar. Bu, bir maddenin sinir sistemi üzerindeki etkisini doğal bağlamında ve gerçek zamanlı olarak (dinamik) incelemek için benzersiz bir olanak sunar; her iki incelemenin de in vitro veya mevcut memeli modellerinde gerçekleştirilmesi çok zordur. Bu yaklaşımın altında yatan temel varsayım, memeli olmayan türlerden öğrendiklerinin memeliler ve insanlar için tahmin edici olmasıdır. Biyolojik süreçler genellikle hayvan filumlarında yüksek oranda korunduğu için zebra balığının toksikoloji testlerinde kullanımı önerilen yeni yöntemler arasında yer almaktadır (Schrand ve ark., 2012).

4.3. Zebra Balığı

Zebra balığı (*Danio rerio*) Kuzey Hindistan'dan ve komşu ülkelerden gelen küçük tropikal balıklardır. Zebra balığının ilaç tarama testlerinde kullanılmasına olan ilgi birçok doğal avantajdan dolayı artmaktadır. Zebra balığı tek bir çiftleşmede 100-200 yumurta üretir ve 2-3 ay gibi kısa bir gelişim sahiptir. Buna ek olarak, embriyogenez sırasında rahim dışı gelişimleri ve optik netlikleri, erken gelişim süreçlerinin ve organ morfolojisinin görsel analizlerine izin vermektedir. 24 hpf'ye kadar tüm vücut planı oluşur. Beyin, gözler ve kalbin tüm öncü hücreleri ve dokuları ışık mikroskobu kullanılarak kolayca görülebilir. Embriyogenez 72 hpf ile tamamlanır ve kardiyovasküler sistem, bağırsak, karaciğer ve böbrek dahil olmak üzere iç organların çoğu 96 hpf tamamlanması ile tamamen gelişmiş olur. Zebra balığının embriyonal gelişimi Şekil 9'da gösterilmiştir. Bu hızlı gelişme, insan embriyolarında 3

aylık gelişim ile karşılaştırılabilir. Zebra balıkları; sinir sistemi, böbrek, kalp, hematopoietik sistem ve notokord oluşumu gibi karmaşık biyolojik süreçleri incelemek ve ayrıca anjiyogenez, apoptoz ve toksisite yanıtını değerlendirmek için uygun bir model organizmadır. İnsan genom dizisi projesi tamamlandığında ve zebra balığı genomunu da belirlendiğinde, bu hayvan modeli de insan genlerinin işlevini anlamaya katkıda bulunacak şekilde konumlandırılmıştır (Ward ve Lieschke, 2002).

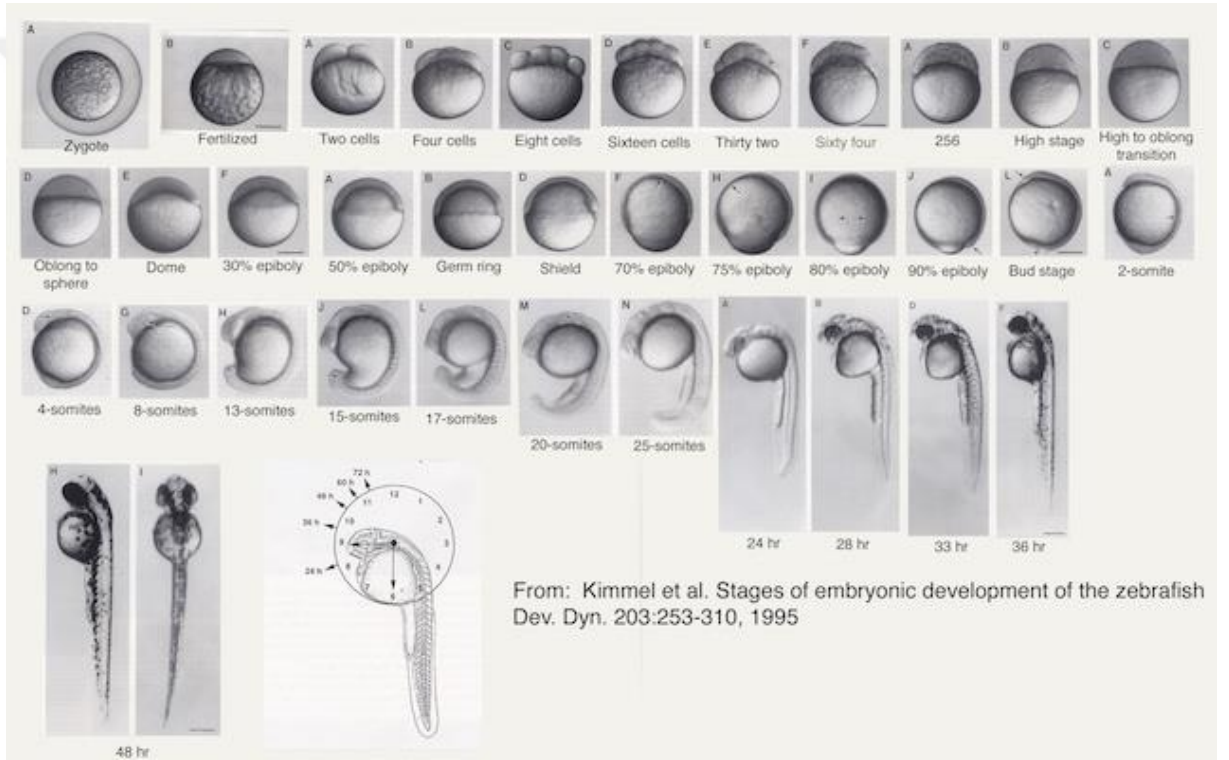
4.3.1.Zebra Balığı ve Embryolarının Toksikoloji Araştırmalarında Kullanımı

Zebra balığı toksikoloji araştırmaları için iyi tanınan bir biyolojik model sistemidir ve moleküler başlatıcı olaylardan, organizma sağlığı ve davranışındaki değişikliklere kadar toksisiteyi incelemek ve modellemek için kullanılabilir. Zebra balığı, yüksek verimli kimyasal toksisite testi için kullanılabilir ve in vitro testlere benzer hızlı, büyük ölçekli taramaya izin verir. Zebra balığı, memeli modellerine benzer şekilde, ksenobiyotiklerin toksikokinetik ve toksikodinamiğinin değerlendirilmesini sağlayan, yüksek düzeyde korunmuş organ sistemlerine ve metabolik yollara sahip karmaşık organizmalardır. Model bir organizma olarak zebra balığı küçüktür, ekonomiktir ve bakımı kolaydır (Bailey ve ark., 2013).

Zebra balığı embriyolarının embriyogenezinin ilk 5 gününde ek bir bakıma ihtiyacı yoktur. Preklinik ilaç taraması ve tüm hayvan biyoanalizlerini geliştirmek için omurgalı modeli olarak kullanılmaktadır. Çok sayıda bileşiği tarama ve istatistiksel olarak önemli sayıda hayvanı hızlı bir şekilde değerlendirebilme olanağı, ilaç taraması için zebra balığı modelini kullanmanın avantajlarıdır. Zebra balığı ile ilgili ilaç toksikoloji testlerinde mikro ölçüler kullanılırken, sıçan testlerinde 1000 kat daha fazla miktarlar kullanılmaktadır. Diğer bir önemli özellik, zebra balığı embriyolarının optik şeffaflığının, iç organların görselleştirilmesine ve aynı zamanda floresansla konjuge substratların, ligandların veya boyaların alımına izin vermesidir. Bu nedenle, fare ve sıçan kullanılarak yapılan deney hayvanı modellerindeki histolojik inceleme ile karşılaştırıldığında, zebra balıklarında iç organlar üzerindeki ilaç etkilerini incelemek daha basittir. Ayrıca, zebra balıklarının kullanımı floresan etiketleme, enzim reaksiyonlarının, ligand bağlanması ve spesifik hücresel olayların

oluşumunun in vivo değerlendirilmesini de kolaylaştırır. Zebra balığı biyoanalizlerinin klinik ile olan ilişkisini doğrulamak için daha fazla çalışma gerekli olsa da, omurgalılar arasındaki yüksek koruma seviyesi nedeniyle, bu hayvan modeli ilaç metabolizmasını ve organ / doku tepkilerini değerlendirmek için benzersiz avantajlar sunmaktadır (Ward ve Lieschke, 2002).

Zebra balığı embriyoları *ex vivo* olarak gelişir (Şekil 17). Fertilizasyondan 72 saat sonra (hpf) oluşan tüm ana vücut sistemleri hızla gelişir; ve gelişimin erken aşamalarında optik olarak yarı saydamdır (Bailey ve ark., 2013). Bu özelliği de görüntüleme işlemlerini kolaylaştırmaktadır.



Şekil 17: Zebra balığının embriyonal gelişim aşamaları(Kimmel ve ark., 1995)

Zebra balığı organ sistemi toksikolojisini test etmek (Goessling ve ark., 2015), etki mekanizmalarını araştırmak (Peterson ve ark., 2012), ekotoksisiteyi değerlendirmek ve çevresel toksik maddeler (Bambino ve ark., 2017) için kullanılmasına rağmen, son yıllarda kimyasal toksisite taramasında (Rennekamp ve ark., 2015), ilaç geliştirmede (Gibert ve ark., 2013) ve gelişimsel nörotoksistede (Nishimura ve ark., 2015) kullanılmaya başlandı. Zebra balığı modeli, gelişimsel toksisite deneylerinde memeli

modellerine benzer şekilde performans gösterir (Sipes ve ark. (2011). Gelişim üzerine olan toksisite için kimyasalların değerlendirilmesinde zebra balığı ve memeli modelleri arasındaki uyum % 55-100 aralığındadır (Brannen ve ark., 2010; Padilla ve ark., 2011; Selderslaghs ve ark., 2009). Araştırmalar, memeli türleri arasındaki uyum yüzdesinin yüksek olması ve zebra balığının tepkisinin memeli toksisite modelleriyle aynı olması nedeniyle toksikolojik testlerde zebra balığı modelinin kullanımını desteklediğini göstermektedir. Zebra balıkları embriyonik evreleri, biyomedikal araştırmalarda ve (eko)toksikolojide model olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır.

Hayvan deneylerinin değiştirilmesi, azaltılması ve rafine edilmesi, (Russell, 1959) aşamalarının daha az acı, ağrı, stres, kalıcı zarar yaşaması veya hiç yaşamaması nedeniyle balık embriyoları yöntem olarak kabul edilmektedir.

Özellikle, zebra balığı embriyosu, bakım kolaylığı, küçük boyut, yüksek doğurganlık, hızlı gelişme, embriyonun optik şeffaflığı, genetik ve kimyasal taramalara uygunluk gibi benzersiz özelliklerinin yanı sıra sıralı bir genom ve zengin bir genetik, moleküler ve hücrel manipülasyon araçları sayesinde model organizmadır. Şimdiye kadar 5000'den fazla zebra balığı mutanti ve transgenik suşun kurulduğu göz önüne alındığında, zebra balığı modeli bu nedenle küresel ölçekte gen fonksiyonunu anlamamıza önemli ölçüde katkıda bulunabilir. (Nüsslein ve Dahm , 2002).

Örneğin polikistik böbrek hastalığı, kalp aritmileri, kardiyomiyopatiler ve iskelet kas sisteminin miyopatileri, konjenital kalp kusurları, anemi, lösemi, doku rejenerasyonu, işitme bozuklukları, ektodisplazi, epidermolizis bülloza, nöral ve retinal dejenerasyon araştırılmasında zebra balığı teknolojilerini ve altyapısını geliştirmek için önemli kaynaklar tahsis edilmektedir (Lieschke ve Currie, 2007) Zebra balığı embriyo modelinin fare ve sıçan gibi geleneksel modellere göre önemli bir avantajı, bu tür fenotipler için geniş çerçeveli görüntüleme olanağının olmasıdır Ayrıca, zebra balığı, memelilerinkinden çok daha fazla yenilenme yetenekleriyle bilinir (Haffter ve Nüsslein, 1996).

Zebra balığı embriyosunu hayvan çalışmalarında kullanmak amacıyla ilaç endüstrisinde artan bir ilgi mevcuttur. Zebra balığı embriyosu, bozulmamış, karmaşık bir organizma olarak biyoaktif molekülleri tanımlamak için eşsiz fırsatlar sunar. Bu hücreler en iyi doğal ortamlarında incelenebildiğinden, özellikle kök hücre araştırma alanı için uygun bir modeldir. Zebra balıklarının ilgi gördüğü bir diğer önemli uygulama alanı ise çevresel kirleticilerin toksikolojisi, çevresel risk ve tehlike değerlendirmesidir. Örneğin, kimyasalların tescili ve pestisitlerin ruhsatlandırılmasında embriolar kullanılmaktadır (Zon ve Peterson, 2010). Almanya'da, zebra balığı embriyo toksisite testi, tüm atık su testi için bir DIN (Alman Standardizasyon Enstitüsü) standardı olarak zorunlu hale gelmiştir ve 2007'de bu kılavuzun uluslararası bir versiyonu oluşturulmuştur.

Memelilerle yapılan toksikolojik testler pahalı ve zaman alıcı olduğundan ve ciddi etik sorunlar doğurduğundan, alternatif modellerin geliştirilmesine acil ihtiyaç vardır. Küçük ve şeffaf embriyosu ile zebra balığı, kimyasalların toksikolojik ve teratolojik etkilerinin sistematik olarak test edilmesi için memelilerden çok daha ucuz bir modeldir (Weigt ve ark., 2011)

Zebra balığı embriolarının kullanımı, sistemik toksisite ve karmaşık mekanizmaların (örneğin davranış) ele alınmasına izin vermektedir (Sukardi ve ark., 2011). Çok sayıda deneyden elde edilen sonuçlar, zebra balığı embriolarının, insanlar dahil memelilerdeki kimyasalların toksisitesini ve teratojenisitesini tahmin etmek için uygun modeller olduğunu göstermektedir (Selderslaghs ve ark., 2010). Örneğin, bileşiklerin kardiyotoksitesini ele alan bir çalışma, maddelerin insan kalbi üzerindeki toksik etkisinin, zebra balığı embriolarında daha net bir şekilde tespit edildiğini göstermektedir (Milan ve ark., 2003). Ayrıca gelişimsel, nöro-, hepato- ve gastrointestinal toksisite için de benzer uygun sonuçlar mevcuttur (Peal ve ark., 2010). Zebra balığının kullanımının yaygınlaşması gerektiğini kanıtlayan en önemli etken, hayvan refahıdır. Hem ulusal hayvan refahı mevzuatları hem de 2010/63/EU sayılı AB Direktifi, hayvan deneylerinin mevcut en az gelişmiş sistemle yapılması gerektiğini savunmaktadır. Bu nedenle, zebra balığı embrioları yalnızca yetişkin

balıklarla yapılan deneyler için değil, aynı zamanda memeli türleri ile yapılan deneyler için de bir alternatif olarak hizmet edebileceğinden, zebra balığı modelinin klinik araştırmalarda kullanımı desteklenmelidir.



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler;

- Polikaprolakton (60.000 g/mol) (Sigma-Aldrich, St Louis, ABD)
- İpek fibroini (500-10.000 g/mol) (Shanghai Soyoung Biotechnology, Çin)
- Albumin (Sigma Aldrich, St Louis, ABD)
- Laktaz Enzimi (Mayasan, Türkiye)
- Dimetilformamid (DMF) (Merck, Almanya)
- Diklorometan (DCM) (Merck, Almanya)
- (-)-Riboflavin (Sigma-Aldrich, St Louis, ABD)
- 1-klor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) (Sigma-Aldrich, St Louis, ABD)
- 5-5' ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit (DTNB) (Sigma-Aldrich, St Louis, ABD)
- Glutasyon ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$) (Sigma-Aldrich, St Louis, ABD)
- o- dianisidin dihidroklorür ($C_{14}H_{16} N_2O_2.2HCl$) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)

Çalışmada kullanılan diğer kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Sigma Aldrich (ABD) ve Merck (ABD) firmalarından temin edilmiştir.

5.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3’de çalışmamızda kullanılan cihazlar listelenmiştir.

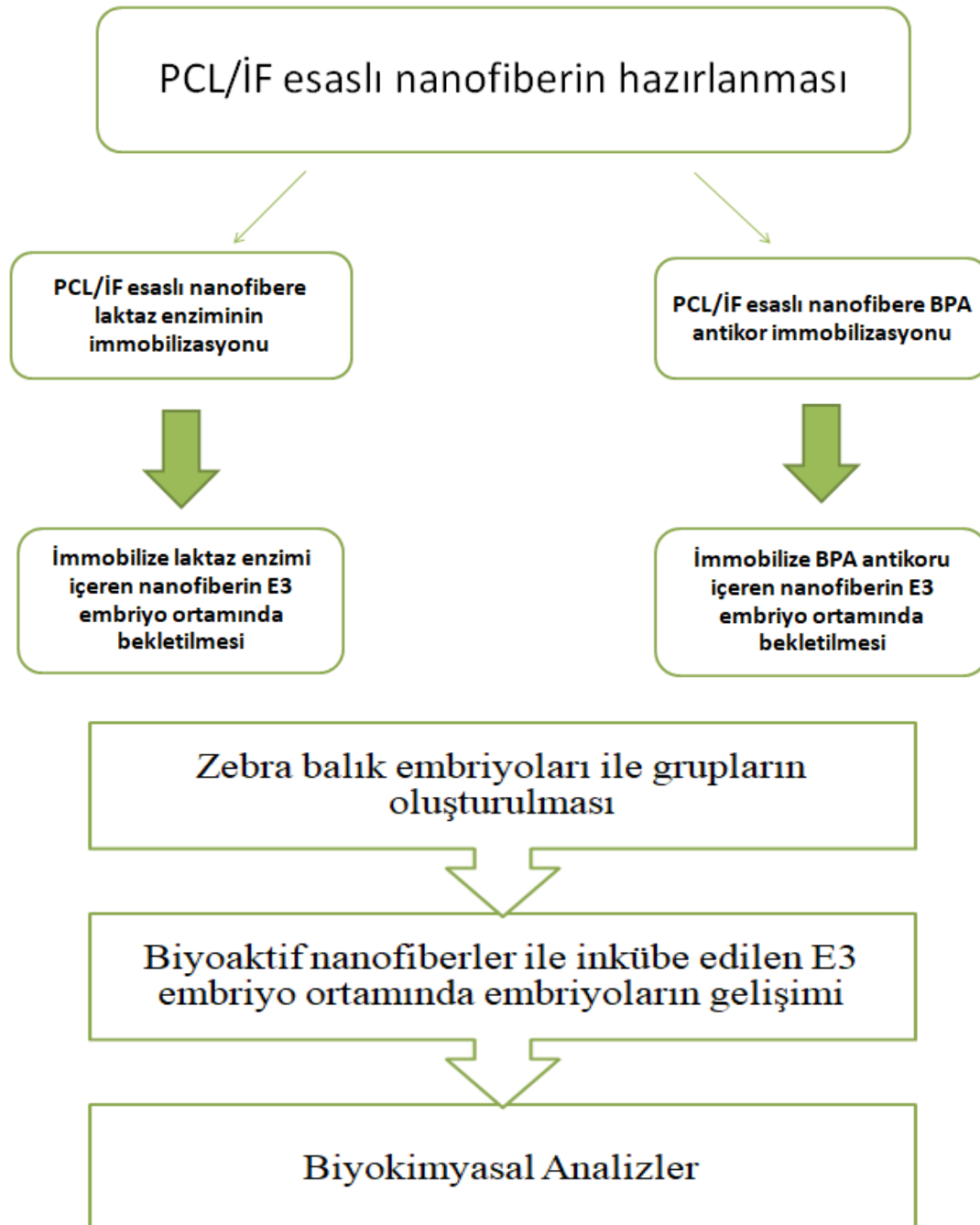
Tablo 3: Kullanılan Aletlerin Listesi

Alet	Marka	Alet	Marka
Vortex	Janke – Kunkell, IKA Labor Technic	Manyetik karıştırıcı	Janke – Kunkell, IKA Labor Technic
pH metre	Mettler Toledo	Akvaryum	Zebtec Mini sistem
Su banyosu (100°C)	Nuve, BT 400	Elektronik terazi	Sartorius
Spektrofotometre	Rayleigh-UV-1800	Otomatik pipetler	Gilson
Manyeti karıştırıcı	Janke – Kunkell, IKA Labor Technic	Stereo Discovery V8 mikroskop	Zeiss
Distile su cihazı	Elga, Purelab Option Q	Soğutmalı santrifüj	Hettich Mikro 220 R
Etüv	Nüve EN 400	Buzdolabı	Arçelik
Mikro santrifüj	Heraeus -Biofuge	Su banyosu (37° C)	Boehringer - Mannheim

5.3. Yöntem aşamaları

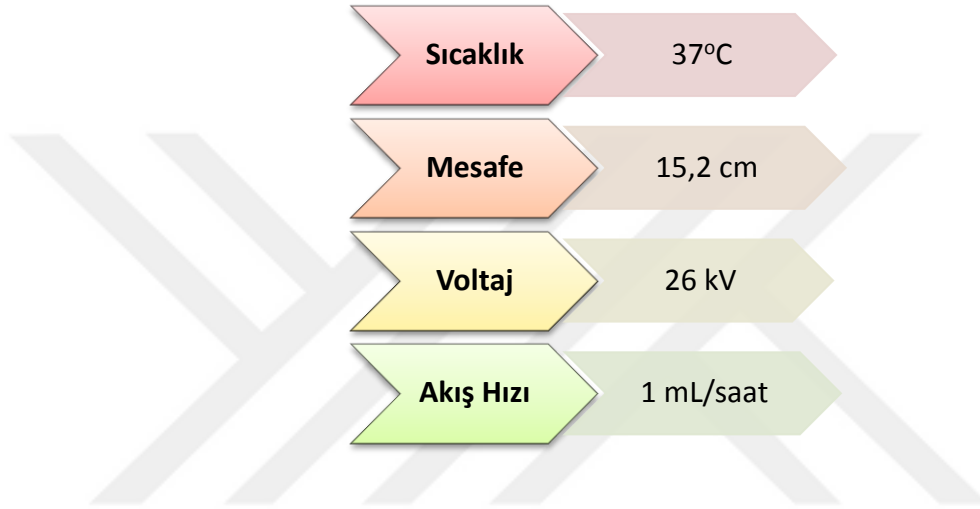
Çalışmamızda izlenen yöntem aşamaları Tablo 4’de sunulmuştur.

Tablo 4: Yöntem aşamaları



Dimetil formamid 1:4 oranında 20mL ve diklorometan ile 2g ipek fibroini ve 2g PCL 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak % 10 -10 (w/v)'luk bir çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti optimize şartlarda elektro dokuma cihazı (İnovenso NE200, Türkiye) ile 3 saat atım yapılarak anne sütü poşeti üzerine kaplanmıştır. Nanofiber üretim şartları Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5: Elektro-dokuma cihazı kullanılarak nanofiber üretim şartları



5.5. Polikaprolakton esaslı nanofibere antikor immobilizasyonu

Gerekli Çözeltiler

- **Stok Fosfat Tamponu (0,2 M, pH=7,2) :** 9,36 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 19,87 g NaHPO_4 , ve 87,75 g NaCl ayrı ayrı tartılır, biraz distile suda çözündürülür ve hacmi 1 litreye distile su ile tamamlanır. (Hacim 1 L'ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH 7,2'ye ayarlanır).
- **Fosfat Tamponu (PBS) (0,02 M pH=7,2) :** Stok fosfat tamponundan 100 mL alınır ve distile su ile hacmi 1 litreye tamamlanır.
- **Borat Tamponu (0,1 M, pH=8) :** 5,87 g borik asit ve 1,91 g sodyum tetra borat ayrı ayrı tartılır, biraz distile suda çözündürülür hacmi 1 litreye distile su ile tamamlanır. (Hacim 1 L ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH 8'e ayarlanır).
- **Dimetil Süberimidat Çözeltisi (0,02 M):** 0,5 g Dimetil süberimidat dihidroklorür tartılır ve hacmi 100 mL'ye borat tamponu ile tamamlanır.

5.6. Nanofibere Antikor İmmobilizasyonu

PCL/SF nanofiberler, 3x3 cm boyutlarında kesildikten üzerinde 20 µg olacak şekilde bisfenol A antikorları seyreltilerek eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılır. İki saatlik inkübasyon sonrasında nanofiberlerin yüzeyine bağlanamayan antikorlar fosfat tamponu ve borat tamponu ile yıkanarak nanofiberlerin yüzeyinden uzaklaştırılır. Nanofiber-antikor bağlanmasını güçlendirmek için Dimetilsüberimidat çözeltisi nanofiberlerin üzerine eklenerek oda sıcaklığında 5 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrasında nanofiberlere fosfat tamponu ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Hazırlanan nanofiberler fosfat tamponu içerisinde +4°C tutulur (Tunali Akbay ve ark, 2019).

5.7. PCL/SF esaslı nanofibere laktaz enziminin immobilizasyonu

Gerekli Çözeltiler

- **Fosfat Tamponu (0,02 M PBS pH=7,2) :** Stok fosfat tamponundan 100 mL alınır ve distile su ile hacmi 1 litreye tamamlanır.

5.8. Nanofibere Enzim İmmobilizasyonu

PCL/SF nanofiberler, 3x3 cm boyutlarında kesildikten sonra fosfat tamponu (0,02 M, pH 6.5) ile yıkanır. Daha sonra her parçanın üzerine 2 mL 5000 NLU (nötral laktaz ünitesi) laktaz enzimi eklenerek, PCL/SF esaslı nanofiberler 37°C'de 2 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrası fosfat tamponu (0.02 M, pH 6.5) ile yıkanır.

5.9. İmmobilize laktaz enzimi ile E3 embriyo ortamında bekletilmesi

Laktazın immobilize edildiği PCL/SF nanofiber 10 saat boyunca 100 mL E3 embriyo ortamında bekletilir.

5.10. İmmobilize BPA antikoru ile E3 embriyo ortamında bekletilmesi

BPA antikorumun immobilize edildiği 3x3 cm boyutlarında kesilen PCL/SF nanofiber 1 saat boyunca 100 mL E3 embriyo ortamında bekletilmiştir.

5.11. Zebra Balıkları Bakım ve Beslenme Prosedürü

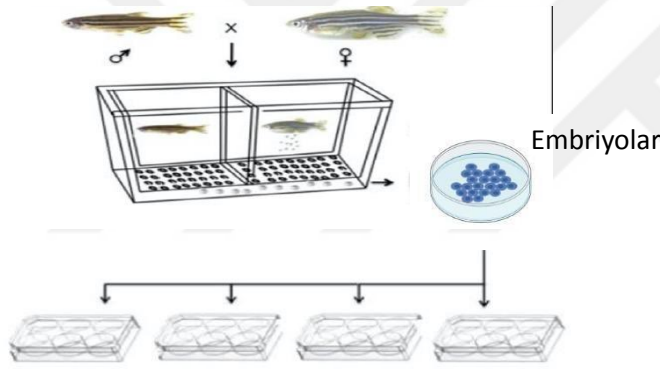
Çalışmamızda Boğaziçi Üniversitesi'nden temin edilen ve ZEBTEC akvaryum sisteminde barındırılan yetişkin yabani tip AB suşu zebra balıkları kullanılmıştır. Çalışmamızın Zebra balığı embriyoları ile olan kısmı Marmara Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesinde yer alan Zebra Balığı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Zebra balıkları bilgisayar kontrollü ZEBTEC akvaryumda barındırılmıştır (Resim 1). Günde 14 saat gün ışığı, 10 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma sistemi kurularak sirkadiyen ritimleri oluşturulmuştur. Sıcaklık 28 ± 1 °C ve nem ve % 61 olarak ayarlanarak otomasyon sistemle sabit tutulmuştur. Sistemin su pH'sı 6,9-7,2 arası ayarlanmış ve sabit tutulmuştur. Fiziksel ve UV sistemlerini içeren filtrasyon sistemi ile balıkların ortam temizliği sağlanmıştır. Günde iki kez kuru yem ve bir kez de canlı yem ile toplam üç kez beslenmişlerdir. Embriyolar tanklardan günlük olarak toplanmıştır. Embriyonik gelişim aşamaları Zeiss Stereo Discovery V8 mikroskop altında incelenmiştir.



Resim 1: ZEBTEC Mini Akvaryum sistemi (Ünal, 2018)

5.12. Zebra Balıklarından Embriyo Eldesi

Erkek zebra balığı, vücutları boyunca gümüş bantlara ve daha ince vücut şekillerine sahiptir. Bantlar üzerindeki turuncu ve kırmızı renk tonları sayesinde dişilerden ayırt edilebilir. Dişiler ise ürettikleri çok sayıda yumurta sebebiyle şişen karınlarından tanınabilir. Erkek ve dişi zebra balıklar 2:1 oranında karanlık başlamadan önce yetiştirme tanklarına alınırlar (Resim 1). Eşleştirme, yumurtlama ve döllenme işlemleri sabah ışığın başlamasından 30 dakika gibi kısa bir süre sonra meydana gelir. Döllenmiş embriyolar eşleştirme tankları altında bulunan bölmelere düşer. Bu bölmelerde bulunan delikler sayesinde tankın dibinden alınabilir (Şekil 18). Döllenmiş ve uygun gelişim düzeyine gelen embriyolar stereo mikroskop altında seçilerek döllenmeyenlerden ayrılır ve toplanırlar. Seçilen embriyolar 28⁰C’de E3 embriyo ortamında muhafaza edilirler (Bhasin ve ark., 2016).



Şekil 18 : Embriyo elde etme yöntemi (Bhasin ve ark 2016)

5.13 Zebra Balığı Embriyoları ile Oluşturulan Gruplar

Zebra balığı embriyoları kontrol, ham nanofiber (işlem görmemiş), laktaz enzimi immobilize edilmiş nanofiber, bisfenol a (BPA) antikoru immobilize edilmiş nanofiber olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Nanofiber esaslı maruziyet gruplarında, ilgili nanofiberler ayrı ayrı embriyoların gelişmeye bırakıldığı E3 embriyo ortamında bisfenol a (BPA) antikoru immobilize edilmiş nanofiber 1 saat ve 10 saat süre ile bekletilmiş ve daha sonra ortamdan çıkartılmıştır. Ham nanofiber (işlem görmemiş) ve Laktaz enzimi immobilize edilmiş nanofiber, E3 embriyo ortamında 10 saat süre ile bekletilmiş ve daha sonra ortamdan çıkartılmıştır. Kontrol grubunun E3 embriyo

ortamına ise herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Daha sonra embriyolar bu ortamların içerisinde gelişmeye bırakılmıştır. 72 saat süre ile gelişmeleri izlenmiştir. 72 saatin sonunda tüm gruplardaki 100 adet embriyo, 1 mL serum fizyolojik ile homojenize edilmiştir. Embriyo homojenatları derin dondurucuda -20°C 'de saklanmıştır.

5.14. Kullanılan Tayin Yöntemleri

5.14.1. Protein tayini (Lowry ve ark., 1951)

Prensip: Bu metotta önce proteinler alkali ortamda bakır iyonları ile reaksiyona sokulur. Daha sonra fosfomolibdik-fosfotungstik asit reaktifi (folin reaktifi) ile indirgenir. Oluşan mavi rengin şiddeti spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Oluşan mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır.

Gerekli Çözeltiler:

Sodyum karbonat çözeltisi (% 2 g): 2 g sodyum karbonat, 0.1 N NaOH çözeltisinde çözülür ve hacmi 100 mL'ye 0.1 N NaOH çözeltisi ile tamamlanır.

Bakır sülfat çözeltisi (%1 g): 1 g bakır sülfat biraz distile suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Sodyum potasyum tartarat çözeltisi (%2 g): 2 g sodyum potasyum tartarat biraz distile suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

B çözeltisi: %1 g'lık bakır sülfat çözeltisi ile %2 g'lık sodyum potasyum tartarat çözeltisi eşit hacimde (1/1) karıştırılarak kullanılır (taze hazırlanır).

C çözeltisi: 50 mL A çözeltisi ve 1 mL B çözeltisi karıştırılarak kullanılır (taze hazırlanır).

Folin çözeltisi: 100 g sodyum tungstat, 25 g sodyum molibdat.2H₂O, 50 mL %85 g'lık fosforik asit, 100 mL derişik HCl ve 700 mL distile su bir balona konularak 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Soğutulur. Üzerine 150 g Li₂SO₄ ilave edilip, geri soğutucu altında 15 dakika daha kaynatılır. Soğuduktan sonra, 5-6 damla brom katılır.Çözelti distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır ve kullanılır. Koyu renkli şişede saklanır, uzun süre dayanır.

Serum fizyolojik (% 0,9 g NaCl): 0.9 g NaCl biraz suda çözülür ve hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

Protein stok standart çözeltisi (%100 mg Albumin): 100 mg albumin biraz serum fizyolojikte çözüldükten sonra hacmi 100 mL'ye serum fizyolojik ile tamamlanır.

Protein çalışma standart çözeltileri: Stok çözeltiden uygun hacimler alınarak % 5, 15, 25 mg albumin ihtiva edecek şekilde serum fizyolojik ile seyreltilerek hazırlanır.

Deneyin Yapılışı:

Protein tayininde izlenen adımlar Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6: Protein Tayin Yöntemi

	Numune	St1 % 5 mg Albumin	St2 % 10 mg Albumin	St3 % 15 mg Albumin	Kör (K)
Albumin (%100 mg)	–	25 µL	50 µL	75 µL	–
Homojenat	10 µL	–	–	–	–
Serum Fizyolojik	490 µL	475 µL	450 µL	425 µL	0.5 mL
Toplam Hacim	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
Vorteks ile karıştırılır.					
C çözeltisi	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL
Vorteks ile iyice karıştırılır ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.					
Folin Ayıracı	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL

Vortekste iyice karıştırılır, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir. 30 dakika sonunda 500 nm'de köre karşı absorpsanlar kaydedilir. Standart grafiği çizilir ve protein konsantrasyonu hesaplanır.

5.14.2. Lipid peroksidasyonu (LPO) tayini (Ledwozyw ve ark., 1986)

Prensip: LPO ürünü olan malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Gerekli Çözeltiler

TBA çözeltisi (0.047 M): 500 mg TBA ile 6 mL 1 M'lık NaOH ile karıştırılır. Üzerine 69 mL distile su ilave edilir.

Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi (1.22 M, 0.6 M HCl (Hidroklorik asit)'deki): 20 mL TCA (%100 g TCA) ile 5 mL HCl (%37 g'lık d=1.19 g/dl'lik HCl) karıştırılır ve hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

n-bütanol: Direkt olarak orijinal şişesinden kullanılır.

Deneyin Yapılışı:

LPO tayininde izlenen adımlar Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7: Lipid Peroksidasyon Tayini

	Numune	Kör
Homojenat	0.25 mL	–
Distile Su	–	0.25 mL
TCA	1.25 mL	1.25 mL
Vorteks ile karıştırılır ve 15 dakika bekletilir.		
TBA	0.75 mL	0.75 mL
Vorteks ile karıştırılır ve 30 dakika 100°C su banyosunda bekletilir.		
n-bütanol	2 mL	2 mL

Vortekslenir ve 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edilir. Bütanol fazı alınarak 532 nm'de absorbanslar kaydedilir. MDA için saptanmış ekstinksiyon katsayısı ($1.56.105 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanır.

5.14.3. Total nitrik oksid tayini (Miranda ve ark., 2001)

Prensip: Nitrat, vanadyum (III) klorür ile nitrite indirgenir. Nitritle sülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil) etilendiamine dihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazonyum bileşiği oluşur. Oluşan bu renkli kompleks 540 nm’ de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Gerekli Çözeltiler:

NaOH çözeltisi (0,3 M): 0,6 g NaOH tartılır, bir miktar distile suda çözülür ve üzeri distile su ile 50 mL’ ye tamamlanır.

ZnSO₄ çözeltisi (%10 g): 5 g ZnSO₄ ya da 8,9 g ZnSO₄.7 H₂O tartılır bir miktar distile suda çözülür ve üzeri distile su ile 50 mL tamamlanır.

HCl çözeltisi (1M): 40 mL distile su içerisine 4,20 mL HCl eklenir ve hacim 50 mL ye distile su tamamlanır.

Vanadyum klorür (% 0.8 g): 0,8 g VCl₃ bir miktar 1 M HCl de çözülür ve üzeri aynı çözelti ile 100 mL’ ye tamamlanır.

HCl çözeltisi (% 5): 20 mL distile su üzerine 2,86 mL % 37’lik HCl çekilir ve hacim distile su ile 25 mL ye tamamlanır.

Sülfanilamid (%2 g): 0,5 g Sülfanilamid tartılır, 25mL %5’ lik HCl içerisinde çözülür.

NEDD (N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür) (% 0,1 g): 0,025 g NEDD tartılır. Bir miktar deiyonize suda çözülür ve hacmi distile su ile 25 mL’ ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

Embriyo homojenatı 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir. 0,3 mL süpernatant alınır, üzerine 0,3 mL 0,3 M NaOH ilave edilir. Oda sıcaklığında 5 dakika beklenir. 0,3 mL %10’luk ZnSO₄ ilave edilir. Vortekslenir. +4’de 14000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilir. Üst faz alınır ve +4’de 14000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilir. İki adet deney tübü anılır, kör ve numune olarak işaretlenerek aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 8: Total Nitrik Oksid Tayini

	Numune	Kör
Homojenat	0.3 mL	-
Distile Su	-	0.6 mL
VCl₃ çözeltisi	0.3 mL	0.3 mL
Sülfonilamid çözeltisi	0.15 mL	-
NEDD çözeltisi	0.15 mL	-
37 °C’de 30 dakika inkübe edilir.		

Köre karşı 540 nm’de absorbans kaydedilir. Sonuçlar 53000 M⁻¹/cm⁻¹ ekstinsiyon katsayısı kullanılarak hesaplanır.

5.14.4. Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini (Mylorie ve ark., 1986)

Prensip: SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını arttırma yeteneği olarak ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD’ın etkisiyle hidrojen peroksite dönüşür. H₂O₂ ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu da o kadar fazla olur. Oluşan renkli ürünün absorbansı 460 nm’de spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Gerekli Çözeltiler

Fosfat tamponu (50 mM, pH=7.8): 0.136 g KH₂PO₄ ve 0.697 g K₂HPO₄ tartılıp ayrı ayrı distile suda çözülür ve birleştirilir, pH 7.8’e ayarlanır. Hacmi distile su ile 100 mL’ye tamamlanır.

Fosfat tamponu + 0.1 mM’lık Na-EDTA: 0.0037 g Na-EDTA tartılır biraz 50 mM’lık fosfat tamponunda çözülür ve hacmi 50 mM’lık fosfat tamponu ile 100 mL’ye tamamlanır.

Fosfat tamponu (10 mM, pH= 7.5): 0.041 g KH₂PO₄ ve 0.122 g K₂HPO₄ tartılıp belli hacimde distile su içinde çözülür ve birleştirilir. pH 7.5 olarak ayarlanır. Son hacmi distile su ile 100 mL’ye tamamlanır.

Riboflavin (0.2 mM): 7.5 mg riboflavin bir miktar fosfat tamponu (100 mM'lık, pH=7.5) ile çözülür ve daha sonra hacmi 100 mL 'ye tamamlanır.

o-dianisidin (6 mM): 19 mg o-dianisidin bir miktar distile suda çözülür ve hacmi distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.

SOD stok standardı(120 IU/mL): 3000 IU/mL liyofilize SOD standardı 120 IU/mL olacak şekilde soğuk distile su ile çözülür. Hazırlanan stok standarttan uygun hacimler alınarak 3, 6, 9, 12 ünite SOD içeren standartlar hazırlanır.

Deneyin Yapılışı: Doku süpernatantı veya periton sıvısı alınır, gerekirse serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışılır. Numune, standart ve kör olmak üzere 3 deney tüpü alınır. Aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 9: Süperoksit Dismutaz Tayin Yöntemi

	Numune		St 6	St 9	St 12	Kör
PBS	2.6 mL	2.6 mL	2.6 mL	2.6 mL	2.6 mL	2.6 mL
o-dianisidin	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Distile su	-	0.075 mL	0.05 mL	0.025 mL	-	0.1 mL
Stok standart (120 U/mL)	-	0.025 mL	0.05 mL	0.075 mL	0.1 mL	-
Homojenat	0.1 mL	-	-	-	-	-

Standart grafiği yardımıyla yapılan seyreltmeler de göz önüne alınarak SOD aktivitesi hesaplanır.

5.14.5. Glutasyon-S-Transferaz (GST) Aktivitesi Tayini (Habig ve Jacoby, 1981)

Prensip: GST aktivitesi tayini, glutasyon ve 1-kloro-2,4-dinitro-benzenin (CDNB) konjugasyonu ile oluşan ürünün, 340 nm'deki absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanır.

Gerekli Çözeltiler:

Sodyum fosfat tamponu (0.2 M, pH=6.5): 0.534 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 2.3 g KH_2PO_4 ayrı ayrı biraz distile suda çözülür. Karıştırıldıktan sonra pH 6.5'e ayarlanır ve hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanır

Glutasyon (GSH) (60 mM): 1.84 g GSH biraz distile suda çözülür ve hacmi 100 mL'ye distile su ile tamamlanır (taze hazırlanır).

1-kloro-2,4-dinitro-benzen (CDNB) (60 mM): 1.22 g CDNB tartılır ve biraz etanolde çözülür. Sonra hacmi 100 mL'ye tamamlanır (taze hazırlanır).

Deneyin Yapılışı:

GST aktivitesi tayininde izlenen adımlar Tablo 10'da sunulmuştur.

Tablo 10: Glutasyon-S-Transferaz Tayin Yöntemi

	Numune	Kör
Homojenat	0.5 mL	-
Serum fizyolojik	-	0.5 mL
Fosfat tamponu	1.5 mL	1.5 mL
GSH çözeltisi	0.05 mL	0.05 mL
CDNB çözeltisi	0.05 mL	0.05 mL
Distile su	0.9 mL	0.9 mL

Karıştırılır, 3 dakika süre (0., 1., 2., 3., dakikalarda) ile karışımın 340 nm'de (25°C) absorbansları kaydedilir. GSH ve CDNB'nin konjugasyonu sonucu oluşan ürün için saptanmış olan ekstinksiyon katsayısı $9.6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplanır.

5.15. İstatistiksel Değerlendirme

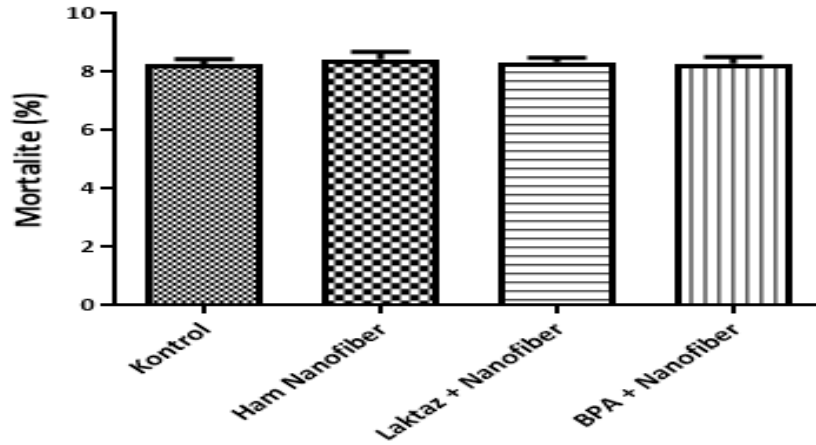
Çalışmamızın biyoistatistiksel değerlendirilmesinde Graphpad Prism 7.0 paket programı kullanılmıştır. Varyansları homojen olan değişkenlerin grup karşılaştırması için ANOVA testi ve ikili karşılaştırmaları için Tukey testi kullanılmıştır. Yorumlamalarda anlamlılık sınırı $p < 0.05$ alınmıştır.

6. BULGULAR

6.1. Kontrol ve Nanofiber Esaslı Maruziyet Gruplarında (Ham Nanofiber, Laktaz Enzim İmmobilize Nanofiber ve BPA Antikoru İmmobilize Nanofiber Gruplarında) Mortalite Yüzdeleri

Nanofiber esaslı maruziyet gruplarında, ilgili nanofiberler ayrı ayrı embriyoların gelişmeye bırakıldığı E3 embriyo ortamında 10 saat süre ile bekletilmiş ve daha sonra ortamdan çıkartılmıştır. Bu grupta bulunan embriyoların 24 hpf sonunda mortalite yüzdeleri %100 olarak tespit edilmiştir. BPA antikoru immobilize edilmiş nanofiber 1 saat süre ile E3 embriyo ortamında bekletildiğinde embriyoların mortalite yüzdeleri kontrol grubu ile karşılaştırılığında 24, 48, 72 hpf 'de mortalite yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. Laktaz immobilize edilen nanofiberin 10 saat süre ile E3 embriyo ortamında bekletilmesi sonucunda ise 24, 48, 72 hpf 'de mortalite yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir.

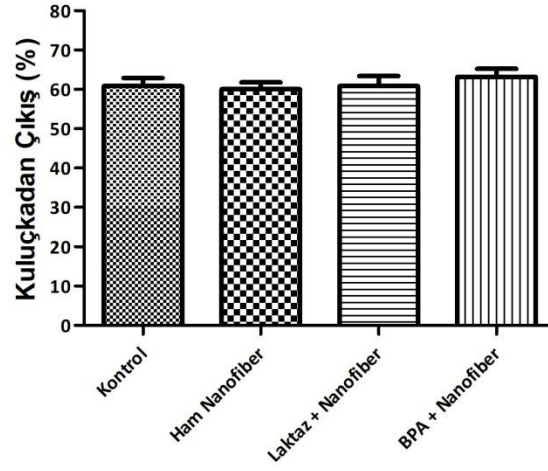
Bulgular, BPA antikoru immobilize edilmiş nanofiberin 1 saat süre ile E3 embriyo ortamında bekletilmenin uygun olduğunu, Laktaz enzimi immobilize edilmiş nanofiber için ise 10 saat ve altındaki süreler için E3 embriyo ortamında bekletilmenin uygun olduğunu göstermektedir. Aşağıda yer alan tüm sonuçlar BPA antikoru immobilize edilen nanofiberin 1 saat Laktaz enzimi içeren nanofiberin ise E3 embriyo ortamında 10saa süre ile bekletilmesi sonucunda elde edilen bulgulardır. Kontrol grubunda ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarındaki embriyolarda'da belirlenen mortalite oranları Şekil 19 de verilmiştir. Her biri 20 adet embriyodan oluşan grupların 5 kez tekrar edilmesi ile elde edilerek ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir. 24 ile 48 hpf sonunda ham nanofiber mortalite yüzdesi karşılaştırıldığı zaman anlamlı olmayan bir artış belirlenmiştir. 24, 48 ve 72 hpf'de gruplar karşılaştırıldığında ham nanofiber, laktaz enzimi immobilize nanofiber ve BPA antikoru immobilize nanofiber grupları, kontrol grubuyla kıyaslandığında, mortalite oranlarında anlamlı bir fark belirlenmemiştir (Şekil 19).



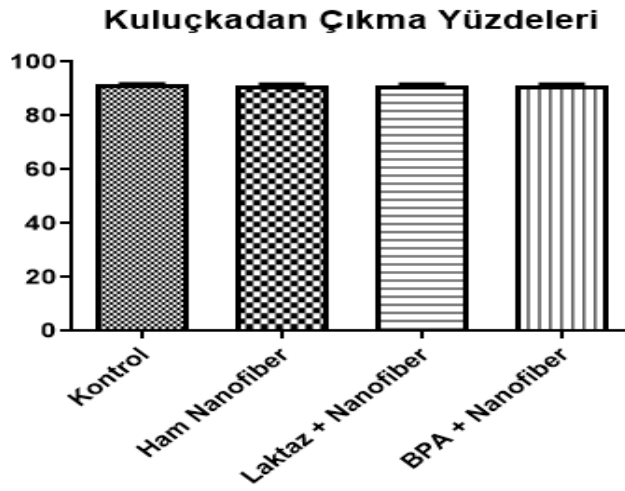
Şekil 19: Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının 72 hpf sonu mortalite yüzdeleri karşılaştırılması. Ortalama değerler altı tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

6.2. Gruplar arasında Kuluçkadan Çıkma Yüzdeleri

Kontrol grubunda ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarındaki embriyolarda 48 hpf'de belirlenen kuluçkadan çıkma oranları şekil 20'de, 72 hpf 'da belirlenen kuluçkadan çıkma oranları Şekil 21'de verilmiştir. Sonuçlar her biri 20 adet embriyodan oluşan grupların 5 kez tekrar edilmesi ile elde edilerek ortalama ve standart sapma şeklinde verilmiştir. Buna göre 72 hpf'da kontrol grubunda çıkış oranı %100 olarak bulunmuştur. 48 ve 72 hpf'de nanofiber esaslı maruziyet grupları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kuluçkadan çıkma yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.



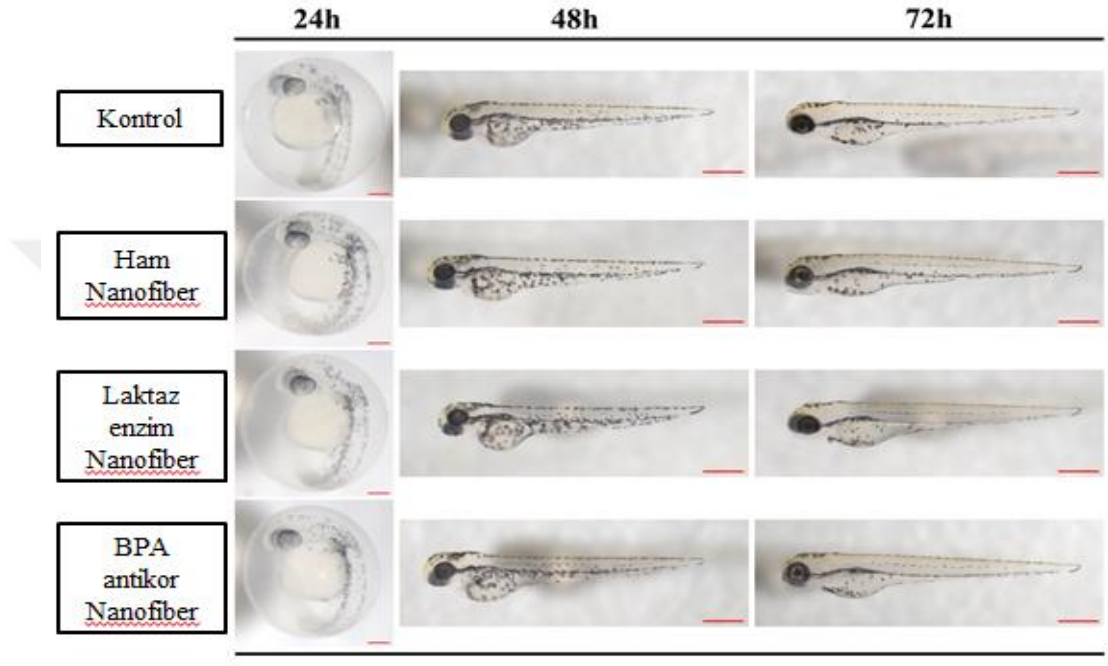
Şekil 20: Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının 48, hpf sonu kuluçkadan çıkma yüzdeleri karşılaştırılması. Ortalama değerler altı tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.



Şekil 21: Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının 72, hpf sonu kuluçkadan çıkma yüzdeleri karşılaştırılması. Ortalama değerler altı tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

6.3. Kontrol ve Nanofiber Esaslı Gruplarda Malformasyon Analizi Sonuçlarının Karşılaştırılması

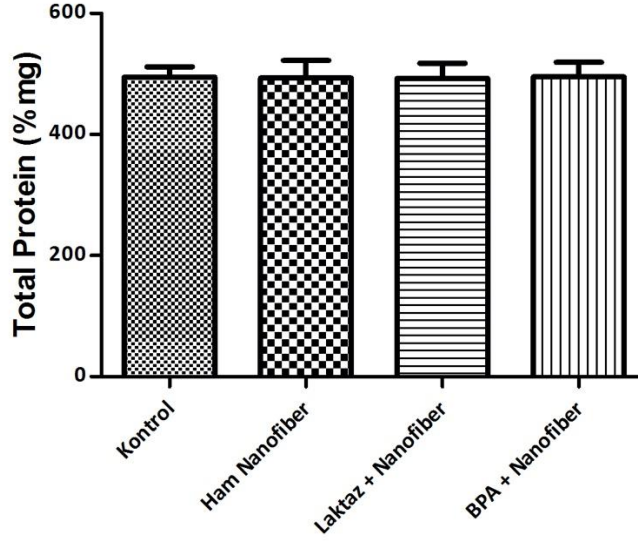
Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet grupları embriyolarında 72 hpf'de alınan görüntüleri Şekil 22'te gösterilmiştir. Maruziyet gruplarında 24, 48 ve 72 hpf'da malformasyon bakımından bir fark tespit edilmemiştir.



Şekil 22: Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının embriyolarında 24,48 ve 72 hpf'de alınan görüntüler

6.4. Kontrol ve Nanofiber Esaslı Maruziyet Gruplarında Total Protein Değerlerinin Karşılaştırılması

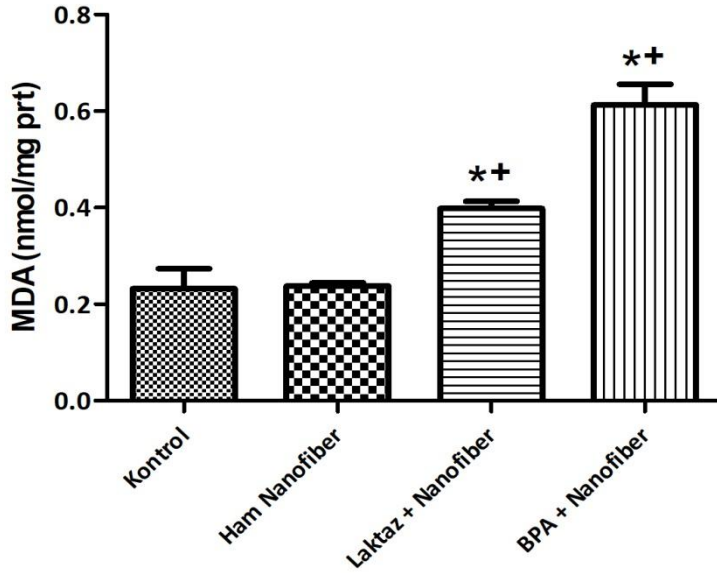
Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet grupları total protein seviyesi açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir (Şekil 23).



Şekil 23: Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının total protein değerlerinin karşılaştırılması. Ortalama değerler altı tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

6.5. Kontrol ve Nanofiber Esaslı Maruziyet Gruplarında Lipid Peroksidasyon Değerlerinin Karşılaştırılması

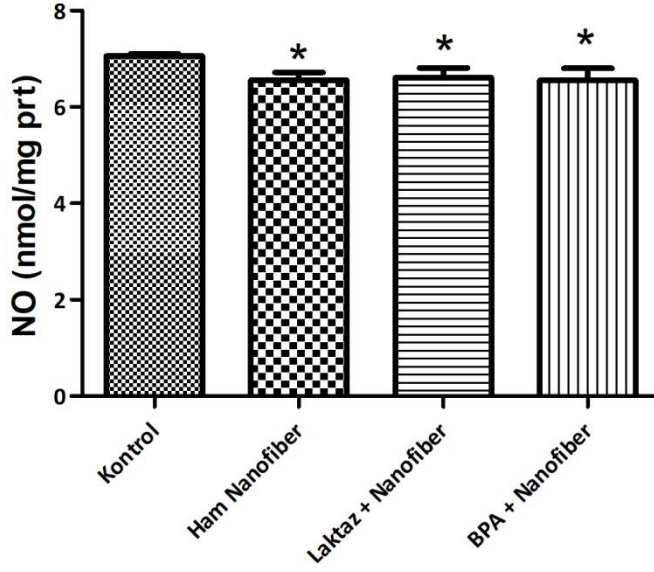
Lipid peroksidasyon MDA seviyesi ölçülerek belirlenmiştir. Buna göre kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının MDA değerleri karşılaştırıldığında, laktaz enzimi immobilize edilen nanofiber grubunda ve BPA antikor immobilize edilen nanofiber grubunda MDA değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0.05$). Ham nanofiber grubu ile kontrol grubunun MDA değerleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 24).



Şekil 24: Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının MDA değerlerinin Karşılaştırılması. Ortalama değerler altı tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. **MDA:** Malodialdehit, **prt:** Protein. Sonuçlar ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir. * $p<0.05$ kontrol grubundan farklı, + $p<0.05$ Ham nanofiber grubundan farklı

6.6. Kontrol Grubu ve Nanofiber Esaslı Maruziyet Gruplarının Nitrik Oksit Değerlerinin Karşılaştırılması

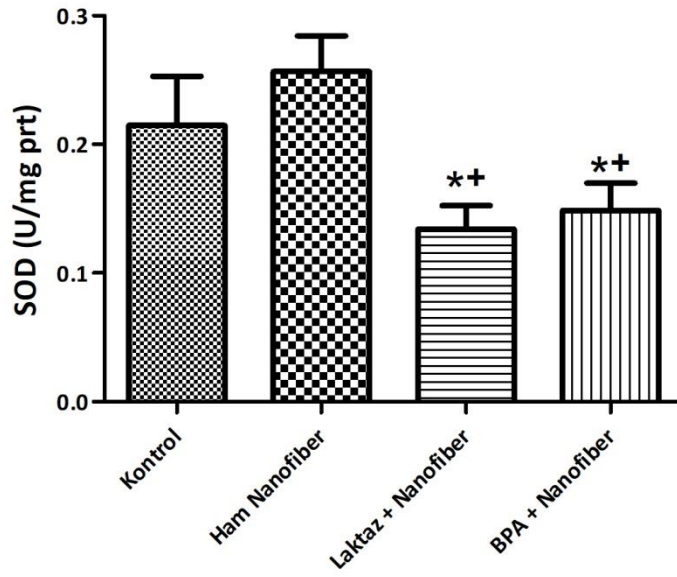
Kontrol ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının NO değerleri karşılaştırıldığında, maruziyet gruplarında kontrol grubuna göre NO değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 25).



Şekil 25: Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının nitrit oksit değerleri. **NO:** Nitrik oksit, **prt:** Protein Ortalama değerler altı tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. * $p<0.05$ kontrol grubundan farklı.

6.7. Kontrol Grubu ve Nanofiber Esaslı Maruziyet Gruplarının SOD Aktivitelerinin Karşılaştırılması

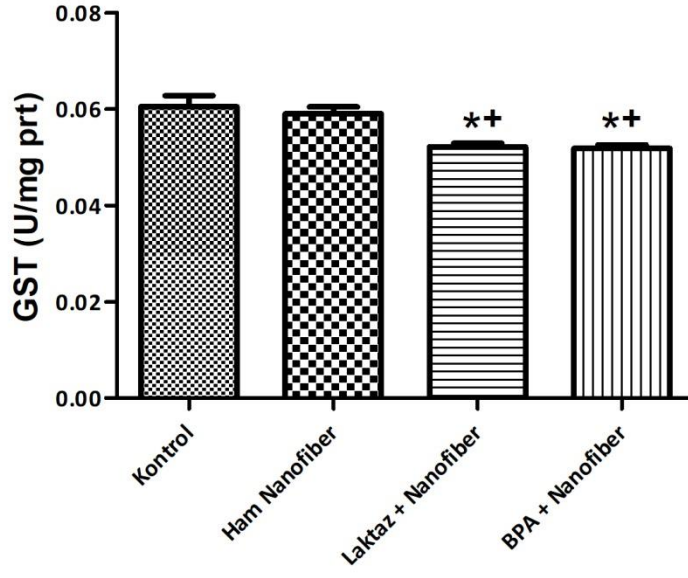
Kontrol ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında laktaz enzimi immobilize edilen nanofiber grubu ve BPA antikoru immobilize edilen nanofiber grubu SOD aktiviteleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmamıştır ($p<0.05$). Ham nanofiber grubu ve kontrol grubunun SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir. (Şekil 26).



Şekil 26: Kontrol grubu ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının süperoksit dismutaz aktivitelerinin karşılaştırılması. Ortalama değerler altı tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. **SOD:** Süperoksit dismutaz, **prt:** Protein. Sonuçlar ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir. * $p<0.05$ kontrol grubundan farklı, + $p<0.05$ Ham nanofiber grubundan farklı

6.8. Kontrol Grubu ve Nanofiber Esaslı Maruziyet Gruplarının Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Kontrol grupları ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının GST aktiviteleri karşılaştırıldığında laktaz enzimi immobilize edilen nanofiber grubunun ve BPA antikoru immobilize edilen nanofiber grubunun GST aktivitelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Ham nanofiber grubu ile kontrol grubu GST aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 27).



Şekil 27: Kontrol ve nanofiber esaslı maruziyet gruplarının GST aktiviteleri **GST:** Glutasyon S-Transferaz **prt:** Protein. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Ortalama değerler altı tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. * $p<0.05$ kontrol grubundan farklı, + $p<0.05$ Ham nanofiber grubundan farklı

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde nano boyutlu malzemeler ile ilgili sınırlı sayıda *in vivo* toksikolojik veri mevcuttur. Bu nedenle yeni geliştirilen inovatif özellik taşıyan spesifik nano boyutlu malzemelerin toksikolojik davranışlarını belirlemek zorlu bir süreçtir. Genellikle bu tür durumlarda benzer özellikteki nano malzemeler için daha önceden tanımlanmış bilgilerden yola çıkılarak çeşitli analizler yapılmaktadır. Yaygın kullanım alanlarına sahip olan bazı nano malzemelerin bile toksik etkileri ve mekanizmaları halen net bir şekilde belirlenmemiştir. Yapılan birçok çalışmada; nano malzemelerin toksik özellikleri nano ölçekli boyutlarına ve yüzey alanlarına göre değerlendirilmekte ve istenmeyen etkiler ile karşılaşılmaktadır. Bu nedenle medikal veya gıda alanında kullanıma yönelik olarak geliştirilen nanoteknoloji temelli ürünler için geleneksel toksikolojiden farklı olarak, toksisite değerlendirmesi, kimyasal içerik analizlerinin yanı sıra *in vivo* biyolojik sistemler kullanılarak test edilmesi gerekmektedir. Özellikle gıda endüstrisi ve medikal uygulamalarda kullanılacak olan nano malzemelerin toksik etkilerinin test edilmesi gerektiği aşıkardır (Krüger ve Krug, 2011; Abbot ve Cyranosk, 2003)

Çalışmamızda PCL/SF esaslı nanofibere fiziksel adsorpsiyon yöntemi kullanılarak immobilize edilen laktaz enzimi ve çapraz bağlama yöntemi kullanılarak immobilize edilen antikor içeren iki farklı amaca yönelik biyoaktif nanofiberin (Gurel- Gokmen B ve ark., 2021; Taslak HD ve ark., 2019) toksikolojik ve oksidatif özellikleri Zebra balığı (*Danio rerio*) kullanılarak test edilmiştir. PCL ve ipek fibroin polimerlerinin kullanımının tıbbi malzeme üretimi için uygunluğu bilinmesine rağmen, hibrid polimerin hazırlanması sırasında kullanılan çözücülerin, nanofiber üretiminde kullanılan elektro dokuma yönteminin ve enzim veya antikor immobilizasyonunda kullanılan kimyasal ajanların toksik etkisinin olup olmadığının belirlenmesi ürün geliştirme sürecinde önemli bir adımdır. Mevcut nano malzemelerin çoğunun toksisite verileri *in vitro* test sonuçlarına dayanmakta ve çelişkili birçok sonuçlar sunmaktadır. Validasyon çalışmaları yapılmış *in vitro* araştırmalar önemli veri kaynağı olmalarına rağmen ve deney hayvanı kullanımını azaltmasına rağmen organizmayı tam olarak temsil etmediği için, elde edilen verilerin *in vivo* testler ile

de doğrulanması gerekmektedir. Deney hayvanları kullanılarak yapılan toksikoloji testleri etik açıdan her malzeme için uygun olmamakla birlikte, daha kolay ve ucuz metotlar geliştirilmeye başlanmıştır. Son yıllarda Zebra balıkları toksikoloji temelli birçok araştırmada insan hücre metabolizması ile arasındaki benzerlikler nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir (Uren-Webster ve ark, 2010).

Ulusal Sağlık Enstitüleri, alternatif bir hayvan modeli olarak zebra balığını aktif olarak desteklemektedir. (Parnig ve ark., 2002)

Günümüzde toksikolojik testlerde Zebra balıklarının model organizma olarak kullanılma nedenleri; dayanıklı bir tür olmaları, kolay bulunmaları, laboratuvar ortamında yumurta bırakabilmeleri, kolay beslenebilmeleri ve çoğalmaları, ergin dişilerin haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakabilmeleri, dış döllenme ile üremeleri, yumurta ve embriyolarının saydam oluşu, yumurta ve larvaların gelişimlerinin kolay izlenebilmesi, jenerasyon zamanlarının kısa olması, insan ve diğer omurgalıların genom yapılarının benzer oluşu, metabolizma ve embriyonik gelişimlerinin hemen hemen aynı olmasıdır (Atasayar, 2011).

Çalışmamızda laktaz enzimi veya BPA antikoru immobilize edilerek biyoaktif hale getirilen PCL/SF esaslı nanofiber, 1 saat ve 10 saat süre ile Zebra balığı embriyolarının gelişme ortamında bekletilmiştir. Bekleme sürelerinin sonunda ortamdan çıkartılarak embriyolar bu gelişme ortamına bırakılmışlardır. Bu ortamlarda embriyoların gelişimleri izlenerek hazırladığımız biyoaktif nanofiberin olası toksikolojik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan metot çoğunlukla ilaçların veya çevre kirleticilerin olası toksik etkilerini araştırmada kullanılan metotlar (Üstündağ ve ark., 2017; Ateş ve ark., 2018) modifiye edilerek belirlenmiş ve nanomalzemelerin olası toksikolojik etkilerinin belirlenmesi için kullanılabilecek bir yöntemin adımları tespit edilmiştir.

Çalışmamızda PCL/SF esaslı nanofiber laktaz enzimi ve bisfenol A antikoru immobilize edilerek biyoaktif hale getirildiğinden bu proteinlerin kullanılması ile antijenik reaksiyonların oluşması gibi olası olumsuz sonuçlar bir risk

oluşturmaktadır. Bu nedenle herhangi bir beklenmeyen etkinin önlenmesi için toksikolojik test metotlarının geliştirilmesi gerekmektedir

Falinski ve ark (2019), nano boyutlu malzemelerin toksisitesi belirlenirken sulu ortamda yapılan biyoanalizlerin faydasını ve doğruluğunu artırmak için uygun sistem koşullarında nano boyutlu malzemelerin biyolojik sistemlerde birikiminin değerlendirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Bu doğrultuda çalışmamızda PCL/SF esaslı biyoaktif nanofiberin, zebra balığı embriyolarında birikerek bir oksidatif hasara neden olup olmadığı zebra balığı embriyo homojenatlarında MDA, GST, SOD ve NO tayinleri yapılarak araştırılmıştır.

Chowdhry ve ark (2019) elde ettikleri karbon nanotüpleri yüzey modifikasyonunda kullandıkları kimyasal maddelerin toksikolojik etkiye sebep olup olmadığını zebra balığı embriyolarında araştırmışlardır. Çalışmalarında embriyoları farklı konsantrasyonlarda modifikasyon ajanlarına maruz bırakmışlardır. Bizim çalışmamızda ise embriyolar, enzim veya antikor immobilizasyonu ile modifiye edilen nanofiberler ile farklı sürelerde inkübe edilerek maruziyet oluşturulmuştur.

Ateş ve ark (2017) metilparaben'in zebra balığı embriyolarının oksidan-antioksidan sistemi, ölüm kalım oranı ve malformasyon oluşumunu inceledikleri çalışmalarında kontrol grubu embriyolarında mevcut olmayan kuyruk defekti, perikardiyal ödem ve pigmentasyon defektini metilparaben maruziyetine bırakılan embriyolarda tespit etmişlerdir. Ayrıca metilparaben maruziyetine bırakılan embriyoların ölüm oranının kontrol grubu embriyolarına göre anlamlı şekilde arttığını göstermişlerdir. Metilparaben grubunda kontrol grubuna göre GST aktivitesi ve NO seviyesinde anlamlı azalma tespit edilmişken, LPO seviyesinin metilparaben grubunda hafif ama anlamlı olarak arttığını tespit etmiştir.

Üstündağ ve ark (2019)'nın farklı dalga boylarındaki ışık şiddetine maruz bıraktıkları zebra balığı embriyolarının oksidan-antioksidan sistemi, ölüm kalım oranı ve malformasyon oluşumunu inceledikleri çalışmalarında, beyaz LED (7200 K) ışığa

maruz kalan embriyoların lipid peroksidasyon seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığını ve SOD ve GST enzimlerinin aktivitelerinin ise azaldığını tespit etmişlerdir. Yeşil LED (515–535 nm) ışığına maruz bırakılan embriyolarında, LPO seviyelerindeki artış, diğer maruziyet gruplarında daha az olarak tespit edilmiştir. Kırmızı LED (515–535 nm) maruz kalan grupta ise kontrol grubuna göre LPO ve NO seviyelerinde anlamlı artış, SOD ve GST aktivitelerinde anlamlı azalma tespit etmişlerdir.

Üstündağ ve ark (2017) zebra balığı embriyolarını BPA'nın ve DEHP'nin letal dozu belirlemek için zebra balığı embriyolarını kullanmışlardır. Embriyoları DEHP (Di-2-Etilhekzil ftalat) ve BPA'ya maruz bıraktıkları çalışmalarında, embriyoların gelişimlerini 120 saate kadar takip etmişlerdir. Hem BPA hem de DEHP maruziyeti gruplarında aksiyal malformasyonlar, perikardiyal ödem ve besin kesesi ödemi tespit etmişlerdir. DEHP'nin Zebra balığı embriyolarında kuluçkadan çıkış oranını kontrol grubuna kıyasla 48 ve 72 saatte önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir.

Scopel ve ark (2019) farklı konsantrasyonlarda BPA'ya maruz bırakılan zebra balığı embriyoları 24, 48, 72 ve 96 saat maruziyetten sonra embriyoların ölüm oranı, kalp atış hızı, koryondan çıkma ve anomalilerin varlığı açısından analiz edilmiştir. Sonuçlar, zebra balığı embriyolarında BPA'nın belirgin bir sitotoksitesinin olduğunu göstermiştir. 70 µM'den daha yüksek BPA konsantrasyonları, 24 saat kadar erken maruziyet sonucunda bile embriyoların ölümüyle sonuçlanan çeşitli toksik etkilere neden olduğu gözlemlenmiştir.

Matos ve ark (2019) yaptıkları çalışmada ZnS ve CdS kuantum noktalarının toksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında Zebra balıklarını kullanmışlardır. Artan konsantrasyon ile birikim oranının da arttığını tespit etmişlerdir.

Wang ve ark (2020) Zebra balığında yüzey amino gruplarına sahip katyonik PAMAM dendrimerlerin 24 saat inkübasyon sonrası % 100 ölüme neden olduğu, amino asit etanol yüzey gruplarına sahip nötr PAMAM dendrimerler ve süksinamik

asit uç gruplarına sahip anyonik dendrimerlerin ise katyonik amin gruplu dendrimerlere göre daha az toksik olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda laktaz enzimi ve BPA antikoru immobilize edilen nanofiberler ayrı ayrı E3 embriyo gelişme ortamında bekletildiğinde, BPA antikoru immobilize edilen nanofiber 10 saat süre ile E3 ortamında bekletildikten sonra ortama bırakılan embriyoların hepsi 24 hpf sonunda ölürken, 1 saat süre ile E3 ortamında bekletilen BPA antikoru immobilize edilen nanofiber grubunda ise 24, 48 ve 72 hpf'de mortalite oranları arasında zamana bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. BPA immobilize edilen nanofiberin 10 saat süre ile E3 ortamında bekletildikten sonra ortamdaki embriyoların ölüm nedeni olarak kovalent immobilizasyon tekniğinde kullanılan kimyasal ajandan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bunun dışında 10 saat nanofiberin E3 ortamında bekletilmesi sonucunda BPA antikorunun ortama karıştığı ve toksik etkiye neden olması da bir olasılık olarak belirlenmiştir. 1 saat süre ile E3 ortamında bekletilen BPA immobilize edilmiş nanofiberin herhangi bir toksik etki oluşturmamış olması, biyoaktif nanofiberin 1 saatlik temas için uygun olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada letal ilaç dozunun belirlenmesine benzer şekilde nanofiberin BPA uzaklaştırmak için içerisine konulacağı sıvı ile temas süresi belirlenmiştir. Laktaz enziminin immobilize edildiği nanofiberin 10 saat süre ile E3 embriyo ortamında bekletilmesi sonucunda ise 24, 48 ve 72 hpf'de mortalite yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

Bulgularımız BPA antikoru immobilize edilmiş nanofiberin 1 saat süre ile E3 embriyo ortamında bekletilmesinin uygun olduğunu, laktaz enzimi immobilize edilmiş nanofiber için ise 10 saat ve altındaki süreler için E3 embriyo ortamında bekletilmesinin uygun olduğunu göstermektedir. 72 hpf'de gruplar karşılaştırıldığında ham nanofiber, laktaz enzimi immobilize nanofiber ve BPA antikoru immobilize nanofiber grupları, kontrol grubuyla kıyaslandığında, mortalite oranlarında ve kuluçkadan çıkma oranları arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir.

Oksidatif hasarı incelemek amacıyla test edilen MDA değerleri; laktaz enzimi immobilize nanofiber ve BPA antikoru immobilize nanofiber grubu embriyolarda kontrol grubu embriyolarına göre anlamlı bir şekilde artarken; NO değerleri, SOD ve GST enzim aktiviteleri azalmıştır. Ham nanofiber grubu ile kontrol grubunun MDA değeri, SOD ve GST enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. NO değeri ise tüm nanofiber maruziyet gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Laktaz enzimi ve BPA antikoru immobilize gruplarındaki embriyoların SOD ve GST enzimlerinin aktiviteleri arasında bir farklılık tespit edilmemiştir. SOD ve GST aktivitelerindeki azalma en çok laktaz enzimi ve BPA antikoru immobilize gruplarda olmuştur. Embriyo homojenatlarında tespit edilen bu değişimler çok hafif seyrettiği için embriyoların mortalitesine ve kuluçkadan çıkış sürelerine etki etmemiştir.

Antikor veya enzim immobilizasyonu yapılarak biyoaktif hale getirilen PCL/SF esaslı nanofiberin toksikolojik ve oksidatif özellikleri zebra balığı embriyoları kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz biyoaktif nanofiberlerin 1 saat süre ile sıvı ile teması sonrası toksikolojik etkiye neden olmadığı, hafif bir şekilde etkilenen oksidan antioksidan dengesini ise zebra balığı embriyolarında herhangi bir deformasyona ve mortaliteye neden olmadığı tespit edilmiştir. Nanofiberlerin toksikolojik testlerinin zebra balığı embriyoları kullanılarak yapılması, hem araştırmalara hem de biyomalzeme üretimine yönelik yeni bir test metodu geliştirilmesine zemin hazırlamaktadır.

Sonuç olarak Zebra balığı embriyoları yalnızca yetişkin balıklarla yapılan deneyler için değil, aynı zamanda memeli türleri ile yapılan deneyler için de bir alternatif olarak hizmet ettiğinden, medikal ürün araştırma ve geliştirme çalışmalarının kapsamına da alınarak yeni geliştirilen medikal ürünlerin güvenilirliğine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

8.KAYNAKLAR

Abbott A, Cyranosk Di, Biology's new dimensions. Nature. 2003;420: 870-2

Atasayar Z. Zebra Balığında (Denio reio) Peroksiredoksin 6geni rs 41055489 Polimorfizminin Antioksidatif Göstergeler Ve Ağır Metal Düzeyleriyle İlişkisi. M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2011 (Danışman: Prof. Dr. EK Figen).

Ateş PS, Unal I, Ustundag UV, Alturfan AA, Yigitbaşı T, Emekli- Alturfan E. Methylparaben induces malformations and alterations on apoptosis, oxidant-antioxidant status, ccnd1 and myca expressions in zebrafish embryos. J. Biochem. Mol. Toxicol. 2018;32:1-6

Bagshaw KD, Sharma SK, Burke PJ, Melton RG, Knox RJ. Developments with targeted enzymes in cancer therapy. Curr. Opin. Immunol. 1999;11:579–83

Bailey J, Oliveri A, Levin ED. Zebrafish model systems for developmental neurobehavioral toxicology. Birth Defects Res. C Embryo Today. 2013; 99:14-23

Bambino K, Chu J. Chapter Nine - Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. In Current Topics in Developmental Biology 1st ed. Newyork: Academic Press; 2017, p. 331-367.

Beck-Speier I, Dayal N, Karg E, Maier K, Schumann G, Schulz H, Heyder, J. Oxidative stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultrafine particles. Free Radic. Biol. Med. 2005;38:1080-92

Bergamaschi E, Bussolati O, Magrini A, Bottini M, Migliore L, Bellucci S, Iavicoli I, Bergamaschi A. Nanomaterials and lung toxicity: interactions with airways cells and relevance for occupational health risk assessment. Int J Immunopathol. 2006;19:3-10

Brannen KC, Panzica-Kelly JM, Danberry TL, Augustine-Rauch KA. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2010;89:66-77

Carr, PW. Bowers LD. Support considerations in chemical analysisl enzymes. New York: Academic Press. 1980;9:117-123

Chen HW, Su SF, Chien CT, Lin WS, Yu SL, Chou CC, Jerremy J, Chen W, Yang PC. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *Faseb J.* 2006;20:2393-5

Chowdhry A, Kaur J, Khatri M, Puri V, Tuli R, Puri S. Characterization of functionalized multiwalled carbon nanotubes and comparison of their cellular toxicity between HEK 293 cells and zebra fish in vivo. *Heliyon.* 2019;5:1-11

Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech.* 2013;3:1–9

Duffin R, Gilmour PS, Schins RPF, Clouter A, Guy K, Brown DM, MacNee W, Borm PJ, Donalds K, Stone V. Aluminium lactate treatment of DQ12 quartz inhibits its ability to cause inflammation, chemokine expression and Nuclear Factor-B Activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001;176:10-17

Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs.* 2015;7:9–14

Ekaterina D. Yushkova, Elena A. Nazarova, Anna V. Matyuhina, Alina O. Noskova, Darya O. Shavronskaya, Vladimir V. Vinogradov, Natalia N. Skvortsova, Elena F. Krivoshapkina. Application of Immobilized Enzymes in Food Industry. *J. Agric. Food Chem.* 2019;67:11553-67

Falinski MM, Garland MA, Hashmi SM, Tanguay RL, Zimmerman JB. Establishing structure-property-hazard relationships for multi-walled carbon nanotubes: the role of aggregation, surface charge, and oxidative stress on embryonic zebrafish mortality. *Carbon*. 2019;155:587–600

Gandhi S, Suman P, Kumar A , Sharma P, Capalash N, Suri CR. Recent advances in immunosensor for narcotic drug detection. *Bioimpacts*. 2015;5:207-13

Goessling W, Sadler KC. Zebrafish: an important tool for liver disease research. *Gastroenterology*. 2015;149:1361-77

Goldenberg M. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clinical Therapeutics*. 1999;21:309-18

Gorantla M, Boone SE, El-Ashry M, Young D. Continuous polymer nanofibers by extrusion into a viscous medium: A modified wet-spinning technique. *Appl. Phys. Lett.* 2006;88:073-115

Greiner A, Wendorff HJ. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Appl. Organomet. Chem.* 2007;45:5670-5703

Haffter P, Nusslein-Volhard C. Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish. *Int. J. Dev. Biol.* 1996;40:7-221

Gurel- Gokmen B, Taslak HD, Özcan O, İpar N, Tunali- Akbay T. Polycaprolactone/silk fibroin electrospun nanofibers- based lateral flow test strip for quick and facile determination of bisphenol A in breast milk. *J Biomed Mater Res*. 2021;109:1455–1464

Habig WH, Jacoby WB. Assays for differentiation of glutathion-s-transferases. *Meth. Enzymol.* 1981;77:398-405

Hardy JG, Romer LM, Scheibel TR. Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer*. 2008;49:4309-27

Harris B. Exploiting antibodybased technologies to manage environmental pollution. *Trends Biotechnol*. 1999;17:290–96

Hassan ME, Tamer TM, Omer AM. Methods of enzyme immobilization. *Int. J. Curr. Pharm. Res.*. 2016;7:385–392

He JH. Electrospun and Their Application. *Int. J. Nonlinear Sci. Numer. Simul.* 2005;6:2-93

Hemalatha V, Kalyani P, Chandana VK, Hemalatha KPJ. Methods, applications of immobilized enzymes-a mini review . *Int. J. Eng. Sci. Technol*. 2016;11:523–526

Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R. Enzyme immobilization. An update. *Int. J. Biol. Chem*. 2013;6:185–205

Horváth L, Magrez A, Schwaller B, Forró L. Toxicity study of nanofibers. *J. Supramol. Struct*. 2011;10:133-149

Jeng HA, Swanson J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J. Environ. Sci. Health A* 2006;41:2699-711

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*. *Anat. Rec*. 1995; 203:253-310

Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2002;13:345-51

Krüger P, Krug HF, Nanomaterials Risk Assessment, 10 Years of Research: Risk Assessment. Human and Environmental Toxicology of Nanomaterials. 2011

Larsen G, Spretz R, Velarde-Ortiz, Use of Coaxial Gas Jackets to Stabilize Taylor Cones of Volatile Solutions and to Induce Particle-to-Fiber Transitions. Adv. Mater.. 2004;16:166-9

Leget GA, Czuczman MS. Use of rituximab, the new FDA-approved antibody. Curr Opin Oncol. 1998;10:548-51

Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. Nat. Rev. Genet. 2007;8:353–67

Li X, Yao C, Sun F, Song T, Li Y, Pu Y. Conjugate Electrospinning of Continuous Nanofiber Yarn of Poly(L-lactide)/Nanotritalcium Phosphate Nanocomposite. J. Appl. Polym. Sci. 2008;107:3756–3764

Loomis TA.. Essentials of Toxicology, 3rd Ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1978, p:157-232

Lowry O H. Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Int. J. Biol. Chem. 1951;193:265-275.

Lyons J, Li C, Ko F. Melt-electrospinning part I: processing parameters and geometric properties. Polymer. 2004;45:7597–7603

Magrez A, Kasas S, Salicio V, Pasquier N, Seo JW, Celio M, Catsicas S, Schwaller B, Forró, L. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. Nano Lett. 2006;6:1121–5

Makaraviciute A, Ramanaviciene A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. Biosens. Bioelectron. 2013;50:460-71

Matos B, Martins M, Samamed AC, Sousa D, Ferreira I, Diniz MS. Toxicity Evaluation of Quantum Dots (ZnS and CdS) Singly and Combined in Zebrafish (Danio rerio). *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2020;17:232

Milan DJ, Peterson TA, Ruskin JN, Peterson RT, MacRae CA. Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish. *Circ. J.* 2003;8:1070-1355

Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide*. 2001;5:62-71

Mishra P, Banga I, Tyagi R, Munjal T, Goel A, Capalash N, Sharma P, Suri CR, Gandhi S. An immunochromatographic dipstick as an alternate for monitoring of heroin metabolites in urine samples. *RSC Adv*. 2018;8:23163–70

Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006;311: 622-7

Nguyen HHM. An overview of techniques in enzyme immobilization. *Applied Appl. sci. convergence technol*. 2017;26:157-163

Nisha S, Karthick SA, Gobi N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Chem. Rev. Lett*. 2012;1:148-155

Nishimura Y, Murakami S, Ashikawa Y, Sasagawa S, Umemoto N, Shimada Y, Tanaka T. Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2015;55:1-16

Nüsslein-Volhard C, Dahm R. Zebrafish: A Practical Approach. 1st ed: Cambridge University Press; 2002 p:79-83

Padilla S, Hunter DL, Padnos, B, Frady S, MacPhail RC. Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables. *Neurotoxicol. Teratol.* 2011;33:624-30

Parng C, Seng WL, Semino C, McGrath P. Zebrafish: A Preclinical Model for Drug Screening. *Assay Drug Dev Technol.* 2002;1:41-8

Patanaik A, Anandjiwala RD, Rengasamy RS, Ghosh A, Pal H. Nanotechnology in fibrous materials-a new perspective, Nanotechnology in fibrous materials-a new perspective. *Text. Prog.* 2007;39:67-120

Peal DS, Peterson RT, Milan D. Small molecule screening in zebrafish. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010;3:454–460

Peterson RT, Macrae CA. Systematic approaches to toxicology in the zebrafish. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2012;52:433-53

Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WAH, Seaton A, Stone V, Brown S, MacNee W, Donaldson K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat. Nanotechnol.* 2008;3:423–8

Ramansuri C, Boro R, Nangia Y, Gandhi S, Sharma P, Wangoo N, Rajesh K, Shekhawat GS. Immunoanalytical techniques for analyzing pesticides in the environment. *Trends Analyt Chem.* 2009;28:29–39

Ramansuri C, Kaur J, Gandhi S, Shekhawat GS. Label-free ultra-sensitive detection of atrazine based on nanomechanics. *Nanotechnology.* 2008;19:1-6

Rehn B, Seiler F, Rehn S, Btuch J, Majer M. Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: Untreated and surface treated. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003;189:84-95

Rennekamp AJ, Peterson RT. 15 years of zebrafish chemical screening. *Curr Opin Chem Biol.* 2015;24:58-70

Roberts A, Shahdeo D, Shahdeo, Gandhi S. *Advancement of Immobilization Techniques in Forensic Science.* 1st ed. UK: Springer; 2020 p: 475-502

Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental techniques.* 1st ed. London: Methuen Co LTD;1959 p:31-57

Sabraa S, Ragabb DM, Agwad MM, Rohani S. Recent advances in electrospun nanofibers for some biomedical applications. *Eur J Pharm Sci.* 2010;144;1-18

Schäfer T, Borchert TW, Nielsen VS, Skagerlind P, Gibson K, Wenger K, Hatzack F, Nilsson LD, Salmon S, Pedersen S, Heldt-Hansen HP, Poulsen PB, Lund H, Peter Keith Gibson, Kevin Wenger, Frank Hatzack, Lone Dybdal Nilsson · Sonja Salmon · Sven Pedersen, Oxenbøll KM, Wu GF, Høst H, Xu H Novozymes A/S, Krogshøjvej. *Industrial enzymes. White biotechnology,* 1st ed Hannover: Springer-Verlag Berlin Heidelberg ;2006,p:59-131.

Scholz S, Fischer S, Gundel U, Kuster E, Luckenbach T, Voelker D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment – applications beyond acute toxicity testing. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2008;15:394–404

Selderslaghs IWT, Hooyberghs J, De Coen W, Witters HE. Locomotor activity in zebrafish embryos: a new method to assess developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol.* 2010;32:460–71

Schrand AM, Dai L, Schlager JJ, Hussain SM. (2012). *Toxicity testing of nanomaterials. New technologies for toxicity testing.* 1st ed. UK: Springer Science+Business Media, LLC Landes Bioscience ;2012 p:58-75.

Sharma P, Gandhi S, Chopra A, Sekar N, Suri CR. Fluoroimmunoassay based on suppression of fluorescence self-quenching for ultra-sensitive detection of herbicide diuron. *Anal. Chim. Acta.* 2010;676:87–92

Sipes NS, Padilla S, Knudsen TB. Zebrafish: as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Birth Defects Res. C Embryo Today.* 2011;93:256-67

Sridhar R, Lakshminarayanan R, Madhaiyan K, Barathi VA, Lim KHC, Ramakrishna S. Electrosprayed nanoparticles and electrospun nanofibers based on natural materials: applications in tissue regeneration, drug delivery and pharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* 2015;44:790-814

Sukardi H, Chng HT, Chan EC, Gong Z, Lam SH. Zebrafish for drug toxicity screening: bridging the in vitro cell-based models and in vivo mammalian models. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011;7:579–589

Taslak HD, Gurel-Gokmen B, Ozcan O, Tunali-Akbay, T. Usage of bioactivated PCL nanofiber as a fluoxetine capturing matrix in milk. *Sep Sci Technol* , 2020;55:5:828-834

Teo WE, Inai R, Ramakrishna S. Technological advances in electrospinning of nanofibers. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2011;12:3-9

Tey JN, Gandhi S, Wijaya IPM, Palaniappan AL, Wei J, Rodriguez I, Suri CR, Mhaisalkar GS. Direct detection of heroin metabolites using a competitive immunoassay based on a carbon-nanotube liquid-gated field-effect transistor. *Small.* 2010;6:993–8

Tunali-Akbay T, Kahraman M.V, Oktay B, Ipekci H, Kayaman-Apohan N. Development of nanofiber based immunosorbent surface for the removal of fluoxetine from breast milk. *Int. J. Polym. Mater.* 2018;68:947-55

Uhlrig H. Industrial Enzymes and Their Applications, 1st ed. Usa: John Wiley & Soms; 1998, p:8-26.

Um IC, Fang D, Hsiao BS, Okamoto A, Chu B. Electro-Spinning and Electro-Blowing of Hyaluronic Acid. Biomacromolecules. 2004;5:14-28

Unal I. Zebra Balıklarında Rotenon İle Oluşturulan Deneysel Parkinson Modelinde Oleandrinin ve Mitokuinonun Olası Etkilerinin İncelenmesi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2018, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Ebru Işık Alturfan).

Unsal M. Kirililik Deneyleri- Yöntemler ve Sonuçların Değerlendirilmesi, T.C. Tarım ve Orman Köyişleri Bakanlığı Bodrum Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yay. 1998;11;168.

Uren-Webster TM, Lewis C, Filby A, Paull GC, Santos EM. Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. Aquatic Toxicology. 2010;99:360-9

Ustundag UV, Unal I, Ates, PS, Alturfan AA, Yigitbasi T, Alturfan EE. Oxidant-Antioxidant Status and c-myc Expression in BPA-and DEHP-Exposed Zebrafish Embryos. Eur. J. Biol. 2017;76:26-30

Ustundag UV, Caliskan-Ak E, Ates PS, Unal I, Egilmezer G, Yigitbas T, Alturfan AA, Alturfan-Emekli E. White LED light exposure inhibits the development and xanthophore pigmentation of zebrafish embryo. Sci. Rep. 2019;9:1:1-12

Ustundag UV, Unal I, Ates PS, Alturfan AA, Yiğitbaşı T, Emekli-Alturfan E. Bisphenol a and di (2-ethylhexyl) phthalate exert divergent effects on apoptosis and the Wnt/-catenin pathway in zebrafish embryos: A possible mechanism of endocrine disrupting chemical action. Toxicol Ind Health. 2017;33:12,901-10

Vashist SL, John HT. Antibody immobilization and surface functionalization chemistries for immunodiagnosics. In: Handbook of Immunoassay Technologies.1st ed. UK; Academic Press, 2018, p:19-46

Vollrath F, Porter D. Silks as Ancient Models for Moderns Polymers. Polymer. 2009;50:5623-32

Wang Y, Li C, Du L, Liu Y. A reactive oxygen species-responsive dendrimer with low cytotoxicity for efficient and targeted gene delivery. Chin Chem Lett. 2020;31:275-80

Ward AC, Lieschke GJ. The zebrafish as a model system for human disease. Front Biosci. 2002;7:827–33

Weitz RT, Harnau L, Rauschenbach S, Burghard M, Kern K. Polymer Nanofibers via Nozzle- Free Centrifugal Spinning. Nano Lett. 2008;8:1187-91

Weigt S, Huebler N, Strecker R, Braunbeck T, Broschard TH. Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology. 2011;281:25–36

Whittum-Hudson J A, An LL, Saltzman WM, Prendergast RA, Macdonald AB. Oral immunization with an anti-idiotypic antibody to the exoglycolipid antigen protects against experimental Chlamydia trachomatis infection. Nat. med. 1996;2:1116-21

Wijaya PM, Nie TJ, Gandhi S, Boro R, Palaniappan A, Hau GW, Rodriguez I, Suri CR, Mhaisalkar SG. Femtomolar detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides via competitive immunoassays using microfluidic based carbon nanotube liquid gated transistor. Lab Chip. 2010;10:634–638

Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Prog. Polym. Sci.* 2010;35:1217-56

Wu Y, Yu JY, He JH, Wan YQ. Controlling stability of the electrospun fiber by magnetic field, *Chaos. Chaos Solitons Fractals.* 2007;32:5–7

Xing X, Wang Y, Li B, Nanofiber drawing and nanodevice assembly in poly(trimethylene terephthalate). *Opt. Express.* 2008;16:10815-22

Zon LI, Peterson R. The new age of chemical screening in zebrafish. *Zebrafish.* 2010;7:1-2





