



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

**DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIMA UYGUN NANOLİFLERİN
ELEKTROEĞİRME İLE ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

FDK-2020-22175

Tez Projesi, Doktora

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. DİLEK ODACI DEMİRKOL
Fen Fakültesi/Biyokimya Bölümü/Biyokimya Anabilim Dalı

Araştırmacı:

Ozan YEŞİLTEPE
Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Ekim 2022
İZMİR

ÖNSÖZ

Polimer çözeltilerinden yola çıkarak elektroğirme teknolojisi ile nanoliflerin üretimi, işlem basamaklarının optimizasyonu, karakterizasyonu ve elde edilen platformların doku mühendisliği çalışmalarında kullanım potansiyellerinin araştırılması amacıyla yola çıkılan proje umut verici sonuçlarla noktalandırıldı. Proje kapsamında, deri doku mühendisliği alanında kullanım amacıyla Poli(ϵ -kaprolakton)–K-Karragenan–Çörek otu tohumu yağı (PCL-Kar/ÇOY) nanoliflerinden doku iskelesi geliştirilmesi ve Poli(ϵ -kaprolakton)–Selüloz asetat–Mandelik asit (PCL-CA/MA) nanoliflerinden yara örtüsü geliştirilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirildi.

“Doku Mühendisliğinde Kullanıma Uygun Nanoliflerin Elektroğirme ile Üretimi ve Karakterizasyonu” başlıklı doktora tez çalışması Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: FDK-2020-22175).

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Biyomalzeme.....	3
2.1.1. Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemelerin özellikleri	4
2.1.2. Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler.....	5
2.1.3. Polimer temelli doku iskelesi üretimi.....	8
2.2. Nanolif ve Elektroğirme	9
2.2.1. Elektroğirme ile üretilen nanoliflerin kullanım alanları	11
2.3. Deri Doku Mühendisliği.....	12
2.3.1. Nanoliflerin deri doku mühendisliğinde kullanımı	13
2.3.2. Yara iyileşme uygulamaları için nanolif üretimi.....	15
2.4. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL).....	17
2.5. Polisakkaritlerin Nanolif Üretiminde Kullanımı.....	19
2.5.1 K-Karragenan	23
2.5.2. Selüloz asetat (CA).....	24
2.6. <i>Nigella sativa</i>	25
2.7. Mandelik Asit	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Materyal	28
3.2. Kullanılan Cihazlar	28
3.3. PCL-Kar-ÇOY Nanoliflerinden Doku İskelesi Geliştirilmesi	29
3.3.1. PCL–Kar nanoliflerin üretilmesi ve elektroğirme parametrelerinin optimizasyonu	29
3.3.2. PCL–Kar nanoliflerin karakterizasyonu.....	30

3.3.2.1. Işık mikroskobu.....	30
3.3.2.2. Temas açısı	30
3.3.2.3. SEM.....	30
3.3.3. Nanoliflerin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri.....	31
3.3.4. PCL ve PCL-Kar nanoliflerinin FTIR analizleri.....	31
3.3.5. PCL ve PCL-Kar nanoliflerinin SEM-EDS analizlerinin gerçekleştirilmesi.....	31
3.3.6. <i>Nigella sativa</i> (çörek otu) yağı ile zenginleştirilen PCL-Kar nanoliflerinin üretimi ve elektroëirme parametrelerinin optimizasyonu.....	32
3.3.7. PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin karakterizasyonu	33
3.3.7.1. Işık mikroskobu.....	33
3.3.7.2. Temas açısı.....	33
3.3.7.3. SEM.....	33
3.3.8. PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri	33
3.3.9. PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin yara kapama etkinlikleri.....	34
3.3.10. Rhodamine B içeren PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin floresan mikroskop ile görüntülenmesi.....	35
3.3.11. PCL, PCL-Kar ve PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin şişme testleri.....	35
3.4. PCL-CA-MA Nanoliflerinden Yara Örtüsü Geliştirilmesi	36
3.4.1. PCL–CA nanoliflerin üretilmesi ve elektroëirme parametrelerinin optimizasyonu	36
3.4.2. PCL–CA nanoliflerin karakterizasyonu	37
3.4.2.1. Işık mikroskobu.....	37
3.4.2.2. Temas açısı.....	37
3.4.2.3. SEM.....	38
3.4.3. PCL-CA Nanoliflerin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri	38
3.4.4. PCL, CA ve PCL-CA nanoliflerinin FTIR analizleri.....	39
3.4.5. Mandelik asit (MA) içeren PCL-CA nanoliflerinin üretimi ve elektroëirme parametrelerinin optimizasyonu	39

3.4.6. PCL-CA-MA nanoliflerinin karakterizasyonu.....	40
3.4.6.1. Işık mikroskobu.....	40
3.4.6.2. Temas açısı.....	40
3.4.6.3. SEM.....	40
3.4.7. PCL-CA-MA nanoliflerinin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri	41
3.4.8. PCL-CA-MA nanoliflerinin yara kapama etkinlikleri	41
3.4.9. PCL-CA-MA nanoliflerinin zamana bağlı temas açısı ölçümleri.....	42
3.4.10. PCL, CA PCL-CA ve PCL-CA-MA nanoliflerinin şişme testleri	42
4. BULGULAR	43
4.1. PCL-Kar-ÇOY Nanoliflerinden Doku İskelesi Geliştirilmesi	43
4.1.1. PCL–Kar nanoliflerin karakterizasyonu.....	43
4.1.1.1. Işık mikroskobu.....	43
4.1.1.2. Temas açısı.....	43
4.1.1.3. SEM.....	44
4.1.2. Nanoliflerin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri.....	46
4.1.3. PCL ve PCL-Kar nanoliflerinin FTIR analizleri.....	47
4.1.4. PCL ve PCL-Kar nanoliflerinin SEM-EDS analizleri	48
4.1.5. PCL–Kar–ÇOY nanoliflerin karakterizasyonu	48
4.1.5.1. Işık mikroskobu.....	48
4.1.5.2. Temas açısı.....	49
4.1.5.3. SEM.....	50
4.1.6. PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri	52
4.1.7. PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin yara kapama etkinlikleri.....	52
4.1.8. Rhodamine B içeren PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin floresan mikroskop ile görüntülenmesi.....	54
4.1.9. PCL, PCL-Kar ve PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin şişme testleri.....	55
4.2. PCL-CA-MA Nanoliflerinden Yara Örtüsü Geliştirilmesi	55

4.2.1. PCL–CA nanoliflerin karakterizasyonu	55
4.2.1.1. Işıık mikroskobu.....	55
4.2.1.2. Temas açısı	56
4.2.1.3. SEM.....	57
4.2.2. PCL-CA Nanoliflerin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri	58
4.2.3. PCL, CA ve PCL-CA nanoliflerinin FTIR analizleri.....	60
4.2.4. PCL-CA-MA nanoliflerinin karakterizasyonu.....	60
4.2.4.1. Işıık mikroskobu.....	60
4.2.4.2. Temas açısı	61
4.2.4.3. SEM.....	62
4.2.5. PCL-CA-MA nanoliflerinin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri	64
4.2.6. PCL-CA-MA nanoliflerinin yara kapama etkinlikleri	64
4.2.7. PCL-CA-MA nanoliflerinin zamana bağlı temas açısı değerlerinin incelenmesi.....	66
4.2.8. PCL, CA, PCL-CA ve PCL-CA-MA nanoliflerinin şişme testleri	66
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ	77
KAYNAKLAR DİZİNİ	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Elektroğirme düzeneği	10
Şekil 2.2 Elektroğirme tekniği ile yara iyileşme uygulamaları için nanolif üretimi.	17
Şekil 2.3 Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL)	18
Şekil 2.4 Kappa karragenan	23
Şekil 2.5 Selüloz asetat	24
Şekil 2.6 Mandelik asit.....	27
Şekil 3.1 Culture-Insert kullanılarak oluşturulan yara kapama modeli çalışması.....	35
Şekil 4.1 PCL-Kar nanoliflerinin ışık mikroskobu görüntüleri.....	43
Şekil 4.2 PCL-Kar nanoliflerinin temas açısı görüntüleri.....	44
Şekil 4.3 PCL-Kar nanoliflerinin SEM mikrografları ve lif çapı dağılım histogramları	46
Şekil 4.4 PCL-Karragenan nanolifleri üzerinde 48 saat süresince kültive edilen HaCaT hücrelerinin canlılığı..	46
Şekil 4.5 PCL-Karragenan nanolifleri üzerinde 72 saat süresince kültive edilen HaCaT hücrelerinin canlılığı..	47
Şekil 4.6 PCL, PCL-Kar (7:3, v:v), K-Karragenan için elde edilen FTIR spektrumları.	47
Şekil 4.7 PCL [A] ve PCL-Kar (7:3, v:v) [B] nanoliflerinin SEM-EDS sonuçları doğrultusunda elde edilen spektrumları	48
Şekil 4.8 PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin ışık mikroskobu görüntüleri.....	49
Şekil 4.9 PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin temas açısı görüntüleri.....	49
Şekil 4.10 PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin SEM mikrografları.....	51
Şekil 4.11 1:PCL-Kar ve PCL-Kar-ÇOY nanolifleri üzerinde 72 saat süresince kültive edilen HaCaT hücrelerinin canlılığı.	52
Şekil 4.12 PCL-Kar (7:3, v:v) ve PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri üzerinde Culture-Insert kullanılarak oluşturulan yara açıklığının farklı zaman aralıklarında mikroskop görüntüleri	53
Şekil 4.13 PCL-Kar (7:3, v:v) ve PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri üzerinde kültive edilen HaCaT hücrelerinin yara kapama etkinlikleri	54
Şekil 4.14 Rhodamine B içeren PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri ve üzerinde 72 saat süreyle kültive edilen HaCaT hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri.	54
Şekil 4.15 PCL, PCL-Kar (7:3, v:v), PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri için elde edilen şişme testi sonuçları	55

Şekil 4.16 PCL, PCL-CA ve CA nanoliflerinin ışık mikroskobu görüntüleri	56
Şekil 4.17 PCL, PCL-CA ve CA nanoliflerinin temas açısı görüntüleri	56
Şekil 4.18 PCL, PCL-CA ve CA nanoliflerinin SEM mikrografları ve lif çapı dağılım histogramları.....	58
Şekil 4.19 PCL, CA ve PCL-CA nanoliflerinin A) 24 saat, B) 48 saat ve C) 72 saat kültivasyon süreleri sonunda HaCaT hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri.	59
Şekil 4.201 PCL-CA-MA nanoliflerinin ışık mikroskobu görüntüleri	61
Şekil 4.212 PCL-CA-MA nanoliflerinin temas açısı görüntüleri	61
Şekil 4.223 PCL-CA-MA nanoliflerinin SEM mikrografları ve lif çapı dağılım histogramları	63
Şekil 4.234 PCL-CA ve PCL-CA-MA nanoliflerinin A) 24 saat, B) 48 saat ve C) 72 saat kültivasyon süreleri sonunda HaCaT hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri.	64
Şekil 4.245 Culture-Insert kullanılarak HaCaT hücreleri üzerinde oluşturulan yara açıklığının PCL-CA (9:1, v:v) ve PCL-CA-MA (25 mM) nanolifleri ile yara kapama etkinliklerinin farklı zaman aralıklarında mikroskop görüntüleri	65
Şekil 4.256 PCL-CA (9:1, v:v) ve PCL-CA-MA (25 mM) nanoliflerinin HaCaT hücreleri üzerinde yara kapama etkinlikleri.	65
Şekil 4.267 PCL-CA-MA (25 mM) nanoliflerinin zamana bağlı olarak (0-1-5-10-15-30-45-60 dk) temas açılarında meydana gelen değişim.....	66
Şekil 4.278 PCL, CA, PCL-CA (9:1), PCL-CA-MA (25mM) nanolifleri için elde edilen şişme testi sonuçları.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Farklı biyomalzeme türlerinin avantajları, dezavantajları ve ana klinik kullanımları .	6
Çizelge 2.2 Doku iskelesi üretim teknikleri	7
Çizelge 2.3 Elektroeğirme ile üretilen liflerin çeşitli biyomedikal uygulamaları.	11
Çizelge 2.4 Yara iyileşme uygulamalarında çeşitli polimerlerden elektroeğirme ile üretilen nanoliflerin kullanımı.	16
Çizelge 2.5 Farklı polisakkaritler ve polimerler kullanılarak elde edilen nanolifler ve kullanım alanları.	20
Çizelge 3.1 Elektroeğirme çözeltilerinin içeriği.	29
Çizelge 3.2 PCL-Kar nanoliflerinin elektroeğirme parametreleri	29
Çizelge 3.3 Elektroeğirme çözeltilerinin içeriği	32
Çizelge 3.4 PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin elektroeğirme parametreleri.	32
Çizelge 3.5 PCL-CA Elektroeğirme çözeltilerinin içeriği	36
Çizelge 3.6 PCL-CA nanoliflerinin elektroeğirme parametreleri	37
Çizelge 3.7 PCL-CA-MA Elektroeğirme çözeltilerinin içeriği	39
Çizelge 3.8 PCL-CA-MA nanoliflerinin elektroeğirme parametreleri	39
Çizelge 4.1 PCL-Kar nanoliflerinin temas açısı ölçüm değerleri.	44
Çizelge 4.2 PCL-Kar nanoliflerinin ortalama lif çapları.	44
Çizelge 4.3 PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin temas açısı ölçüm değerleri	49
Çizelge 4.4 PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin ortalama lif çapları	50
Çizelge 4.5 PCL, CA ve PCL-CA nanoliflerinin temas açısı ölçüm değerleri.	57
Çizelge 4.6 PCL, CA ve PCL-CA nanoliflerinin ortalama lif çapları	57
Çizelge 4.7 PCL-CA-MA nanoliflerinin temas açısı ölçüm değerleri.	61
Çizelge 4.8 PCL-CA-MA nanoliflerinin ortalama lif çapları	62
Çizelge 4.9 PCL-CA-MA (25 Mm) nanoliflerine ait 0-1-5-10-15-30-45 ve 60 dk sonunda elde edilen temas açısı ölçüm değerleri	66

ÖZET

DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIMA UYGUN NANOLİFLERİN ELEKTROEĞİRME İLE ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Bu çalışmada, elektroegirmeyle üretilen nanoliflerden deri doku mühendisliğinde kullanılmak amacıyla doku iskelesi ve yara örtüsü geliştirildi. Deri doku mühendisliğinde yara iyileşme uygulamalarında kullanılmak amacıyla poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), K-karragenan (Kar) ve *Nigella sativa* tohum yağı (NSO) kullanılarak nanolifler üretildi. PCL-KAR-ÇOY nanoliflerinin hücre canlılığı üzerine etkileri DAPI kullanılarak floresans mikroskop yardımıyla belirlenirken, yara iyileşme aktivitelerinin araştırılmasında culture insertler kullanıldı. 10 mg/mL çörek otu yağı içeren PCL-Kar-ÇOY nanolifleri kontrole kıyasla 48 ve 72 saat boyunca sırasıyla $43,16 \pm 15,56$ ve $48,33 \pm 14,72$ yara iyileşme aktivitesi göstererek daha etkili bulundu. Nanolif temelli biyoaktif yara örtülerinin geliştirilmesi amacıyla PCL, selüloz asetat (CA) ve mandelik asit (MA) kullanıldı. PCL-CA-MA nanoliflerinin HaCaT hücre canlılığına etkileri MTT testi ile belirlendi. 25 mM MA içeren PCL-CA nanolifleri en etkin konsantrasyon olarak belirlendi. PCL-CA-MA (25 mM) nanolifleri (sırasıyla 4, 6 ve 8 saat için $39,35 \pm 12,46$; $65,31 \pm 10,74$ ve $94,78 \pm 6,77$) kontrol grubuna (sırasıyla 4, 6 ve 8 saat için $17,88 \pm 3,34$; $19,36 \pm 6,64$ ve $29,07 \pm 7,66$) kıyasla çok kısa sürede oldukça yüksek bir yara iyileşme aktivitesi gösterdi.

Anahtar sözcükler: Biyomalzeme, doku mühendisliği, nanobiyoteknoloji, nanolif, poli(ϵ -kaprolakton), K-karragenan, *Nigella sativa*, selüloz asetat, mandelik asit

ABSTRACT

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF ELECTROSPUN NANOFIBERS, SUITABLE FOR USE IN TISSUE ENGINEERING

In this study, electrospun nanofibers were developed for use in the field of skin tissue engineering as scaffold and wound dressing material. Nanofibers were prepared with poly(ϵ -caprolactone) (PCL), K-carrageenan (Car) and *Nigella sativa* seed oil (NSO) for the purpose of developing the skin tissue engineering matrices for wound healing. Cell viability experiments were performed on HaCaT cell line for the choosing of appropriate PCL-Car/NSO nanofibers via fluorescence microscopy with DAPI, and wound healing activity was investigated with culture inserts performed. 10 mg/mL NSO containing PCL-Car/NSO nanofibers were found more effective at wound healing compared with the control $43.16 \pm 15.56\%$ and $48.33 \pm 14.72\%$ for 48 and 72 hours, respectively. PCL, cellulose acetate (CA) and mandelic acid (MA) were used for the development of nanofibrous bioactive wound dressing material. PCL-CA-MA nanofibers' effects on viability of HaCaT cell lines were determined by MTT. PCL-CA nanofibers, which contained 25 mM MA, were found the most effective nanofiber formulation. PCL-CA-MA (25 mM) nanofibers showed an excellent wound healing activity ($39.35 \pm 12.46\%$; $65.31 \pm 10.74\%$ and $94.78 \pm 6.77\%$ for 4, 6 and 8 hours, respectively) compared with control group, ($17.88 \pm 3.34\%$; $19.36 \pm 6.64\%$ and $29.07 \pm 7.66\%$ for 4, 6 and 8 hours, respectively) in a very short time.

Keywords: Biomaterial, tissue engineering, nanobiotechnology, nanofiber, poly(ϵ -caprolactone), K-carrageenan, *Nigella sativa*, cellulose acetate, mandelic acid

1. GİRİŞ

Günümüzde hastalık, yaralanma ve gelişimsel defektlerden kaynaklı meydana gelen organ ve doku hasarları önemli birer ekonomik ve sağlık sorunu haline gelmiş durumdadır. Ancak organ bağışçılarının azlığı, nakil bekleme listelerindeki insan sayısının artması ve giderek artan yaşlanan nüfus nedeniyle, bağışlanan doku ve organlara bağımlılık pratik bir yaklaşım değildir. Bunun yanı sıra lojistik kısıtlamalar nedeniyle, donörlerden alınan birçok organın eşleştirilememesi, transfer edilememesi ve çok sınırlı bir süre içinde bir hastaya başarılı bir şekilde nakledilememesi gibi sorunlar da yer almaktadır. 2019 yılında elde edilen verilere göre; sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde Ulusal Nakil Bekleme listesinde 113000'den fazla kişinin olduğu ve yaklaşık 17000 kişinin organ nakli için 5 yıldan fazla bir süredir beklediği bilinmektedir (Lanza et al., 2020; Persidis, 1999)

Yetişkin bir insanda dokuların çoğu tamir edilmese ve/veya yenilenmese de; bunu yapan deri, karaciğer ve fetüs gibi örnek doku ve organlar da vardır (Baddour et al., 2012; Lanza et al., 2013). Deri için, yetişkindeki rejeneratif süreç kusurlu olan fizyolojik anatominin iyileşmesini içerir (Chuong et al., 2012; Lanza et al., 2013). Fakat birçok uygulama için ilgili doku veya organ biyolojik olarak o kadar karmaşıktır ki, bir onarım ve/veya rejenerasyon yaklaşımı, doku veya organ naklinden daha iyi bir strateji olabilir. Tam bu noktada mevcut kritik tıbbi ihtiyacı karşılamak için Doku Mühendisliği umut verici bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Doku mühendisliği hasarlı doku ve organların onarımı veya değiştirilmesi amacıyla terapiler ve ürünler geliştirmek için biyoloji, kimya, mühendislik, tıp, ilaç ve malzeme bilimi gibi farklı alanlardan bilgi ve teknolojileri birleştiren çok disiplinli bir alandır (Langer and Vacanti, 1993a; Lanza et al., 2013). Hücre ve kök hücre biyolojisi, biyokimya ve moleküler biyoloji alanlarında edinilen bilgilerden yararlanarak, bu bilgileri yeni dokuların mühendisliğine uygulayabilir. Benzer şekilde, malzeme bilimi, kimya mühendisliği ve biyomühendislikteki ilerlemeler, mühendislik ilkelerinin canlı sistemlere uygulanmasına olanak tanımaktadır. Bu, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için temel bir paradigma olarak kabul edilen; hücre, doku iskelesi ve sinyal moleküllerinden oluşan 3 ana bileşeni karşımıza çıkarmaktadır (Lanza et al., 2013).

En genel tanımıyla doku mühendisliği; biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerini kullanarak canlı dokuların tamiri veya yeniden yapılması ile ilgilenen bilim dalı olarak

tanımlanmaktadır. Hücreler, biyomoleküller ve biyomalzemeler doku mühendisliğinin üç temel unsurunu oluşturmaktadır (Langer and Vacanti, 1993a).

Canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek veya desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemeler biyomalzeme olarak adlandırılmaktadır. Biyomalzemeler sürekli olarak veya belirli aralıklarla vücut akışkanları ile temas eder. Biyolojik sistemlerle ara yüzey oluşturarak ya da dokuların, organların ve vücut fonksiyonlarının yerine geçerek iyileşmesini, büyümesini ve onarılmasını sağlar. Biyomalzemeler, doku mühendisliğinde temel olarak doku iskelesi (scaffold) olarak kullanılmaktadır (O'Brien, 2011).

3 boyutlu (3D) yapıda olan doku iskeleleri hücrelere yapısal destek sağlayarak tutunmasına ve çoğalmasına olanak verir. Hücre tutunması ve göçü için ortam sunar, hücre ve biyokimyasal moleküllerin iletimini gerçekleştirir, gerekli besinlerin difüzyonuna olanak tanır ve hücre davranışını değiştirmek ya da kontrol edebilmek için bazı mekanik ve biyolojik etkiler sağlar (O'Brien, 2011).

Doku mühendisliğine yönelik biyomalzeme geliştirilmesinde kullanılan biyofabrikasyon teknolojileri; mühendislik, malzeme bilimi ve biyoloji ilkelerini birleştirmesinin yanı sıra başta doku mühendisliği ve rejeneratif tıp olmak üzere birçok biyomedikal disiplinin gelişimini hedeflemektedir. Ek olarak, doğal dokulara yüksek derecede yapısal ve işlevsel benzerliklere sahip karmaşık doku yapılarının oluşturulduğu fizyolojik 3D *in vitro* modellerin geliştirilmesi için de büyük bir potansiyele sahiptir. Doku mühendisliği için güncel olarak en yaygın kullanılan biyofabrikasyon teknolojileri elektroegirme; 3D biyobaskı teknolojileri; stereolitografi (SLA) ve lazer destekli biyobaskı gibi ışık bazlı teknolojileri şeklinde sıralanabilir (Lanza et al., 2020).

“Doku Mühendisliğinde Kullanıma Uygun Nanoliflerin Elektroegirme ile Üretimi ve Karakterizasyonu” başlıklı proje kapsamında; Poli(ϵ -kaprolakton)-K-Karragenan-Çörek otu tohumu yağı (PCL-Kar-ÇOY) nanoliflerinden doku iskelesi geliştirilmesi ve Poli(ϵ -kaprolakton)-Selüloz asetat – Mandelik asit (PCL-CA-MA) nanoliflerinden yara örtüsü geliştirilmesine yönelik olmak üzere iki ayrı çalışma gerçekleştirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyomalzeme

Biyomalzeme kavramı ilk olarak 1982 yılında Konsensus Geliştirme Konferansında (Chester, Birleşik Krallık), “Vücuttaki herhangi bir doku, organ veya işlevi tedavi eden, çoğalmasına olanak tanıyan veya o dokuyla yer değiştiren; herhangi bir süre boyunca, bir bütün olarak veya bir sistemin parçası olarak kullanılabilen, sentetik veya doğal kaynaklı, ilaçlar dışında kalan madde veya maddelerin bir kombinasyonu” olarak tanımlanmıştır (Dolcimascolo et al., 2019).

Eski çağlardan beri, insanlar yaraları iyileştirebilen, vücut fonksiyonlarını sürdürebilen veya eski haline getirebilen hayvan veya bitki türevli malzemeleri doğada aradılar. Örnek olarak eski Mısırlılar ve Romalılar cilt lezyonlarını dikmek için bitkisel lifler kullandılar ve ahşap uzuv protezlerini modelleyebildiler. Özellikle sanayi devriminin ardından, teknolojinin ve bilgi birikiminin artması sonucu tıbbi cihazlar ve giderek daha uygun özelliklere sahip bir dizi sentetik biyomateriyal (önce metalikler ve sonra polimerler) geliştirilebildi. İlerleyen süreçte doğal ve sentetik biyomalzemeler, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği stratejileri için önemli unsurlardan biri haline geldi. Günümüzde, çok sayıda üretim sistemi ile çeşitli tipte biyomalzeme temelli iskeleler üretilmiştir, ancak doku mühendisliği için ana zorluk, iskele üretimi için uygun malzemelerin seçiminden kaynaklanmaktadır.

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında biyomateriyaller, doku lezyonunun iyileşmesini, hücre büyümesi ve farklılaşmasını teşvik etmek için bir destek (iskele) olarak hizmet ettiklerinden çok önemli bir rol oynamaktadır. Temel olarak yeni gelişen doku için uygun bir ortam sağlamasının yanı sıra, aynı zamanda yeni doku tamamen restore edilene kadar hücre tutunması, çoğalması ve hücre dışı matriks (ECM) birikimi için biyomimetik malzemelerin (3D yapı iskeleleri) kullanımına dayanmaktadır (Salgado et al., 2004). Ayrıca, kullanılan iskeleler doku mühendisliğinin temel unsurlarından olan hücreler ve sinyal molekülleri veya büyüme faktörleri ile de birleştirilebilir (Dolcimascolo et al., 2019).

2.1.1. Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemelerin özellikleri

Günümüzde, doğal veya sentetik polimerler, seramikler, metaller, kompozitler ve hidrojel gibi farklı biyomalzeme türleri kullanılmaktadır. Bir biyomalzemenin iskele materyali olarak kullanımının değerlendirilmesindeki anahtar gereksinimler; (i) biyouyumluluk, (ii) biyobozunurluk ve (iii) biyoaktivite olarak sıralanabilir. İskelenin doku mühendisliği için temel gereksinim; biyouyumluluğu veya hücresel tutunmayı, çoğalmayı ve yüzeye ve nihayetinde iskele yoluyla *in vitro* ve *in vivo* göçü teşvik etme kabiliyetidir. Buna ek olarak, implantasyondan sonra, iyileşmeyi azaltabilecek veya reddi indükleyebilecek önemli bir inflamatuvar reaksiyondan kaçınmak için, immün yanıt oluşturmada konakçı dokuya entegre olmalıdır (Dolcimascolo et al., 2019; Hutmacher et al., 2001).

Biyoaktivite, bir biyomateryalin çevre doku ile etkileşime girerek hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşmasına olanak sağlama yeteneğini temsil eder (Yu et al., 2015). Biyomalzemeler konak dokuyla karşılaştırıldığında genel olarak daha yüksek bir biyoaktiviteye sahiptir ve doku büyümesini desteklemek için spesifik hücresel cevap oluşumuna katkı sağlayarak hücresel tanımayı teşvik edebilir. Bu amaçla, biyomateryalin yüzeyini hücresel davranış ve yanıt modüle edebilen doğal dokuya eşdeğer bir biyomimetik ortam üretmek için kollajen, fibronektin ve laminin gibi ECM makromolekülleri ile modifiye etmek mümkündür (Dolcimascolo et al., 2019; Tirrell et al., 2002).

Doku mühendisliği için iskelenin bir diğer temel özelliği biyolojik olarak parçalanabilirliktir. Biyomimetik yapı iskeleleri kalıcı implantlar değildir, ancak hücrelerin kendi ECM'lerini üretmelerine izin vermek için biyolojik olarak parçalanabilir olmalıdırlar. Ayrıca, bu bozunmanın yan ürünleri de toksik olmamalı ve diğer dokulara müdahale etmeden vücuttan kolayca atılabilir olmalıdır (Babensee et al., 1998). Ayrıca, aşırı hızlı veya yavaş bir eliminasyonu önlemek için bir biyomalzemenin *in vivo* bozunma kinetiğini bilmek de kritik derecede önemlidir. Eliminasyonu hızlı olan bir iskele, hücrelere destek olma işlevini yerine getiremezken, eliminasyonu yavaş olan iskele ise nekroz veya iltihaplanmaya neden olabilir (Dolcimascolo et al., 2019; Tabata, 2009).

Söz konusu üç temel özelliğin yanı sıra; kullanılacak doku iskelesi, implante edilmesi gereken anatomik bölgeye uygun yapısal ve mekanik özelliklere sahip olmalı ve ayrıca

implantasyon sırasında cerrahi manipölasyona izin verecek kadar dayanıklı olmalıdır. Yapısal özellikler, makro ve mikro yapısal özellikleri içerir. Makro-yapısal özellikler, ECM'i taklit eden ve hücrenin doğal farklılaştırılmış fenotiplerini korumasını sağlayan kritik öneme sahip geçici bir 3B mimariye atıfta bulunur. Mikro-yapısal özellikler ise iskele gözenekliliği, gözenek şekli, gözenek boyutu ve ara bağlantı ile ilgilidir. Mekanik özellikler ise, mekanik mukavemet ve sertliği içerir (Dolcimascolo et al., 2019).

2.1.2. Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler

Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemelerin özellikleri doku replasmanının veya rejenerasyonunun başarısı için büyük bir öneme sahiptir. Ayrıca, implant bölgesi ile etkileşime girmenin yanı sıra doku rejenerasyonu için önemli olan biyolojik süreçleri etkileme yeteneğine de sahiptirler. Günümüzde seramikler, doğal ve sentetik polimerler, metaller, kompozitler ve hidrojeller gibi iskele üretimi için farklı türde biyomalzemeler kullanılmaktadır (Çizelge 2.1.) (Dolcimascolo et al., 2019)

Seramik biyomalzemeler, metalik ve metalik olmayan elementler içerebilen, doğal veya sentetik kökenli inorganik bileşiklerdir. Bu biyomalzemeler genellikle polikristal katılardan, nadiren monokristallerden yapılırlar ve bazen amorf bir yapıya sahiptir. Genel olarak, sert yüzey, yüksek mekanik sertlik, düşük elastikiyet, düşük termal genleşme gibi mekanik özellikleri, üretim yöntemlerine bağlı olmakla beraber, başlangıç malzemelerine ve tanecik boyutlarına bağlı olarak da değişiklik gösterebilir. Seramik malzemeler genellikle kemik doku yenilenmesinde kullanılmaktadır (Dolcimascolo et al., 2019)

Kolajen, aljinat, proteoglikanlar, kitin ve kitosan gibi çeşitli biyolojik polimerler biyomalzeme üretiminde kullanılabilir. Bu malzemeler biyouyumlu olmalarının yanı sıra yüzeylerinde hücre tutunmasına ve büyümesine de olanak tanıyacak düzeyde biyoaktifler. Bununla birlikte, zayıf mekanik özellikleri ve biyobozunurluklarının hızlı olması genel kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Sentetik polimerler, bir dizi monomerik birimden oluşan yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Yapılarına göre lineer, dallanmış veya çapraz bağlı olabilirler. Termomekanik özelliklerine göre termoplastik ve termoset olarak sınıflandırılabilir. Polimerik malzemeler, lifler, filmler, çubuklar ve viskoz sıvılar şeklinde üretilir. Mekanik özellikleri ve biyobozunurluklarının, kullanılan reaktanlar ve sentez

parametrelerini değiştirerek düzenlenebilmesi önemli bir avantajdır. Bununla birlikte, düşük biyouyumluluk ve mekanik mukavemete sahip olabilirler ve iyonların ve diğer polimerizasyon kalıntı parçacıklarının salınması nedeniyle *in vivo* toksisite gösterebilirler. Polistiren, poli-L-laktik asit, poliglikolik asit, poli(ϵ -kaprolakton), poli-DL-laktik-ko-glikolik asit gibi birçok sentetik polimer halihazırda kullanılmaktadır (Dolcimascolo et al., 2019).

Çizelge 2.1 Farklı biyomalzeme türlerinin avantajları, dezavantajları ve ana klinik kullanımları (Dolcimascolo et al., 2019).

	Avantajlar	Dezavantajlar	Klinik Kullanım
Seramikler	-Sert yüzey -Yüksek mekanik sertlik -Biyouyumluluk -Kemik formasyonu oluşumuna katkı	-Kırılganlık -Düşük biyodegradasyon -Proses zorlukları	-Kalça protezi -Dental protez -Kemik ve kırıkta
Polimerler	-Biyouyumluluk -Biyoaktivite -Sentez sırasında gözeneklilik ve mekanik özelliklerin düzenlenebilmesi	-Düşük mekanik özellikler -Hızlı biyodegradasyon (Doğal Polimerler) -Düşük mekanik güç	-Kemik ve kırıkta -Tendon ve bağ doku -Dikiş ipliği -Katater -Kardiyovasküler protez -Kemik dolgusu
Metaller	-İyi mekanik özellikler	-Düşük hücre tutunması -Biyolojik sıvılarla temasta korozyon	-Diş ve ortopedik protezler
Kompozitler	-Biyouyumluluk -İyi mekanik özellikler	-Proses güçlüğü	-Sert ve yumuşak doku
Hidrojeller	-Biyouyumluluk - Kontrollü <i>in vivo</i> biyodegradasyon -Sentez sırasında gözeneklilik ve çapraz bağ yoğunluğunun düzenlenebilmesi	-Mekanik dayanıklılık	-Sert ve yumuşak doku

Metaller, yüksek elastik modül, akma mukavemeti ve deforme olmadan yük taşımalarına izin veren yüksek süneklik gibi iyi mekanik özellikleri nedeniyle doku mühendisliği stratejileri için özellikle uygundur. Mekanik direnç iskele üretimi için metalleri uygun adaylar yapmasına rağmen, yüzeylerine hücre tutunmasının düşük olması kullanımları için önemli bir sınırlılıktır. Ayrıca, metal implantlar toksik metalik iyonlar ve/veya partiküller salabilir ve biyolojik sıvılar da metallerin yüzeylerinde aşındırıcı etki gösterebilir. İskele üretiminde kullanılan farklı

metaller arasında paslanmaz çelik, kobalt ve titanyum alaşımları en sık tercih edilenlerindendir (Dolcimascolo et al., 2019).

Hidrojeller, karboksil, amid, amino ve hidroksil grupları gibi polar gruplar açısından zengin, kimyasal bağlar veya fiziksel molekül içi ve moleküller arası çekimler ile bir arada tutulan hidrofilik polimerlerdir. En temel özellikleri, çok büyük miktarlarda su veya biyolojik sıvıları absorbe etme ve çözünmeden şişme yeteneğidir. Hidrojeller, kökenine göre doğal (polipeptidler ve polisakkaritlerden oluşur), sentetik (geleneksel polimerizasyonla elde edilir) ve yarı sentetik olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca, katyonik, anyonik, nötr veya amfolitik olabilen amorf veya yarı kristal bir yapı sunabilirler. Biyolojik bir sistemdeki kararlılıklarına bağlı olarak, kimyasal-fiziksel modifikasyona uğramazlarsa dayanıklı veya daha sonra vücuttan atılan oligomerlere parçalanırlarsa biyolojik olarak parçalanabilir olarak kabul edilebilirler.

Kompozit iskeleler, doğal veya sentetik polimerler, seramikler ve metaller gibi farklı biyomazemeleri birleştirerek geliştirilmiştir. Biyouyumluluk, biyolojik bozunma ve kayda değer mekanik mukavemet gibi özellikleri bir araya getiren malzemeler olduğu için teknolojik, endüstriyel ve uygulanabilir öneme sahiptirler. Ayrıca, kompozit iskeleler hem sert hem de yumuşak doku rejenerasyonu için uygulanabilir olmasının yanı sıra, hücrelerden ve ECM'den oluşan doku mimarisini de büyük ölçüde taklit edebilir. Bir çok çalışma, doku mühendisliği stratejileri için kompozit yapı iskelelerinin (polimerler/seramikler ve sentetik/doğal polimerler) etkinliğini göstermiştir (Qian et al., 2014; Sekiya et al., 2013).

Çizelge 2.2 Doku iskelesi üretim teknikleri (Lanza et al., 2020).

Teknik	Avantajlar	Dezavantajlar
Hızlı prototipleme: 3 boyutlu (3D) baskı	Çok çeşitli malzeme, yüksek oranda tanımlanmış gözeneklilik ve mimari, tekrarlanabilirlik, biyoaktif moleküller ve hücrelerin dahil edilmesini sağlar	Yüksek verimli üretim mevcut değil, zaman alıcı süreç
Lif Bağlama (Fiber Bonding)	Basit prosedür, yüksek yüzey alanı/hacim oranı hücre tutunmasını destekler	Yüksek proses sıcaklığı, sınırlı gözeneklilik kontrolü
Elektroçirgeme	Çok ince lif kalınlığı elde edilebilir	Sınırlı lif birikimi ve gözeneklilik kontrolü, zayıf mekanik bütünlük

Çözücü dökümü ve partikül özütme (Solvent casting/particulate leaching)	Az malzeme gereksinimi, yüksek gözeneklilik, kompozit malzemelerin dahil edilmesini sağlar	Gözenek yapıları birbirine bağlı değildir, çözücü artıkları, biyoaktiviteye zararlı
Eriyik kalıplama (Melt molding)	Kalıp ile şekil kontrolü, esnek geometri, kompozit malzemelerin dahil edilmesini sağlar	Yüksek işlem sıcaklıkları, gözenekler arası bağlantı eksikliği
Membran laminasyonu	Tanımlanmış şekil ve geometriler, katmanlar arasında görünür sınır yok	Her katman için şekil tanımlaması gerekli, zaman alıcı, sitotoksik çözücüler
Ekstrüzyon	Tübüler yapıları imal etme yeteneği	Yüksek sıcaklık ya da basınç gereksinimi
Liyofilizasyon	Bazı gözenekler arası bağlantı	Diğer yöntemlere göre düşük gözeneklilik, sınırlı iskele ve gözenek boyutu
Faz ayrımı	İlaç taşıma uygulamaları için potansiyel, biyaktif bileşenlerin çözücülerden korunması	Çözücü artıkları, sınırlı gözenek boyutu
Yüksek iç fazlı emülsiyon	Enjekte edilebilirlik, iyi gözenek morfolojisi, biyolojik olarak parçalanabilen polimerler kullanılabilir	Sınırlı polimer seçeneği, yüksek işlem sıcaklığı
Gaz Köpürtme	Organik solvent ihtiyacını ortadan kaldırır, artırılmış hücre tutunması	Gözenekler arası bağlantı eksikliği, sınırlı gözenek boyutu
Kendiliğinden montaj	Çeşitli hücre davranışlarını desteklemek için tasarlanabilir, <i>in vitro</i> kültür ile uyumlu	Pahalı malzeme, tasarım uzmanlığı gereksinimi, sınırlı iskele boyutu
in-situ polimerizasyon	Anında implantasyon mümkündür, düşük işlem gereksinimi	Sınırlı mekanik özellikler ve gözeneklilik, zararlı polimerizasyon yan ürünleri; sınırlı malzeme seçimi

2.1.3. Polimer temelli doku iskelesi üretimi

İskele üretimi için kullanılacak biyomalzemenin seçiminden sonra, makro ve mikro yapısal özelliklerin yüksek düzeyde kontrol edilmesini sağlayan yeterli bir işleme tekniğinin seçilmesi oldukça önemlidir. Tercih edilen yöntemin, doğruluk ve tekrarlanabilirlik gibi temel gereksinimleri karşılaması gerekir. Elde edilen yapı iskeleleri, düzenli gözenek şekli ve gözenek boyutuna sahip olmalı ve aynı yöntemle üretildiğinde herhangi bir fiziksel-kimyasal değişiklik göstermemelidir. Ayrıca, işleme koşulları biyomateryalin mekanik özelliklerini değiştirmemeli ve işlem sırasında kullanılan herhangi bir toksik çözücü, iskelenin klinik kullanımını sınırlamamak için tamamen uzaklaştırılabilir (Leong et al., 2003; Salgado et al., 2004).

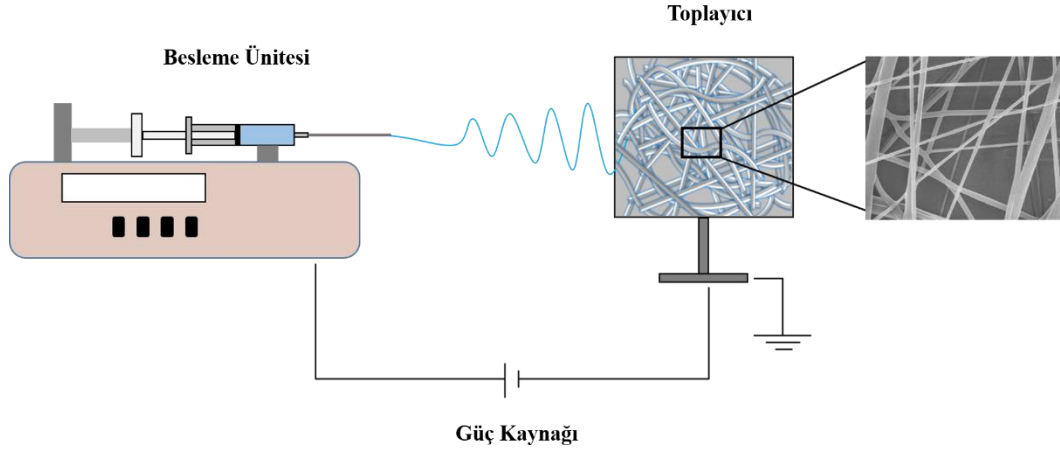
Doku mühendisliğinde; hücrelerin tutunması, çoğalması ve farklılaşması için ECM yerine geçici yapılar olarak hizmet eden doku iskelelerinin üretiminde çok sayıda polimer işleme tekniği kullanılmaktadır (Çizelge 2.2). Geleneksel yöntemler; genellikle doğal polimerler, seramikler veya büyüme faktörlerini doku gelişimine katkı sağlamak için biyokimyasal ajanlar olarak kullanarak, besin ve atık maddelerin taşınmasının yanı sıra hücre ve hücre göçü için birbirine bağlı gözenekli mimariye sahip iskeleler oluşturmak için yeterli olmuştur. Bununla birlikte, bu iskelelerin karakteristik olarak tek tip olmasının yanı sıra, fiziksel özelliklerin karmaşıklığı ve üretimde ölçek büyütmenin zorluğu ile sınırlanmış durumdadır. Bu nedenle, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında dokuya ve hastaya özel yapı iskeleleri üretme hedefini gerçekleştirmek için daha gelişmiş iskele üretim tekniklerine ihtiyaç duyulmuştur (Lanza et al., 2020).

2.2. Nanolif ve Elektroegirme

Birçok sentetik veya doğal malzeme doku mühendisliğine yönelik uygulamalarda kullanılmaktadır. Son yıllarda nanofibröz materyallerin biyoteknolojik ve medikal uygulamalarda kullanımı oldukça ilgi görmektedir. Bunların arasında nanolif temelli hücre iskeleleri; doğal yapıyı, kompozisyonu ve vücut ECM'ini çok iyi taklit edebildiği için doku mühendisliği alanında oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca hasarlı dokunun rejeneratif özelliklerini arttırmak amacıyla biyomoleküllerle zenginleştirmeye de olanak tanımaktadır (Leung and Ko, 2011; Pham et al., 2006; Sharma et al., 2015). Yüksek gözeneklilik, değişebilen gözenek boyutu, yüksek yüzey/hacim oranı nanofibriler doku iskelelerinin önemli avantajlarından (Li et al., 2002; Pham et al., 2006). Özellikle yara iyileşme proseslerinde klasik yara örtülerinden farklı olarak; hasarlı dokunun üzerini örtmenin yanı sıra yüksek gözenekli yapısı sayesinde daha etkin oksijen transferine olanak tanımaktadır. Ayrıca, nanolifler yara iyileşme prosesini hızlandıracak, yaranın enfekte olmasına engel olacak veya kontrol salınımı yapılacak farklı doğal veya sentetik biyomoleküllerle zenginleştirilebilmektedir (Sundaramurthi et al., 2014).

Nanomalzemelerin içinde önemli bir yere sahip olan nanolifler, belirli bir çaptaki sürekli uzayan, metrenin milyarda bir boyuta sahip olan liflerdir. Bu lifler; çekme, şablon sentez, faz ayrımı, kendiliğinden tutunma ve elektroegirme gibi teknikler ile üretilebilmektedir (Ramakrishna et al., 2005).

Elektroeğirme tekniği, polimer çözeltiler veya eriyik halde bulunan maddeler tarafından nanolif üretmek için elektrostatik kuvvetleri kullanan bir yöntemdir (Bhardwaj and Kundu, 2010). Bu yöntemle hem doğal hem de sentetik polimerlerle yapı iskelesi oluşturulabilmektedir. Doğal polimerler biyouyumlu ve diğer polimerlere göre daha az toksik etki göstermesi nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Polimerlerin elektroeğirme ile uygulanmasında çözgen sistemleri kullanılmaktadır (Schiffman and Schauer, 2008).



Şekil 2.1 Elektroeğirme düzeneği

Standart bir laboratuvar ölçekli elektroeğirme düzeneği yüksek voltajlı bir güç kaynağı, besleme ünitesi ve toplayıcı olmak üzere üç ana bileşenden oluşur (Cleeton et al., 2019). Elektroeğirme cihazının temel ekipmanları Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Elektroeğirme, lif çapının nano/mikro metre boyutlarında liflerin üretilmesi için kolay ve basit bir yaklaşım sağlar (Ding et al., 2019).

Elektroeğirme işlemi ile nanolif üretilmesinde, bir şırıngaya takılı iğnenin ucunda asılı durmakta olan polimer çözelti damlacığına elektrik alanı uygulanır. İğne ucuna beslenen polimer çözeltisinin akış hızı bir pompa yardımıyla kontrol edilir ya da yerçekimiyle damlacık oluşmasına izin verilir. Elektrot ya polimer çözeltisine batırılır ya da iğnenin ucuna bağlanır. Damlacığa elektrik potansiyel uygulandığında, damlacık birkaç karşıt kuvvetin etkisi altında kalır. Bir grup kuvvet (yüzey gerilimi ve viskoelastik kuvvetler) damlacığın yarı küresel şeklini korumaya çalışılırken, uygulanan elektrik alanından kaynaklanan diğer bir grup kuvvet, damlacığa ‘Taylor Konisi’ olarak adlandırılan konik şekle girmeye zorlar. Sınır gerilim değeri aşıldığında, damlacıktaki elektrik kuvvetler baskın hale gelir ve Taylor konisinin ucundan dar

ve yüklü bir polimer jeti toplayıcıya doğru fışkırır. Jet hareketi boyunca içindeki ters yüklerden kaynaklanan itici kuvvetin etkisiyle ‘kararsızlık noktasına’ erişir. Üç boyutta bükülen, dolanan, sarmalanan ve halkalanan bir hatta ileri geri kıvrılır. Polimer jetinin sürekli gerilerek esnemesine bağlı olarak liflerde önemli bir incelme meydana gelir ve lifler bir toplayıcı yüzey üzerinde biriktirilir.

Elde edilen nanoliflerin çapı ve morfolojisi; materyal parametreleri, işlem parametreleri, çevresel etmenler ve ekipman tasarımı olmak üzere başlıca dört temel parametreye bağlıdır (Deitzel et al., 2001; Li et al., 2004; Sas et al., 2012; Tan et al., 2005; Topuz and Uyar, 2017).

2.2.1. Elektroğirme ile üretilen nanoliflerin kullanım alanları

Elektroğirme yöntemiyle üretilen nanolifler yüksek yüzey alanı/hacim oranı sağlamaları, mikroorganizmalara veya ince parçacıklara bariyer oluşturmaları gibi özellikleri nedeniyle birçok alanda tercih edilmektedir. Üretilen birçok lif; sağlık, biyoteknoloji, mühendislik, çevre, sensör sistemleri, savunma ve güvenlik gibi çeşitli alanlarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Barnes et al., 2007; Ding et al., 2005, 2004; Ramakrishna et al., 2006; Wang et al., 2002; Wu et al., 2015). Bu alanların içerisinde filtrasyon membranları, lif temelli sensörler ve doku mühendisliği iskelelerinin üretimi dikkat çekmektedir (Li et al., 2005; Pham et al., 2006; Yoo et al., 2009). Yara iyileşme prosesini hızlandıracak ve bakteriyel enfeksiyona engel olacak bileşenlerle zenginleştirilecek liflerin oksijen transferine imkan vermesi ve biyoaktif moleküllerin salımına olanak tanınması da ana tercih sebeplerinden olmuştur. Elektroğirme yöntemi ile üretilen mikro/nano boyutlardaki liflerin kullanıldığı biyomedikal uygulamalar Çizelge 2.3’de özetlenmiştir (Ding et al., 2019).

Çizelge 2.3 Elektroğirme ile üretilen liflerin çeşitli biyomedikal uygulamaları (Ding et al., 2019).

Doku mühendisliği iskeleleri	İskelet kası doku mühendisliği Kemik doku mühendisliği Kıkırdak doku mühendisliği Deri doku mühendisliği Kan damarı doku mühendisliği Nöral doku mühendisliği
Farmasötik uygulamalar	Tıbbi tedavi için ilaç yüklü taşıyıcılar Gen tedavisi için nükleik asit iletimi Biyomedikal uygulama için enzim taşıyıcıları
Yara iyileşmesi uygulamaları	Yara bandajları Yapışma önleyici membran

Diğer Uygulamalar	Sensörler Takviye, Güçlendirme Ses emilimi Filtrasyon
-------------------	--

2.3. Deri Doku Mühendisliği

Deri, hayati öneme sahip birçok işlevi olan insan vücudunun en büyük organıdır. Deri, kimyasal faktörler, özellikle ultraviyole ışık gibi radyasyon faktörleri ve mikrobiyal enfeksiyon gibi çevredeki ortamın organizma üzerindeki olumsuz etkilerine karşı bir bariyer görevi görür. Diğer önemli işlevleri arasında; termoregülasyon, sıcaklık, dokunma, basınç ve ağrı hissi, alttaki dokularda uygun nemin tutulması, iyonların, suyun ve çeşitli biyomoleküllerin (örneğin lipidler ve proteinler) atılması, ve ayrıca epidermal uzantıların oluşumu için pigmentler, D vitamini ve keratinler gibi çeşitli biyomoleküllerin üretimi ve depolanması yer alır (Bacakova et al., 2019b).

Deri; en dışta ince epidermis, altta kalın dermis ve daha en alt kısımda da deri altı hipodermis tabakası adı verilen üç ana katmandan oluşur (Brohem et al., 2011). Epidermis, temel olarak keratinositlerden oluşur ve hidrasyonun tutulması için sıvı kaybını düzenlerken dış çevreye karşı bir bariyer görevi görür. Dermis tabakası ise oldukça damarlı, kalın bir bağ dokusudur. Epiderminin altında yer alır. Esas olarak, cildin mekanik özelliklerine katkıda bulunan glikozaminoglikanlar, elastin ve kollajen gibi fibroblastlar ve ECM'den oluşur (Supp and Boyce, 2005). Dermal tabaka, kan damarları ile birlikte ter bezleri, yağ bezleri ve kıl folikülleri gibi çeşitli uzantıları içerir. Yağ dokusundan oluşan alt hipodermis veya deri altı tabakası, cildin termoregülatör ve mekanik özelliklerine katkıda bulunur. Hem epidermal hem de dermal katmanlar, ana homeostazı sağlamak için parakrin sinyalleme yoluyla çeşitli moleküler veya hücresele seviyelerde birbirleriyle iletişim kurar (Breitkreutz et al., 2009).

Yaralanma ve/veya hastalık nedeniyle cilt bütünlüğünün/fonksiyonunun zarar görmesi, fizyolojik süreçlerin önemli bir dengesizliğini temsil eder ve bu da sonuçta önemli sakatlıklara ve hatta ölüme yol açabilir. Akut travma, cerrahi müdahaleler, yanıklar, kronik yaralar, enfeksiyonlar ve genetik bozukluklar, deri hasarının yaygın nedenleri arasında yer alır (Huang and Fu, 2010; Rodero and Khosrotehrani, 2010; Wong and Gurtner, 2012). Deri hasarları yaralanma derinliklerine göre; epidermal (sadece epidermal tabakayı etkiler), yüzeysel kısmi kalınlık (dermisin bir kısmı ile birlikte epidermal tabakayı etkiler), derin kısmi kalınlık (hem

epidermiste hem de dermiste hasar) ve tam kalınlıkta cilt yaraları (üç cilt katmanının tamamında hasar) olmak üzere çeşitli kategorilere ayrılabilir (Papini, 2004). Deride meydana gelen hasarların birçoğu doğal olarak kendiliğinden iyileşebilir. Ancak genellikle 4 cm den daha büyük herhangi bir kapsamlı veya geri dönüşü olmayan hasarların (derin kısmi kalınlıkta veya tam kalınlıkta cilt yaraları) iyileşmesi daha uzun zaman alır, ek cerrahi işlem gerektirir, ve onarımı ve yenilenme için çeşitli ikamelere gereksinim gösterir (MacNeil, 2007).

Son otuz yılda, malzeme geliştirmedeki ilerleme ve deri ikame maddelerine yönelik artan taleple birlikte, doku mühendisliği ile üretilmiş deri ikame maddeleri, deri yenilenmesi ve yara iyileşmesi için yeni bir terapötik seçenek haline gelmiştir. Doku mühendisliği, tamamen işlevsel doğal derinin tekrardan üretimi için bir hücre-matriks yapısını temel alır. Son yıllarda deri doku mühendisliği için çeşitli hücreler ve biyomateryaller kullanılmıştır. Doku mühendisliği ile üretilmiş deri ikameleri, biyouyumluluk, biyobozunurluk ve toksik olmayan yapı gibi bazı temel özelliklere ve uygun mekanik özelliklere sahip olmalıdır (Metcalf and Ferguson, 2007). Ayrıca, deri ikameleri uygun maliyetli olmalı ve bir bariyer görevi görmelidir. Ek olarak, minimal inflamatuvar yanıt ortaya çıkarmalıdır. Ayrıca, doku mühendisliği ile üretilmiş deri ikameleri, kullanım ve uygulamada uygun olmalı ve uzun bir raf ömrüne sahip olmalıdır (Bhardwaj et al., 2018; Langer and Vacanti, 1993b).

Tarihsel olarak, yara bakımı ile ilgili ilk belgelerin; yaralara çamur, süt ve bitki lapaları uygulayan eski Sümerlere kadar dayandığı bilinmektedir (Abrigo et al., 2014). Deri doku mühendisliğinin gelişimi zamanla, basit epidermal tabakalardan daha karmaşık iki katmanlı cilt yapılarına evrildi. Halihazırda ticari olarak piyasada bulunan ve klinik olarak temin edilebilen doku mühendisliği ürünü deri ikameleri, anatomik yapılarına göre; epidermal, dermal ve dermo-epidermal deri ikameleri olarak farklı kategorilerde sınıflandırılabilir (Bhardwaj et al., 2015; MacNeil, 2007; Metcalfe and Ferguson, 2007).

2.3.1. Nanoliflerin deri doku mühendisliğinde kullanımı

Deri doku mühendisliği yöntemleri ile aktif yara iyileşmesinin indüksiyonu ve hasarlı dokuların yenilenmesi temel bir ihtiyaçtır. Bu amaçla, nanolif temelli yapı iskeleleri en umut verici malzemelerden biri gibi görünmektedir. Nanolif temelli iskeleler, doğal ECM lifli bileşenini taklit etmeleri nedeniyle doku mühendisliğinde ECM analogları olarak hizmet

edebilmektedir. Bunun yanı sıra mikroorganizmaların yaralara girmesine karşı koruyucu bir bariyer görevi görebilir, hasarlı ciltte nemi tutabilir, gaz alışverişine izin verebilir ve yaralardan gelen eksüdayı absorbe edebilirler. Aynı zamanda büyüme ve anjiyojenik faktörler, sitokinler, hormonlar, vitaminler, antioksidanlar, antimikrobiyal ve antitümör ajanlar, amino asitler, yara iyileştirici peptitler (örneğin melanosit inhibe edici faktör) ve antimikrobiyal ajanlar gibi çeşitli biyoaktif moleküllerle de zenginleştirilebilir (Albright et al., 2018; Bacakova et al., 2019a; Li et al., 2019; Mahmoudi et al., 2017; Unnithan et al., 2015). Bu nedenle nanolifler, sadece deri hücreleri için doku mühendisliği iskeleleri olarak değil, aynı zamanda deriye kontrollü ilaç salımı için taşıyıcılar olarak da hizmet edebilir (Bacakova et al., 2019b).

Deri doku mühendisliği ve yara iyileşmesi için nanolifli yapı iskeleleri, çok çeşitli sentetik ve doğal polimerlerden hazırlanabilir. Bu polimerlerin her iki grubu da insan organizmasında nispeten kolay bozunabilen polimerler ve bozunmayan veya yavaş bozunabilen polimerleri içerir. İnsan vücudunda parçalanabilen polimerlerin, deri dokusu mühendisliği için doğrudan yapı iskeleleri olarak kullanımı uygunken, biyostabil polimerlerin ise hücreleri (keratinositler, fibroblastlar veya kök hücreler) ve biyoaktif molekülleri yaralara ileten “akıllı” yara örtüleri olarak kullanımı tavsiye edilmektedir. Bununla birlikte, nanofibröz yapı iskelelerindeki polimerler ağırlıklı olarak çeşitli kombinasyonlarda (doğal ile sentetik, bozunmaz ile bozunabilir) kullanılır (Bacakova et al., 2019b). Bu kombinasyonların kullanılmasının nedeni nanoliflerin kararlılığını, eğrilebilirliğini, ıslatılabilirliğini, mekanik özelliklerini ve biyoaktivitesini geliştirmektir. Çeşitli polimerlerin, nanopartiküllerin ve diğer bileşenlerin kombinasyonu, doku mühendisliği için iskelelerde veya yara örtüsü malzemesi olarak kullanımları açısından, tek tek bileşenlerden daha iyi özelliklere sahip hibrid malzemeler elde etmek için yaygın olarak kullanılan bir stratejidir (Gomes et al., 2017).

İdeal yara örtüsünün; iyileşme sürecini hızlandırması, enfeksiyonu önlemesi, deri yapısını ve işlevini eski haline getirmesi beklenir. Yara örtüleri, iyileşme sürecini tetiklemesi için; i) yara yatağından aşırı eksüdaları emmek, ii) ısı yalıtımı sağlamak, yara yatağını mekanik travma ve bakteriyel infiltrasyondan korumak, iii) gaz ve sıvı alışverişine izin vermek, iv) travma olmadan çıkarılabilir olması ve v) toksik olmaması ve alerjik olmaması gibi temel gereksinimleri karşılamaları gerekir (Abrigo et al., 2014; Lionelli and Lawrence, 2003).

Mevcut yara örtüleri; pasif, interaktif, gelişmiş ve biyoaktif yara örtüleri olarak sağlanan tedaviye göre dört ana kategoriye ayrılabilir. Pasif yara örtüleri, yara yatağının mekanik travma ve bakteri infiltrasyonundan korunmasını sağlar. İnteraktif yara örtüleri; dış ortamdan bakteri veya diğer mikroorganizmaların geçişine karşı etkili bir bariyer olarak kullanılmak amacıyla; şeffaf, su buharı ve oksijene karşı geçirgen polimerik filmler ve/veya köpükler ile üretilir (Skórkowska-Telichowska et al., 2013; Weller and Sussman, 2006). Hidrokolloidler ve alginatlar gibi gelişmiş yara örtüleri; yara çevresinde nemli bir ortam sağlama veya sürdürme yeteneğine sahiptir, böylece iyileşme sürecini kolaylaştırır (Skórkowska-Telichowska et al., 2013). Dördüncü kategori olan Biyoaktif yara örtüleri; hücrel tepkileri aktive eden veya yönlendirerek iyileşme sürecinde aktif bir rol oynayan ilaç dağıtım sistemleri, deri ikameleri ve biyolojik sargıları içerir (Abrigo et al., 2014; Boateng et al., 2008; MacNeil, 2007).

2.3.2. Yara iyileşme uygulamaları için nanolif üretimi

Yara iyileştirme uygulamaları için elektroğirme ile üretilen polimer nanolifler, genel olarak sentetik veya doğal olarak sınıflandırılabilir. Genel olarak, ilk başlarda, biyomedikal uygulamalar için tek polimer çözeltilerinden elektroğirme ile üretilen lifler kullanılmıştır. İlerleyen süreçte hem sentetik hem de doğal polimerlerden elde edilen malzemelerin avantaj ve dezavantajları göz önüne alındığında, farklı polimer karışımlarının kullanımı yaygınlaşmaktadır. Polyblend (çoklu karışım) olarak adlandırılan nanolifler, önceden karıştırılmış çözeltilerden veya çoklu polimer çözeltilerinden elektroğirme yöntemiyle elde edilir. Sentetik polimerler, elde edilen liflerin kolay işlenebilirliğini ve iyi mekanik özelliklerini sağlarken, doğal polimerler, liflerin iyileşme sürecinde yer alan biyomoleküllerle aktif olarak etkileşime girme kapasitesini artırmaktadır (Abrigo et al., 2014; Gunn and Zhang, 2010).

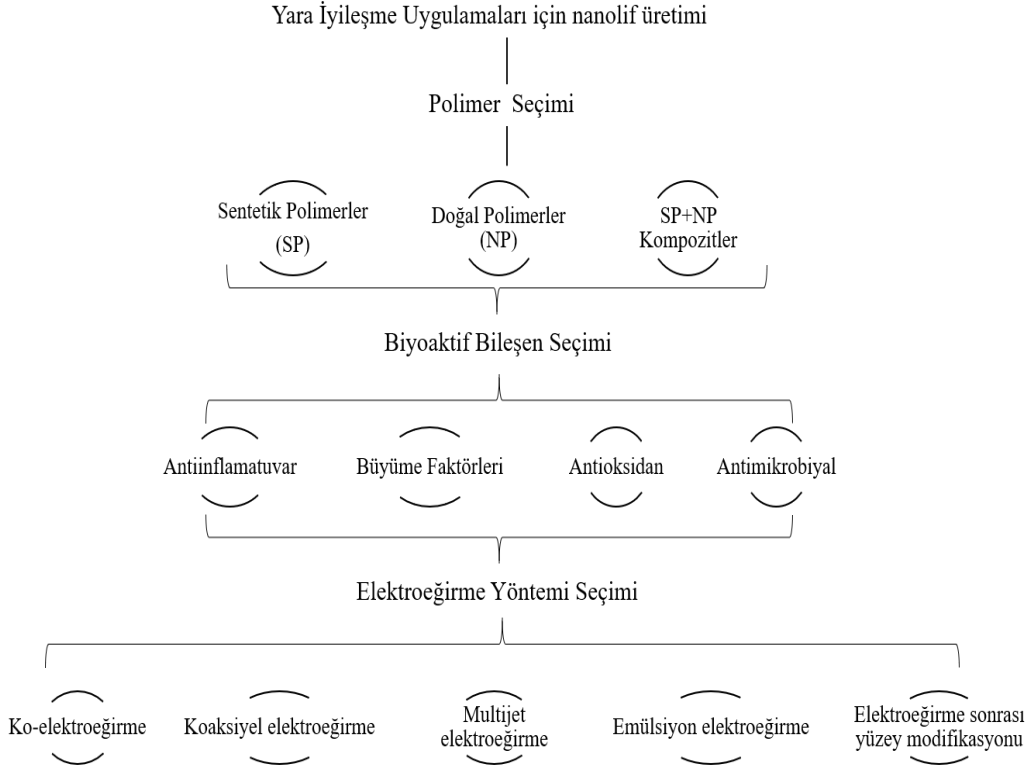
Yara iyileştirme uygulamalarındaki elektroğirme ile üretilen nanofibröz iskeleler; aktif maddeler ve bitkisel moleküller ile fonksiyonelleştirilen çeşitli doğal, sentetik ve kompozit polimerler kullanılarak geliştirilmiştir (Balusamy et al., 2017; Manoukian et al., 2016; Mohiti-Asli and Lobo, 2016; Norouzi et al., 2015). Doğal ve sentetik polimer gruplarının her ikisi de organizmada nispeten kolayca parçalanabilen polimerler ve parçalanamayan veya yavaş yavaş parçalanabilen polimerler içerir. Polilaktitler (Bacakova et al., 2017; Hoveizi et al., 2014) ve poliglikolitlerle oluşturulan kopolimerleri (Peh et al., 2015) ya da polikaprolakton (Albright et al., 2018; Buzgo et al., 2019) ve polilaktitlerle oluşturulan kopolimerleri (Mikes et al., 2021)

yaygın olarak kullanılan bozunabilir sentetik polimerlere örnek olarak verilebilir. Biyo-kararlı sentetik polimerlere, poliüretan (Unnithan et al., 2015), polidimetilsiloksan (Drupitha et al., 2019), polietilen tereftalat (Arslan et al., 2014) veya polietersülfon (Babaeijandaghi et al., 2010) örnek olarak verilebilir. Biyobozunur sentetik veya sentetik olmayan polimerler kullanılarak elektroğirme ile üretilen nanolifler, deri doku mühendisliği açısından umut verici malzemelerdir. Doku mühendisliği için yara iyileşmesinde kullanılan çeşitli sentetik ve biyopolimerler Çizelge 2.4’de listelenmiştir (Barhoum et al., 2019).

Çizelge 2.4 Yara iyileşme uygulamalarında çeşitli polimerlerden elektroğirme ile üretilen nanoliflerin kullanımı (Barhoum et al., 2019).

Polimer	Nanoliflerin yapısında bulunan biyomoleküller	<i>in vitro</i> çalışmalar	<i>in vivo</i> çalışmalar	Kaynak
PLA, PCL, PLA/PCL	Keratinosit büyüme faktörü	Keratinositler	-	(Kobsa et al., 2013)
PCL/PEG	Epidermal büyüme faktörü	İnsan keratinositleri	Fare	(Choi et al., 2008)
PCL/Selüloz	Kitosan, işlevselleştirilmiş kolajen	İnsan dermal fibroblastı	Sıçan	(Huang et al., 2015)
Kolajen	-	İnsan oral keratinositleri, İnsan epidermal keratinositleri	Sıçan	(Rho et al., 2006)
İpek fibroin	-	İnsan oral keratinositleri, İnsan epidermal keratinositleri, İnsan dişeti fibroblastı	-	(Min et al., 2004)
Kitosan/PVA	-	-	Fare	(Kang et al., 2010)
Poli dopamin kaplı PLGA	RGD peptidi, Fibroblast büyüme faktörü	-	Tavşan	(Cheng et al., 2016)
Jelatin/PVA	<i>Centella asiatica</i> ekstresi	L929 fare fibroblast hücreleri	Sıçan	(Yao et al., 2017)
Poliüretan	-	-	Ginepig	(Khil et al., 2003)

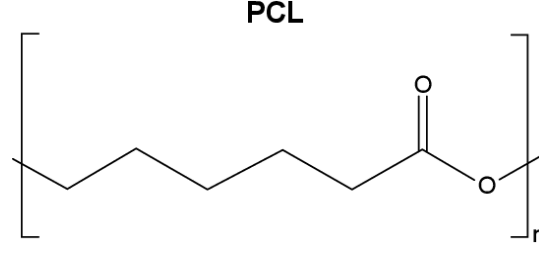
Elektroğirme tekniği kullanılarak yara iyileştirme uygulamalarında kullanılmak üzere nanoliflerin üretilmesi; polimer seçimi (doğal sentetik veya her iki polimerin birlikte kullanımı), istenilen özellikteki biyoaktif bileşen seçimi (antioksidan, antimikrobiyal, vb.) ve kullanılacak elektroğirme tekniğinin seçimi (koaksiyel elektroğirme, birlikte elektroğirme, vb.) olmak üzere üç ana aşamadan meydana gelmektedir (Şekil 2.2) (Sousa Coelho et al., 2018).



Şekil 2.2 Elektroğirme tekniği ile yara iyileşme uygulamaları için nanolif üretimi (Sousa Coelho et al., 2018).

2.4. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL)

Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan, poli α -hidroksi polyester ailesinden yarı kristal alifatik bir polyester olan Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL); biyouyumluluğu, yavaş biyobozunabilirliği, düşük maliyeti, toksik olmaması ve iyi mekanik özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 2.3) (Barhoum et al., 2019). Ester bağının hidrolitik bölünmesine karşı duyarlılığı nedeniyle bozunabilir polimerler arasında yer alır. Bu özelliğin yanı sıra; iyi bir uyumluluk göstermesi ve kolay işlenebilir olması (60°C'de erime noktası) nedeniyle PCL doku mühendisliği çalışmalarında oldukça ilgi çekmesine karşın, hidrofobik karakteri bazı uygulamalarda kullanımını ciddi şekilde sınırlayabilmektedir (Ghosal et al., 2017; Ranjbar-mohammadi and Bahrani, 2015). Buna rağmen elektroğirme ile PCL içeren nanoliflerin üretimi her geçen gün artış göstermektedir. Şöyle ki; Mochane ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan çalışmaya göre 2003 yılı içerisinde elektroğirme ile ilgili yayınlanan 10 bilimsel çalışma varken bu sayı 2018 yılı içerisinde 3000'e çıkmış ve bu çalışmaların da 243 tanesinde PCL kullanılmıştır (Mochane et al., 2019).



Şekil 2.3 Poli(ε-kaprolakton) (PCL)

Poli(laktid) (PLA), poli(glikolid) ve poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA) gibi diğer polyester ailesi üyeleriyle karşılaştırıldığında daha yavaş bozunma kinetiği nedeniyle biyomateryal iskelesi olarak daha az sıklıkla kullanılmasına rağmen, uzun süreli ilaç taşıma sistemleri olarak kullanıma daha yatkındır (Li et al., 2003). Bununla birlikte, mekanik özellikleri ve bozunma profili dahil olmak üzere sahip olduğu özellikler sayesinde PCL, diğer polyesterlerle karıştırılarak veya kopolimerize edilerek deri, kemik, kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında iskele materyali olarak kullanılmaktadır (Li et al., 2003).

Diğer sentetik polimerler gibi, PCL de fonksiyonel yüzey grupları açısından yoksundur ve yüzey ıslanabilirliği de düşüktür. Günümüzde, hem doğal hem de sentetik polimerlerin birlikte kullanımıyla bu ve benzeri kısıtlamaların önüne geçmek mümkündür. Kollajen, fibronektin, ve kitosan gibi doğal polimerlerden elektroğirme ile elde edilen nanolifler tek başına kullanıldığında, ECM'i iyi derecede mimate edebilmesinin yanı sıra hücre tutunmasını artıran biyouyumlu yüzey karakteristikleri de sergileyebilir, fakat mekanik olarak zayıftırlar. Doğal ve sentetik polimerlerin birlikte kullanıldığı hibrid yaklaşım sayesinde hem mekanik olarak daha dayanıklı hem de hücre tutunmasına olanak tanıyan materyallerin üretimi mümkündür (Ghosal et al., 2017). Bu sayede elektroğirme ile üretilen PCL içeren nanoliflerinin, ıslanabilirliğinin artmasının yanı sıra, oksijen ve besin transferi de kolaylaşarak hücre infiltrasyonu ve hücre bağlanması için uygun yüzeyler geliştirilebilir (Barhoum et al., 2019).

Biyomedikal uygulamalarda kullanılan PCL nanoliflerinin, lif çaplarının doğal hücre dışı morfolojiyi taklit etmesi ve böylece optimal hücre büyümesini desteklemesi için boncuksuz yapıda olması gerekir. Bu amaç doğrultusunda boncuksuz PCL nanoliflerinin üretimi için kloroform, diklorometan, dimetilformamid (DMF) ve metanol gibi farklı çözücüler veya bu çözücülerin bir kombinasyonu kullanılabilir (Lee et al., 2003; Mochane et al., 2019; Moghe et al., 2009; Prabhakaran et al., 2008). Elektroğirme ile üretilen PCL nanoliflerinin morfolojisi;

çözücünün tipi, elektroğirme parametreleri, çözücünün konsantrasyonu, polimerin konsantrasyonu, kullanılan farklı çözücü oranları gibi bir çok parametreye bağlı olarak değişiklik gösterebilir.

PCL, düşük biyolojik bozunma hızı, çok sayıda malzemeye karşı biyouyumlu olması, termal kararlılığı ve kolayca modifiye edilebilmesi gibi son derece olağanüstü özelliklere sahip bir sentetik termoplastiktir. Tüm bu özellikleri sayesinde PCL; doku mühendisliği, yara örtüleri ve ilaç taşıma sistemleri gibi biyomedikal uygulamalar için mükemmel bir biyomateryal olarak tanımlanmaktadır (Hivechi et al., 2019; Houshyar et al., 2019; Li et al., 2018; Mochane et al., 2019). Bu nedenlerden kaynaklı olarak projenin her iki bölümünde de (doku iskelesi geliştirilmesi ve yara örtüsü geliştirilmesi) elektroğirme ile nanolif üretiminde kullanılan polimerlerden biri olarak tercih edilmiştir.

2.5. Polisakkaritlerin Nanolif Üretiminde Kullanımı

Polisakkaritlerin güçlü hidrojen bağı oluşturma eğiliminden kaynaklı olarak yüksek çözelti viskozitesine veya jel oluşumuna yol açması sınırlandırıcı bir etken olsa da elektroğirme ile nanolif üretimi literatürlerde yer almaktadır (Kriegel et al., 2008). Kullanılan polisakkaritin kompozisyonu ve çözeltinin derişimi, elektroğirme ile nanolif üretiminde oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Örneğin, kitosandan elektroğirme ile nanolif üretimi sulu asit çözeltisindeki polikasyonik karakterinin yüzey gerilimini arttırmasından kaynaklı olarak zordur (Min et al., 2004). Bununla birlikte, trifloroasetik asit (TFA), TFA / diklorometan, hekzafloroizopropanol (HFIP), konsantre asetik asit, vb. çeşitli çözücüler kullanılarak elektroğirme teknolojisi ile başarılı bir şekilde farklı çaplardaki kitosan nanolifleri elde edilebilmektedir (Haider et al., 2013; Horzum et al., 2010; Ignatova et al., 2013). Benzer şekilde selüloz için de, düşük çözünürlüğü ve güçlü moleküller arası ve molekül içi hidrojen bağları nedeniyle elektroğirme ile nanolif üretimi sınırlı olmasına karşın; NaOH/üre (Qi et al., 2010), iyonik sıvılar (Meli et al., 2010; Viswanathan et al., 2006), TFA/metilen klorür vb. (Jahanbaani et al., 2016) çözücü sistemleri sayesinde selüloz nanolifleri üretilmektedir. Bu nedenle uygun çözücü sisteminin seçimi elektroğirme ile nanolif üretiminde oldukça önemlidir.

Polisakkaritler farklı polimerler (PEO, PVA, PVP, PLA vb.) veya biyopolimerlerle (zein, jelatin, ipek fibroini vb.) kombine edilerek de elektroğirme tekniği ile nanolif üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Kullanılan bu polimerlerin yapılarındaki elektroğirmeye uygun düz

zincirler sayesinde nanolif üretimi mümkün olabilmektedir (Fathi et al., 2014). Örneğin kitosan/PEO polimer çözeltisi kullanılarak 60-120 nm çapında düzgün nanoliflerin eldesi mümkündür (Pakravan et al., 2011). 40-70 °C’de orta sıcaklık değerlerinde hazırlanan yüksek kitosan içeriğine sahip kitosan/PEO polimer çözeltisi çözgen buharlaşma hızını artırması ve polimer zincirlerinin birbirine dolanmasını arttırdığı için daha düzgün şekilde nanoliflerin üretimine olanak sağlar. Nanolif oluşumu kullanılan polimer ve polisakkaritin zincir uzunlukları, konsantrasyonları ve karışım oranlarına bağlı olarak farklılık göstermektedir (Korehei and Kadla, 2014). Farklı polisakkaritler ve polimerler kullanılarak elde edilen nanolifler ve kullanım alanları ile ilgili literatüre geçen bazı çalışmalar Çizelge 2.5’de verilmektedir (Wen et al., 2017).

Çizelge 2.5 Farklı polisakkaritler ve polimerler kullanılarak elde edilen nanolifler ve kullanım alanları (Wen et al., 2017).

Polisakkarit	Kullanılan Polimer	Çözgen	Uygulama	Kaynak
Selüloz ve türevleri	Jelatin	Asetik asit	Gastrointestinal kanalda kontrollü salma özelliğine sahip çekirdek-kabuk (core-shell) lifleri	(Kiatyongchai et al., 2014; Sakuldao et al., 2011)
	PEO	Kloroform ve metanol	Gıda ambalajları veya yara örtü malzemeleri	(Korehei and Kadla, 2014)
	PCL	<i>N,N</i> -dimetilformamid (DMF), kloroform ve aseton	Biyofiltreler ve strip biyosensör	(Ahmed et al., 2015)
	PVP	Aseton, etanol ve distile su	Doku Mühendisliği için iskele	(Castillo-Ortega et al., 2015)
	zein	Aseton ve DMF	Gelişmiş termal stabilite ve hidrofilik özellik	(Ali et al., 2014)
	İpek fibroin	TFA	atıksudan ağır metal iyon adsorpsiyonu	(Zhou et al., 2011)

Polisakkarit	Kullanılan Polimer	Çözgen	Uygulama	Kaynak
Pektin	PEO	Distile su	Biyomedikal uygulamalar, elektrokimyasal cihazlar ve ilaç taşıma sistemleri	(Cui et al., 2016)
	Kitosan ve PVA	Asetik asit ve distile su	Gelişmiş mekanik özellikler ve biyoyumlu deri dokusu iskelesi	(Lin et al., 2013)
	Aljinat ve PEO	NaOH çözeltisi	Fonksiyonel gıda uygulamaları için	(Alborzi et al., 2014, 2013)

			arttırılmış folik asit enkapsülasyonu	
Nişasta	PEO ve PVA	Distile su	Kontrol ilaç salım sistemi	(Tang et al., 2016)
	Poliakrilamid	Formik asit	Enzim immobilizasyonu	(Taghavian et al., 2015)
	İpek fibroin	Formik asit	Hücre canlılığı, çoğalması ve tutunması için kemik rejenerasyon malzemeleri	(Hadisi et al., 2015)
	Poli(etilen-alt-maleik anhidrit)	Distile su ve DMSO	Termal kararlılığı arttırılmış gözenekli yapı	(Oktay et al., 2013)
	PVA	Distile su	elektrokimyasal kapasitör elektrot	(Kim et al., 2012)
Kitosan	PVA	Asetik asit ve distile su	Gelişmiş mekanik ve antimikrobiyal özelliklere sahip yara örtüleri	(Koosha and Mirzadeh, 2015)
	PEO	Asetik asit ve distile su	Arttırılmış hücre çoğalma biyomembranları; yara örtü malzemesi	(Cheng et al., 2015)
	PVA ve PVP	Asetik asit ve distile su	Yara örtü malzemesi	(Gökmeşe et al., 2013)
	PLA	TFA, kloroform/etanol ve su	Doku mühendisliği; ilaç taşıma; enzim aktivitesinin iyileştirilmesi için potansiyel uygulamalar	(Jiang et al., 2016; Siqueira et al., 2015)
	PCL ve PEO	Diklorometan (DCM) ve metanol	Yara örtüsü uygulamaları için biyokompozit.	(Zarghami et al., 2015)
	PVA ve ipek fibroin	Distile su	Yara örtüsü uygulamaları için biyouyumlu materyaller	(Zhou et al., 2013)
	PVA ve aljinat	Asetik asit ve distile su	Daha iyi biyouyumluluk ve kontrollü bozunma oranı ile lif üretimi	(Hu and Yu, 2013)
	PVA ve jelatin	Asetik asit ve distile su	Kontrollü çift ilaç taşıma sistemi	(Fathollahipour et al., 2015)
	Jelatin	TFA ve DCM	Yüksek hücre tutunma ve çoğalmasına uygun deri doku mühendisliği iskelesi	(Pezeshki-Modaress et al., 2015)
	zein	Etanol ve TFA	Fonksiyonel kontrollü taşıma sistemi	(Torres-Giner et al., 2009a)

Polisakkarit	Kullanılan Polimer	Çözgen	Uygulama	Kaynak
Heparin	PCL	DCM ve metanol	Vasküler yaralanma bölgesine kontrollü taşıma cihazı	(Torres-Giner et al., 2009b)
	PLLA	DCM ve metanol	İnsan mezenkimal kök hücreleri için farklılaştırıcı bir araç olarak iskele	(Spadaccio et al., 2010)

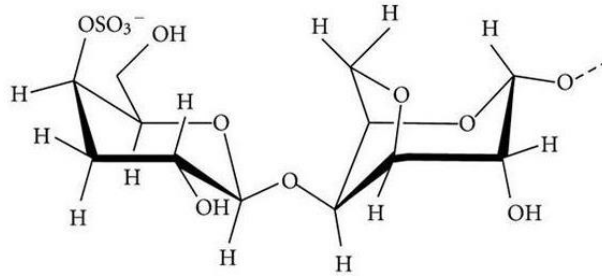
Hyalüronik asit	PEO	Asetik asit ve distile su	Doku rejenerasyonunda uygulamalar için iyi termal stabiliteye sahip çekirdek-kabuk (core-shell) lifi	(Chen et al., 2016)
	PCL	Kloroform ve folik asit	Deri dokusu mühendisliği iskeleleri görevi görebilecek büyüme faktörlerinin salınımının kontrolü ve yüksek enkapsülasyon etkinliği	(Wang et al., 2016)
	PVP	Etanol ve distile su	İlaç salımının kontrolüne yönelik lipozom stabilizasyonu ve koruması için çekirdek-zarf (core-sheath) lifleri	(Z. Li et al., 2014)
	Jelatin	NaOH, DMF ve asetik asit	Biyomedikal materyaller	(Lai et al., 2014)
	İpek fibroin	Etanol, formik asit ve distile su	İlaç salım uygulaması için mükemmel antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip koaksiyel nanolifler	(Doğan et al., 2016)
Kondroitin sülfat	PVA	Distile su	Yumuşak doku rejenerasyonu için nontoksik ve biyouyumlu malzemeler	(Guo et al., 2016)
	Kollajen ve glikozaminoglikan	2,2,2-trifloroetanol (TFE) ve distile su	Gelişmiş hücre çoğalmasına sahip biyomateryaller	(Zhong et al., 2005)
Dekstran	PCL ve selüloz asetat	DMF, tetrahidrofuran (THF) ve aseton	Yara örtüsü uygulamaları için iyi hücre tutunma ve antibakteriyel özelliği olan kompozit matlar	(Liao et al., 2015)
Pullulan	PVA	Distile su	Gelişmiş mekanik ve termal özelliklere sahip lifler; biyoaktif bileşiklerin teslimi için fonksiyonel malzemeler	(Islam et al., 2014)
	Selüloz asetat	DMF ve DMSO	Deri ve kemik doku mühendisliği uygulamaları için hücre taşıyıcı	(Atila et al., 2015)

Polisakkarit	Kullanılan Polimer	Çözgen	Uygulama	Kaynak
Pullulan	Amarant protein	Formik asit	Fonksiyonel gıda veya aktif paketlenme için biyoaktif malzemelerin enkapsülasyonu	(Aceituno-Medina et al., 2015a, 2015b; Blanco-Padilla et al., 2015; Soto et al., 2016)

	Konsantre peynir altı suyu proteini	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS)	Fonksiyonel gıda uygulamaları için <i>Bifidobacterium</i> suşlarının enkapsülasyonu	(López-Rubio et al., 2012)
Aljinatlar	PVA	Distile su	Antibakteriyel yara örtüsü ve doku mühendisliği uygulamaları	(Fu et al., 2014)
	Kitosan	Gliserol, asetik asit ve distile su	Doku antiadezyon bariyeri	(Chang et al., 2012)

2.5.1 K-Karragenan

Doğal bir polisakkarit olan Karragenan, Avrupa, Asya ve Amerika’da farklı deniz yosunları tarafından (*Chondrus crispus*, *Gigartina stellata*, *Euchema spinosum*, *E. cottonii*) üretilir. Polisakkaritlerin kompleks bir karışımıdır. E407 koduyla bilinen Karregenana biraz farklı bir bileşime sahiptir; önemli miktarda selüloz içermektedir. Kıvam arttırıcı ve emülgatör bir fonksiyonel özelliğe sahiptir. Karragenan, galaktan ile galaktozun birbirini takip eden, $\alpha(1 \rightarrow 3)$ ve $\beta(1 \rightarrow 4)$ bağları yapmasıyla oluşan lineer bir polisakkarittir. Kırmızı deniz yosunun tarımı ve işlenmesiyle elde edilen doğal hidrokolloid karragenanın; kappa, iota ve lambda olmak üzere üç farklı çeşidi bulunmaktadır (Şekil 2.4). Kappa karragenan; sert ve dayanıklı jel formu, iota karragenan elastik ve su tutucu jel yapı, lambda karragenan ise jel özelliği göstermeyen çok iyi viskozite istenen durumlarda kullanılmaktadır. Gıda sanayinde çok yaygın olarak kıvam arttırıcı olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca hava temizleyicilerde, kozmetik, eczacılık ve tekstil sanayinde de yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Evageliou et al., 2019).



Şekil 2.4 Kappa karragenan

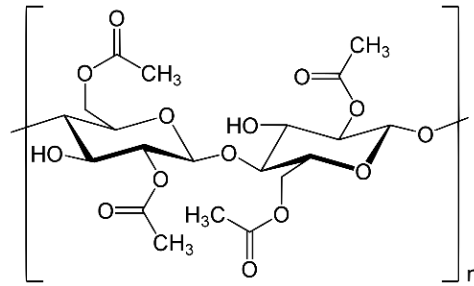
Karragenanlar, biyoyuyluluk, biyobozunurluk, yüksek jelleşme kapasitesi, düşük maliyet, protein ve enzimlerle kovalent bağlanabilmesi gibi özellikleri sayesinde birçok biyoteknolojik uygulamada büyük ilgi görmektedir (Elnashar and Yassin, 2009; L. Li et al.,

2014; Nogueira et al., 2016; Nourmohammadi et al., 2017; Santo et al., 2009). Ayrıca biyomolekölün kovalent immobilizasyonuna olanak tanıyacak serbest fonksiyonel grubu (hidroksil grubu) yapısında barındırmaktadır. Çizelge 2.5’de verilen karbohidratlar dışında karragenan da doğal polimerler sınıfında yer alan ve nanolif üretimi için yüksek potansiyele sahip önemli bir makromoleküldür. Daha önce Popa ve ark. tarafından yaş eğirme yöntemi kullanılarak aljinat/karragenan nanolifleri hazırlanmıştır. Nanoliflerin suda çözünmesini engellemek için uygulanan kalsiyum klorür ile muamelesi ek bir işlem basamağı getirmektedir (Popa et al., 2011). Ayrıca gerçekleştirilen çalışmada nanoliflerin hidrofilik karakterizasyonları hakkında herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

Tüm bu özellikleri ve taşıdığı yüksek potansiyel nedeniyle projenin doku iskelesi geliştirilmesine yönelik ilk kısmında PCL ile birlikte K-karragenan kullanılmıştır.

2.5.2. Selüloz asetat (CA)

Selüloz asetat (CA), selüloz polimerinin asetilasyonu ile elde edilen bir selüloz esteridir. Düşük maliyetli bir selüloz türevidir olan CA, iyi kimyasal ve mekanik özellikler, termal kararlılık, biyobozunabilirlik, biyouyumluluk, suda düşük çözünürlük gibi birçok özelliğe sahip en bol bulunan ve yaygın olarak kullanılan yenilenebilen bir polimer kaynağıdır (Şekil 2.5) (Angel et al., 2020; Lee et al., 2018; Yezer and Demirkol, 2020). Bu özellikler sayesinde; biyosensör, kemotansör, doku iskelesi, antimikrobiyal ajan, nanokompozitlerle güçlendirilmiş ambalaj filmleri ve membranlar gibi çeşitli uygulamalarda tercih edilebilmektedir (Lee et al., 2018).



Şekil 2.5 Selüloz asetat

Elektroeğirme tekniği ile üretilen nanolifler biyoaktif bileşenlerin salınımına olanak tanıyabilen, yüksek yüzey alanı-hacim ve en-boy oranlarına sahiptir (Nootem et al., 2018). CA; farklı çözgen sistemleri kullanılarak iyi bir elektroeğirilebilir ve lif oluşturma yeteneğine sahip

olması, biyolojik olarak parçalanabilme ve toksik etki göstermeyen özellikleri nedeniyle elektroğirme tekniği ile nanolif elde edilmesinde yaygın kullanılan polimerler arasında yer alır (Angel et al., 2020; Nootem et al., 2018).

CA nanolifleri yüksek yüzey alanı-kütle oranı, yüksek gözeneklilik ve gözenekler arası bağlantılar, makul seviyelerde gösterdiği esneklik, gerilme direnci gibi özellikleri nedeniyle hem bilimsel hem de teknolojik çalışmalarda oldukça dikkat çekmektedir. Bu özellikleri sayesinde filtrasyon, biyomedikal uygulamalar, ilaç taşıma, doku iskelesi, kompozit materyaller gibi birçok çeşitli alanda kullanılmaktadır (Angel et al., 2020; Lee et al., 2018). Özellikle doku iskelesi olarak sudaki düşük çözünürlüğü nedeniyle ideal bir materyaldir (Angel et al., 2020; Han and Gouma, 2006). Ayrıca CA nanolifleri çok hidrofobik ve hidrofilik olmadığı için; suyun liflere nüfuz etmesine ve liflerindeki hidrofobik biyoaktif bileşenlerin insan derisine veya organizmaya geçebilmesine olanak tanımaktadır (Nootem et al., 2018). E vitamini, A vitamini, gallik asit gibi birçok bileşiğin CA nanoliflerinden salınımıyla ilgili birçok çalışma olmasının yanı sıra, nanoliflerin salım profillerinin polimer filmlere nazaran daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Nootem et al., 2018; Phiriyawirut and Phaechemud, 2012; Taepaiboon et al., 2007).

Biyosferde en bol bulunan maddelerden biri olan karbohidratlar, polimer malzemelerle ilgili çalışmalarda oldukça sık tercih edilmektedir. Farklı doğal kaynaklardan izole edilebilmeleri ve kolay bulunabilirlikleri nedeniyle maliyet verimlilikleri açısından avantaj sağlar. Karbonhidrat polimerlerinin işlenmesi zor olsa da elektroğirme tekniği, nano boyutlu formlarda karbonhidrat polimerleri üretmek için umut verici bir tekniktir (Yezer and Demirkol, 2020) . Projenin, doku mühendisliğinde yara örtüsü geliştirilmesine yönelik ikinci kısmında elektroğirme ile nanoliflerin üretiminde PCL ile birlikte CA kullanılmıştır.

2.6. *Nigella sativa*

Elektroğirme yöntemi, yara iyileşmesi ve kanser gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde, çeşitli polimerlere bazı doğal ve sentetik ilaçların yüklenmesi ve bu şekilde nanolif üretimi oldukça yaygın kullanılan bir yaklaşımdır. Özellikle yara iyileşme proseslerinde klasik yara örtülerinden farklı olarak; hasarlı dokunun üzerini örtmenin yanı sıra yüksek gözenekli yapısı sayesinde daha etkin oksijen transferine olanak tanınması ve biyoaktif moleküllerin salımına imkan vermesi de ana tercih sebeplerinden olmuştur (Sundaramurthi et al., 2014).

Çörek otu olarak da bilinen *Nigella sativa*, *Ranunculaceae* familyasına ait bir yıllık otsu bir bitkidir. Akdeniz bölgesine özgün bir bitki olan çörek otu; 20-30 cm boyunda, beyaz, sarı, pembe, açık mavi veya kırmızı çiçeklere sahiptir. Olgun tohumları yemeklik (özellikle baharat) ve medikal uygulamalar için tüketilmektedir (Atta, 2003; Bourgou et al., 2008)

Çörek otu tohumu ve tohum yağı yüzyıllardan beri çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle Ortadoğu, Kuzey Afrika, Uzak Doğu ve Asya'da geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde 2000 yılı aşkın bir süredir kullanıldığı bilinmektedir. Yüksek antioksidan içeriği nedeniyle, geleneksel tıpta, profesyonel tıp ve gıda endüstrisinde çörek otuna büyük önem verilmektedir (Teilaghi et al., 2020) Çörek otu tohumu yağı (COY); analjezik, anti-inflamatuvar, antioksidan, antikanser, antimikrobiyal, antihipertansif, immün sistem uyarıcı, yara iyileştirici gibi birçok özelliğe sahiptir (Apaydin and Gedikli, 2019; Guler et al., 2014; Kalhori et al., 2019; Ng et al., 2011). Biyolojik aktiviteleri ve terapötik potansiyeli nedeniyle yoğun bir şekilde üzerinde çalışılan çörek otunun oldukça geniş spektrumda etkilere sahip olduğu ve bu özelliklerinin çok büyük bir kısmının, çörek otunun uçucu yağlarının majör aktif kimyasal bileşeni olan Timokinondan (TQ) (2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon; $C_{10}H_{12}O_2$), kaynaklandığı bilinmektedir (Ahmad et al., 2013; Ali and Blunden, 2003).

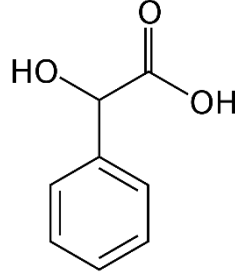
Projenin doku iskelesi geliştirilmesine yönelik ilk kısmında PCL-Kar nanoliflerin zenginleştirilmesinde *Nigella sativa* tohumu yağı kullanılmasına karar verilmiştir.

2.7. Mandelik Asit

Alfa hidroksi asitler (AHA'lar), kozmetik ve dermatolojide sıklıkla kullanılan bir kimyasal bileşik sınıfıdır. Aynı karbon üzerinde bir hidroksil ve bir karboksilik grubu yer almaktadır. Meyveler gibi birçok bitkisel kaynaktan asit bileşenleri olarak doğal olarak oluşabilmelerinin yanı sıra sentetik olarak da üretilebilirler. AHA içeren ürünler cildin nemlendirerek kırısklıkların azaltılmasından derinin kimyasal soyulmasına geniş bir yelpazede tercih edilmektedir. AHA uygulamasına bağlı olarak derinin hidrasyonu ve turgorun artmasıyla su tutma kapasitesinin artması epidermal etkilerine örnek olarak verilebilir. Ayrıca AHA'lar derinin soyulmasını, plastikleşmeyi indüklemesinin yanı sıra; hücreler arası iyonik bağa müdahale ederek epidermal farklılaşmanın normalleştirirerek korneosit kohezyonunu azaltır ve böylece keratolizi indükler. Kullanımları sayesinde, doza bağlı olarak *in vitro* koşullarda hücre proliferasyonunda ve kollajen üretiminde artış gösterdiği de bilinmektedir. Bunların yanı sıra

glikozaminoglikan sentezini, dermal kalınlığı ve fibroblast proliferasyonunu arttırdığı da literatürde gösterilmiştir (Babilas et al., 2012).

Mandelik asit (MA) dermatoloji, eczacılık, kozmetik ve estetik tıpta kullanılan en popüler alfa-hidroksi asitlerden biridir. Oral kullanımlarda idrarla doğrudan atılabilen toksik olmayan bir maddedir. Özellikle idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde antibakteriyel olarak uzun süredir kullanılmaktadır. (Motamedifar et al., 2014). Almanca’da badem anlamına gelen “mandel” kelimesinden ismini alan MA acı badem ekstraktının hidrolizinden elde edilir. Kimyasal olarak mandelik asit, diğer iyi bilinen antibiyotiklerinkine benzer bir yapıya sahiptir (Şekil 2.6). Yüksek bir erime noktasına (119°C) sahip olan MA; etanol ve izopropil alkolde kolaylıkla çözünürken, suda ve yağlarda kısmen çözünmektedir. MA’nın farmakolojik etkilerini de belirleyen optik olarak iki enantiyomeri bulunmaktadır. Aynı zamanda keratolitik ve bakterisidal özelliklere sahiptir ve yağ bezlerini düzenleyerek akne tedavilerinde de tercih edilebilir (Dayal et al., 2020)



Şekil 2.6 Mandelik asit

Zayıf asitler, güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahiptir, hücre zarından geçtikten sonra zayıf asit formu dissosiyasyon olarak sitoplazmanın asitleşmesine yol açan bir proton salgılar ve böylece bakteri üremesini engeller. (Dayal et al., 2020) Ayrıca MA, kolajen sentezini uyarır ve hücresel yenilenmeyi de teşvik eder. Mandelik asit molekülü deriden çok yavaş emilir, bu da daha az tahriş edici olduğu anlamına gelmektedir. Potansiyel kozmesötik aktivitesi, iyi bilinen antibakteriyel ve antiinflamatuvar özelliklere sahip bir AHA olan MA araştırmalar açısından oldukça ilgi çekici bir ajandır (Dayal et al., 2020).

Taşıdığı tüm bu potansiyel ve ilgi çekici özellikleri nedeniyle; yara örtüsü geliştirilmesine yönelik gerçekleştirilen projenin 2. kısmında PCL-CA nanoliflerinin biyoaktif bileşenle zenginleştirilmesi basamağında MA kullanılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

“Doku Mühendisliğinde Kullanıma Uygun Nanoliflerin Elektroeğirme ile Üretimi ve Karakterizasyonu” başlıklı proje; PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinden doku iskelesi geliştirilmesi ve PCL-CA-MA nanoliflerinden yara örtüsü geliştirilmesi olmak üzere iki ayrı başlık altında gerçekleştirildi. Bu nedenle projenin 3.Gereç ve Yöntem ve 4. Bulgular ana başlıkları yukarıda belirtilen iki alt başlık altında verilmiştir.

3.1. Materyal

PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinden doku iskelesi geliştirilmesine yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda; Poli-ε-kaprolakton (PCL), Rhodamine B Aldrich; kappa-karragenan (Kar), aseton Merck; formik asit Isolab; DMEM ve FBS Gibco; Na-Pirüvat, Penisilin-Streptomisin, Tripsin-EDTA Sigma; DAPI Sigma-Aldrich; Alexa Fluor™ 488 Phalloidin Invitrogen; Culture-Insert 2 Well ibidi; ITO Teknoma firmalarından, *Nigella sativa* (çörek otu) yağı (ÇOY) yerel eczaneden temin edilmiştir.

PCL-CA-MA nanoliflerinden yara örtüsü geliştirilmesine yönelik çalışmalarda Poli-ε-kaprolakton (PCL) Aldrich; selüloz asetat (CA), aseton (Ac), dimetilformamid (DMF) Merck; formik asit (FA) Isolab; DMEM ve FBS Gibco; Na-Pirüvat, Penisilin-Streptomisin, Tripsin-EDTA Sigma; Mandelik asit (MA) Sigma-Aldrich; Culture-Insert 2 Well ibidi; ITO Teknoma firmalarından temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Elektroeğirme tekniği ile nanoliflerin eldesinde NanoWeb Electrospin 103 (MaviTech, Türkiye) cihazı ile Şırınga pompası (New Era Pump) kullanıldı. karakterizasyonda ilk basamak olarak nanoliflerin ışık mikroskobu (Zeiss Primo Star) görüntüleri ile morfolojileri gözlemlendi. Nanoliflerin temas açısı ölçümleri Attension Theta Goniometer ile gerçekleştirildi. Üretilen nanoliflerin ortalama çapları ve lif çapı dağılım histogramları SEM görüntüleri kullanılarak ImageJ ve OriginPro programları yardımıyla elde edildi. Hücre kültürü çalışmalarında canlılık tayinlerinde ise UV-VIS spektrofotometre (Varioskan Multiplate reader, Thermo) ve floresan mikroskop (Olympus BX53) kullanıldı.

3.3. PCL-Kar-ÇOY Nanoliflerinden Doku İskelesi Geliştirilmesi

3.3.1. PCL–Kar nanoliflerin üretilmesi ve elektroğirme parametrelerinin optimizasyonu

%10 Polikaprolakton (w:v) çözeltisi hazırlanırken ilk basamakta gerekli miktarda PCL tartılarak formik asit içerisinde 45 °C sıcaklıkta manyetik karıştırıcıda çözünmesinin ardından formik asit/aseton (3:7, v:v) olacak şekilde aseton ilave edilerek gece boyu karışmaya bırakıldı.

%0,5 Kappa-Karragenan (w:v) hazırlanırken gerekli miktarda Kar tartılarak 3:7 (v:v) oranında karıştırılmış olan formik asit/aseton çözgen sistemi içerisinde 45 °C sıcaklıkta manyetik karıştırıcıda gece boyu karışmaya bırakıldı.

%0,5 Kar (formik asit/aseton, 3:7, v:v) çözeltisi 3 saat ultrasonik banyoya bırakıldı. Ardından PCL-Kar farklı oranlarda (9:1, 8:2, 7:3 ve 5:5, v:v) olacak şekilde iki polimer çözeltisi karıştırılarak 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Devam eden süreçte tekrardan 3 saat ultrasonik banyoya alınan çözeltiler gece boyu manyetik karıştırıcıya bırakıldı ve ertesi gün elektroğirme tekniği ile ITO kaplı camların üzerinde nanoliflerin üretimi gerçekleştirildi. (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Elektroğirme çözeltilerinin içeriği

PCL		Karragenan		Polimer çözeltilerinin (w:v) karışım içerisindeki konsantrasyonu (PCL:Kar, v:v)
(w:v)	Çözgen sistemi (v:v)	(w:v)	Çözgen sistemi (v:v)	
10	FA/Ac	-	-	10% PCL
		0,5	FA/Ac	%9 PCL, 0,05% Kar (9:1, v:v)
				%8 PCL, 0,10% Kar (8:2, v:v)
				%7 PCL, 0,15% Kar (7:3, v:v)
				%5 PCL, 0,25% Kar (5:5, v:v)

Farklı oranlarda hazırlanan PCL-Kar polimer çözeltisi karışımlarından yola çıkılarak elektroğirme yöntemiyle nanolif üretimi parametrelerinin (Akış hızı, uygulanan voltaj (kV), toplayıcı mesafesi (cm)) optimizasyonu gerçekleştirildi (Çizelge 3.2). Bu aşamada üretilen nanoliflerin morfolojik incelemeleri için ışık mikroskobu kullanılarak proses kontrolü gerçekleştirildi.

Çizelge 3.2 PCL-Kar nanoliflerinin elektroğirme parametreleri

Örnekler	Elektroegirme parametreleri		
	Voltaaj (kV)	Akış hızı (mL/h)	Toplayıcı uzaklığı (cm)
10% PCL	12-21	1,30-2,00	16-20
PCL-Kar (9:1, v:v)	7-10	0,60-1,00	12-20
PCL-Kar (8:2, v:v)	8-10	0,60-0,70	10-12
PCL-Kar (7:3, v:v)	10-15	0,50-0,75	13-18
PCL-Kar (5:5, v:v)	7-10	0,60-0,80	12

3.3.2. PCL–Kar nanoliflerin karakterizasyonu

Hazırlanan nanoliflerin karakterizasyon çalışmaları için ışık mikroskobu görüntüleri, temas açısı ölçümleri ve taramalı alan mikroskobu (SEM) görüntüleri kullanıldı.

3.3.2.1. Işık mikroskobu

Elde edilen nanoliflerin karakterizasyonunda ilk basamak ışık mikroskobu görüntülerinin alınmasıdır. Bu aşamada temel olarak lif üretilip üretilmediği ve genel olarak morfolojileri incelendi.

3.3.2.2. Temas açısı

Hazırlanan nanoliflerin hidrofilik-hidrofobik karakterlerinin belirlenmesi amacıyla temas açısı ölçümleri Attention Theta Gonimeter cihazıyla gerçekleştirildi.

3.3.2.3. SEM

Karakterizasyon basamağının son aşamasında nanoliflerin taramalı alan mikroskobu (SEM) görüntüleri hizmet alımı ile Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi–DAYTAM laboratuvarlarında alındı ve nanolif çapları incelendi.

ImageJ programı yardımıyla nanoliflerin SEM görüntüleri kullanılarak ve nanolif çapları belirlendi ve ardından OriginPro programı kullanılarak nanolif çaplarının dağılımını gösteren histogram grafikleri çizildi ve ortalama nanolif çapları hesaplandı.

3.3.3. Nanoliflerin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri

Hazırlanan nanoliflerin *in vitro* hücre kültürü denemeleri için HaCaT (insan deri keratinosit) (American Type Culture Collection, ATCC) hücre hattı, model olarak kullanıldı. HaCaT hücreleri, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) ortamında 37 °C, %5,0 CO₂ içeren inkübatörde kültive edildi.

ITO kaplı camların üzerinde biriktirilen nanolifler 30 dk UV ışık altında steril edildikten sonra 6 kuyucuklu plakalara alınarak üzerlerine 2,5x10⁴ hücre/2 mL HaCaT hücresi ekildikten sonra 48 ve 72 saat süresince 37 °C, %5,0 CO₂ içeren inkübatörde kültive edildi. Kültivasyonun ardından; büyüme ortamı uzaklaştırılan nanolif kaplı ITO cam yüzeylerdeki hücreler PBS ile yıkandıktan sonra fiksle edilerek hücre nükleuslarını boyayan DAPI (diamino-2-fenilindol) ile 15 dk inkübe edildi ve sonrasında floresans mikroskop yardımıyla her örnek için 9 farklı bölgeden görüntüler alındı. Elde edilen mikroskop görüntülerindeki hücre çekirdekleri sayılarak PCL-Kar (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 5:5, v:v) nanoliflerinin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri incelendi.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda PCL-Kar (7:3, v:v) nanolifleri ile çalışmaların devam etmesine karar verildi.

3.3.4. PCL ve PCL-Kar nanoliflerinin FTIR analizleri

Hazırlanan PCL ve PCL-Kar (7:3, v:v) nanoliflerinin FTIR spektroskopisi ile, moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak; yapılarındaki fonksiyonel gruplar hakkında fikir sahibi olunarak, karragenan içeriği tespit edilmesi hedeflenildi. Çalışmalar Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.3.5. PCL ve PCL-Kar nanoliflerinin SEM-EDS analizlerinin gerçekleştirilmesi

Hazırlanan PCL ve PCL-Kar (7:3, v:v) nanoliflerinin taramalı alan mikroskobu–X ışını enerji dağılım spektroskopisi (SEM-EDS) ile elemental analizleri gerçekleştirilerek nanolif içeriğindeki K-karragenandan kaynaklı olarak bulunması beklenen kükürt içeriği incelendi. Çalışmalar hizmet alımı ile EGE MATAAL laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.3.6. *Nigella sativa* (çörek otu) yağı ile zenginleştirilen PCL-Kar nanoliflerinin üretimi ve elektroegirme parametrelerinin optimizasyonu

Başlık 3.1.2’de açıklanan şekilde; %10 PCL (formik asit/aseton; 3:7, v:v) ve %0,5 K-karragenan (formik asit/aseton; 3:7, v:v) çözeltilerinden yola çıkılarak PCL-Karragenan (7:3) çözeltisi hazırlandı. Ardından son konsantrasyonu 2,5; 5; 10; 25; 50 mg/mL olacak şekilde (Çizelge 3.3) çörek otu yağı (ÇOY) tartılarak ilave edildi ve gece boyu manyetik karıştırıcıya bırakıldı.

Çizelge 3.3 Elektroegirme çözeltilerinin içeriği

PCL-Karragenan		Çörek otu yağı (mg/mL)
PCL:Kar (v:v)	Çözgen sistemi (v:v)	
PCL-Kar (7:3)	FA/Ac (3:7)	2,5
		5
		10
		25
		50

Elektroegirme tekniği ile farklı konsantrasyonlarda çörek otu yağı içeren PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin üretimi gerçekleştirildi. Elektroegirme parametreleri Çizelge 3.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin elektroegirme parametreleri

Örnekler	Elektroegirme parametreleri		
	Voltaaj (kV)	Akış hızı (mL/h)	Toplayıcı uzaklığı (cm)
PCL-Kar-ÇOY (2,5 mg/mL)	15	0,60-1,00	14
PCL-Kar-ÇOY (5 mg/mL)	17	0,70-0,90	13
PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL)	15-16	0,50-0,75	17
PCL-Kar-ÇOY (25 mg/mL)	13-15	0,60-0,90	17

3.3.7. PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin karakterizasyonu

Hazırlanan nanoliflerin karakterizasyon çalışmaları için ışık mikroskobu görüntüleri, temas açısı ölçümleri ve taramalı alan mikroskobu (SEM) görüntüleri kullanıldı.

3.3.7.1. Işık mikroskobu

Elde edilen nanoliflerin karakterizasyonunda ilk basamak ışık mikroskobu görüntülerinin alınmasıdır. Bu aşamada temel olarak lif üretilip üretilmediği ve genel olarak morfolojileri incelendi.

3.3.7.2. Temas açısı

Hazırlanan nanoliflerin hidrofilik-hidrofobik karakterlerinin belirlenmesi amacıyla temas açısı ölçümleri Attention Theta Gonimeter cihazıyla gerçekleştirildi.

3.3.7.3. SEM

Karakterizasyon basamağının son aşamasında nanoliflerin taramalı alan mikroskobu (SEM) görüntüleri hizmet alımı ile EGE MATAI laboratuvarlarında alınarak gerçekleştirildi ve nanolif çapları incelendi.

ImageJ programı yardımıyla nanoliflerin SEM görüntüleri kullanılarak nanolif çapları belirlendi ve ardından OriginPro programı kullanılarak nanolif çaplarının dağılımını gösteren histogram grafikleri çizildi ve ortalama nanolif çapları hesaplandı.

3.3.8. PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri

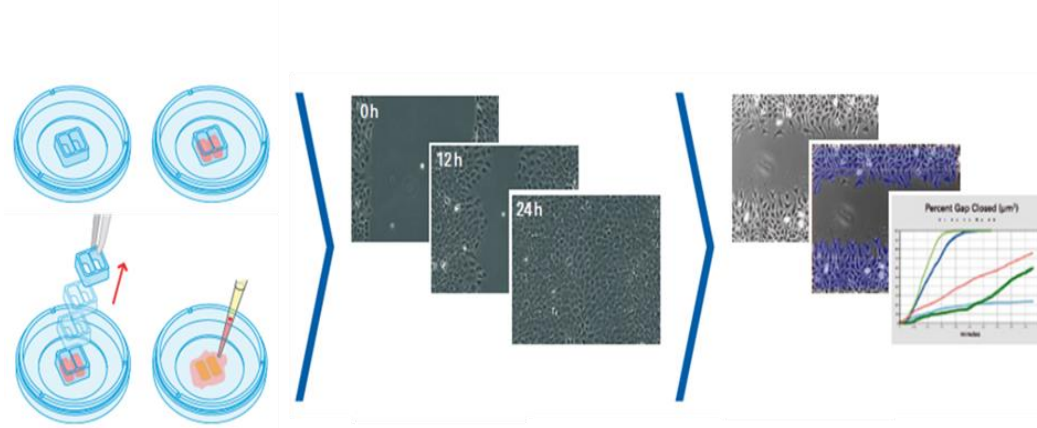
Hazırlanan nanoliflerin *in vitro* hücre kültürü denemeleri için HaCaT (insan deri keratinosit) (American Type Culture Collection, ATCC) hücre hattı, model olarak kullanıldı. HaCaT hücreleri, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) ortamında 37 °C, %5,0 CO₂ içeren inkübatörde kültive edildi.

ITO kaplı camların üzerinde biriktirilen nanolifler, 30 dk UV ışık altında steril edildikten sonra 6 kuyucuklu plakalara alınarak üzerlerine $2,5 \times 10^4$ hücre/2 mL HaCaT hücresi ekilerek 72 saat süresince 37°C , %5,0 CO_2 içeren inkübatörde kültive edildi. Kültivasyonun ardından; büyüme ortamı uzaklaştırılan nanolif kaplı ITO cam yüzeylerdeki hücreler PBS ile yıkandıktan sonra fikse edilerek hücre nükleuslarını boyayan DAPI (diamino-2-fenilindol) ile 15 dk inkübe edildi ve sonrasında floresan mikroskop yardımıyla her örnek için 9 farklı bölgeden görüntüler alındı. Elde edilen mikroskop görüntülerindeki hücre çekirdekleri sayılarak farklı konsantrasyonlarda (2,5; 5; 10; 25; 50 mg/mL) çörek otu yağı içeren PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri incelendi. Denemeler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri ile çalışmaların devam etmesine karar verildi.

3.3.9. PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin yara kapama etkinlikleri

Elektroeğirme tekniği ile ITO kaplı camların üzerinde PCL-Kar (7:3, v:v) ve PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanoliflerinin üretimi gerçekleştirildi ve 30 dk UV ışık altında steril edildikten sonra 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına alındı. Ardından steril Culture-Insert 2 Well (ibidi) her bir kuyucuktaki bulunan üzeri nanolif ile kaplı ITO camların üzerine yerleştirilerek 5×10^5 hücre/mL HaCaT hücre stoğundan Culture-Insert üzerindeki her bir kuyucuğa 70 μL hücre ekimi gerçekleştirildi. Hazırlanan örnekler 24 saat süresince 37°C , %5,0 CO_2 içeren inkübatörde HaCaT hücrelerinin konfluent hale gelmesi için kültive edildi. Kültivasyonun ardından Culture-Insert dikkatlice çıkarılarak PBS ile örnekler yıkandı ve üzerlerine 2 mL taze DMEM besiyeri ilave edilip 0-2-4-6-8-12-24-48 ve 72 saat görüntüleri alınarak migrasyon temelli yara kapama modeli oluşturuldu (Şekil 3.1). Culture-Insert sayesinde 500 μm açıklığında oluşturulan yara açıklığının kapanması incelendi.



Şekil 3.1 Culture-Insert kullanılarak oluşturulan yara kapama modeli çalışması.

3.3.10. Rhodamine B içeren PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin floresan mikroskop ile görüntülenmesi

1 mg/mL Rhodamine B içerecek şekilde PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) çözeltisi hazırlanarak ITO kaplı camların üzerinde nanoliflerinin üretimi gerçekleştirildi. ITO kaplı camların üzerinde biriktirilen nanolifler, 30 dk UV ışık altında steril edildikten sonra 6 kuyucuklu plakalara alınarak üzerlerine $2,5 \times 10^4$ hücre/2 mL HaCaT hücresi ekilip 72 saat süresince 37 °C, %5,0 CO₂ içeren inkübatörde kültive edildi.

Kültivasyonun ardından; büyüme ortamı uzaklaştırılan nanolif kaplı ITO cam yüzeylerdeki hücreler PBS ile yıkandıktan sonra fiksle edildi. Ardından, ilk olarak ökaryotik hücrelerde hücresel iskeleti oluşturan Aktin filamentlerini seçimli olarak boyayan Alexa Fluor™ 488 Phalloidin ile 60 dk inkübe edildi ve PBS ile yıkandı. Daha sonra ise hücre nükleuslarını boyayan DAPI ile 15 dk inkübe edildi ve floresan mikroskop yardımıyla 3 farklı filtrede görüntüler alındı. Elde edilen floresan mikroskop görüntüleri ImageJ programı yardımıyla karşılaştırıldı.

3.3.11. PCL, PCL-Kar ve PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin şişme testleri

Nanolif örneklerinin şişme testleri gravimetrik metotla gerçekleştirildi. Nanolifler kuru ağırlıkları kaydedilerek her biri 50 mM pH=7,4 PBS tamponu içerisine daldırılarak 37 °C 'de inkübe edildi. 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 ve 72. saatlerde örnekler tampon içerisinden pens yardımıyla

alınarak yüzeydeki fazla sıvı kurutma kağıdına emdirilip ardından tartımlar alınarak aşağıda verilen formül doğrultusunda hesaplamalar yapıldı.

$$\% \text{ Şişme} = \frac{W_s - W_0}{W_0} \times 100$$

W_0 = kuru numune ağırlığı

W_s = şişmiş numune ağırlığı

3.4. PCL-CA-MA Nanoliflerinden Yara Örtüsü Geliştirilmesi

3.4.1. PCL–CA nanoliflerin üretilmesi ve elektroğirme parametrelerinin optimizasyonu

%10 Polikaprolakton (w:v) çözeltisi hazırlanırken ilk basamakta gerekli miktarda PCL tartılarak formik asit içerisinde 45 °C sıcaklıkta manyetik karıştırıcıda çözünmesinin ardından formik asit/aseton (3:7, v:v) olacak şekilde aseton ilave edilerek gece boyu karışmaya bırakıldı.

%15 Selüloz asetat (w:v) çözeltisi hazırlanırken gerekli miktarda CA tartılarak 1:9 (v:v) oranında karıştırılmış olan DMF/Ac çözgen sistemi içerisinde 45 °C sıcaklıkta manyetik karıştırıcıda çözünmesinin ardından gece boyu sıcaklık kapatılarak karışmaya bırakıldı.

%10 PCL ve %15 CA çözgen sistemleri kullanılarak elde edilen çözeltileri farklı oranlarda karıştırılarak, (v:v) 9:1, 7:3, 5:5, 3:7 ve 1:9 olacak şekilde, PCL-CA çözeltileri hazırlandı (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 PCL-CA Elektroğirme çözeltilerinin içeriği

PCL		CA		Polimer çözeltilerinin (w:v) karışım içerisindeki konsantrasyonu (%PCL: %CA, v:v)
(w:v)	Çözgen sistemi (v:v)	(w:v)	Çözgen sistemi (v:v)	
10	FA/Ac (3:7)	15	Ac/DMF (9:1)	%10 PCL
				%9 PCL, %1,5 CA; (9:1, v:v)
				%7 PCL, %4,5 CA; (7:3, v:v)
				%5 PCL, %7,5 CA; (5:5, v:v)

%3 PCL, %10,5 CA; (3:7, v:v)
 %1 PCL, %13,5 CA; (1:9, v:v)
 %15 CA

Farklı oranlarda hazırlanan PCL-CA polimer çözeltisi karışımlarından yola çıkılarak elektroegirme yöntemiyle nanolif üretimi parametrelerinin (Akış hızı, uygulanan voltaj (kV), toplayıcı mesafesi (cm)) optimizasyonu gerçekleştirildi (Çizelge 3.6). Bu aşamada üretilen nanoliflerin morfolojik incelemeleri için ışık mikroskobu kullanılarak proses kontrolü gerçekleştirildi.

Çizelge 3.6 PCL-CA nanoliflerinin elektroegirme parametreleri

Örnekler	Elektroegirme parametreleri		
	Voltaj (kV)	Akış hızı (mL/h)	Toplayıcı uzaklığı (cm)
%10 PCL	8	0,3	24-22
PCL-CA (9:1, v:v)	8	0,2	20
PCL-CA (7:3, v:v)	14	0,3	17
PCL-CA (5:5, v:v)	10	0,7	18
PCL-CA (3:7, v:v)	12	1,2	18
PCL-CA (1:9, v:v)	10	0,5	14
%15 CA	15	1,2	20

3.4.2. PCL-CA nanoliflerin karakterizasyonu

Hazırlanan nanoliflerin karakterizasyon çalışmaları için ışık mikroskobu görüntüleri, temas açısı ölçümleri ve taramalı alan mikroskobu (SEM) görüntüleri kullanıldı.

3.4.2.1. Işık mikroskobu

Elde edilen nanoliflerin karakterizasyonunda ilk basamak ışık mikroskobu görüntülerinin alınmasıdır. Bu aşamada temel olarak lif üretilip üretilmediği ve genel olarak morfolojileri incelendi.

3.4.2.2. Temas açısı

Hazırlanan nanoliflerin hidrofilik-hidrofobik karakterlerinin belirlenmesi amacıyla temas açısı ölçümleri Attention Theta Gonimeter cihazıyla gerçekleştirildi.

3.4.2.3. SEM

Karakterizasyon basamağının son aşamasında nanoliflerin taramalı alan mikroskobu (SEM) görüntüleri hizmet alımı ile E.Ü. Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (EGE MATA) alındı ve nanolif çapları incelendi.

ImageJ programı yardımıyla nanoliflerin SEM görüntüleri kullanılarak nanolif çapları belirlendi ve ardından OriginPro programı kullanılarak nanolif çaplarının dağılımını gösteren histogram grafikleri çizilerek ortalama nanolif çapları hesaplandı.

3.4.3. PCL-CA Nanoliflerin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri

Hazırlanan nanoliflerin *in vitro* hücre kültürü denemeleri için HaCaT (insan deri keratinosit) (American Type Culture Collection, ATCC) hücre hattı, model olarak kullanıldı. HaCaT hücreleri, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) ortamında 37 °C, %5,0 CO₂ içeren inkübatörde kùltive edildi.

Elektroeğirme işlemi esnasında yüzeyi alüminyum folyo ile kaplanmış olan toplayıcı üzerinde biriktirilen %10 PCL, %15 CA ve PCL-CA (9:1, 7:3, 5:5, 3:7; 1:9, v:v) nanolifleri 2x2 cm ebatlarında kesilerek yüzey üzerinden kaldırıldı. Ardından nanoliflerin her iki yüzeyi de 30 dk. UV ışık ile sterilize edilerek *in vitro* hücre kültürü denemeleri için hazır hale getirildi.

Nanoliflerin hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek amacıyla 3-(4,5 Dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi kullanıldı. HaCaT hücreleri 10⁴/100µL hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalaklara ekilerek 24 saat standart kültür koşullarında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki besiyeri tazelendi ve steril haldeki nanolifler pens yardımıyla kuyucuklara aktararak standart kültür koşullarında 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon sürelerinin ardından örnekler ve besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırılarak DMEM ortamı içerisinde hazırlanan 100 µL %10 MTT çözeltisi kuyucuklara eklendi ve 4 saat süreyle inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyonun ardından oluşan her kuyucuğa 150 µL DMSO çözeltisi eklenerek orbital karıştırıcıda formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Ardından UV-VIS spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen değerler kontrol grubu olan PCL referans alınarak % canlılık olarak hesaplandı. Çalışmalar dört tekrarlı gerçekleştirildi.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda PCL-CA (9:1, v:v) nanolifleri ile çalışmaların devam etmesine karar verildi.

3.4.4. PCL, CA ve PCL-CA nanoliflerinin FTIR analizleri

Hazırlanan PCL, CA ve PCL-CA (9:1, v:v) nanoliflerinin FTIR spektroskopisi ile, moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak; yapılarındaki fonksiyonel gruplar hakkında fikir sahibi olunarak, CA içeriği tespit edilmesi hedeflenildi. Çalışmalar Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.4.5. Mandelik asit (MA) içeren PCL-CA nanoliflerinin üretimi ve elektroegirme parametrelerinin optimizasyonu

Başlık 3.2.2’de açıklanan şekilde %10 PCL ve %15 CA çözeltilerinden PCL-CA (9:1, v:v) çözeltisi hazırlanması sırasında son derişimleri 25; 50; 100; 250 ve 500 mM olacak şekilde mandelik asit (MA) tartılarak polimer çözeltisi karışımlarına ilave edildi ve gece boyu manyetik karıştırıcıya bırakıldı (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7 PCL-CA-MA Elektroegirme çözeltilerinin içeriği

PCL-CA (v:v)	Mandelik asit (mM)
PCL-CA (9:1, v:v)	25
	50
	100
	250
	500

Farklı konsantrasyonlarda MA içeren PCL-CA (9:1, v:v) polimer çözeltisi karışımlarından yola çıkılarak elektroegirme yöntemiyle nanolif üretimi parametrelerinin (Akış hızı, uygulanan voltaj (kV), toplayıcı mesafesi (cm)) optimizasyonu gerçekleştirildi (Çizelge 3.8). Bu aşamada üretilen nanoliflerin morfolojik incelemeleri için ışık mikroskobu kullanılarak proses kontrolü gerçekleştirildi.

Çizelge 3.8 PCL-CA-MA nanoliflerinin elektroegirme parametreleri

Örnekler	Elektroegirme parametreleri
----------	-----------------------------

	Voltaj (kV)	Akış hızı (mL/h)	Toplayıcı uzaklığı (cm)
PCL-CA-MA (25 mM)	15	1,20	15
PCL-CA-MA (50 mM)	15	1,20	15
PCL-CA-MA (100 mM)	15	1,00	16
PCL-CA-MA (250 mM)	15	0,70	16
PCL-CA-MA (500 mM)	17	0,50	17

3.4.6. PCL-CA-MA nanoliflerinin karakterizasyonu

Hazırlanan PCL-CA-MA nanoliflerin karakterizasyon çalışmaları için ışık mikroskobu görüntüleri, temas açısı ölçümleri ve taramalı alan mikroskobu (SEM) görüntüleri kullanıldı.

3.4.6.1. Işık mikroskobu

Elde edilen nanoliflerin karakterizasyonunda ilk basamak ışık mikroskobu görüntülerinin alınmasıdır. Bu aşamada temel olarak lif üretilip üretilmediği ve genel olarak morfolojileri incelendi.

3.4.6.2. Temas açısı

Hazırlanan nanoliflerin hidrofilik-hidrofobik karakterlerinin belirlenmesi amacıyla temas açısı ölçümleri Attention Theta Gonimeter cihazıyla gerçekleştirildi.

3.4.6.3. SEM

Karakterizasyon basamağının son aşamasında nanoliflerin taramalı alan mikroskobu (SEM) görüntüleri hizmet alımı ile EGE MATAI laboratuvarlarında alınarak gerçekleştirildi ve nanolif çapları incelendi.

ImageJ programı yardımıyla nanoliflerin SEM görüntüleri kullanılarak nanolif çapları belirlendi ve ardından OriginPro programı kullanılarak nanolif çaplarının dağılımını gösteren histogram grafikleri çizildi ve ortalama nanolif çapları hesaplandı.

3.4.7. PCL-CA-MA nanoliflerinin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri

Hazırlanan PCL-CA-MA nanoliflerin *in vitro* hücre kültürü denemeleri için HaCaT (insan deri keratinosit) (American Type Culture Collection, ATCC) hücre hattı, model olarak kullanıldı. HaCaT hücreleri, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) ortamında 37 °C, %5,0 CO₂ içeren inkübatörde kùltive edildi.

Elektroeğirme işlemi esnasında yüzeyi alüminyum folyo ile kaplanmış olan toplayıcı üzerinde biriktirilen farklı konsantrasyonlarda MA içeren (25; 50; 100; 250; 500 mM) PCL-CA-MA nanolifleri 2x2 cm ebatlarında kesilerek yüzey üzerinden kaldırıldı. Ardından nanoliflerin her iki yüzeyi de 30 dk. UV ışık ile sterilize edilerek *in vitro* hücre kültürü denemeleri için hazır hale getirildi.

Nanoliflerin hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek amacıyla 3-(4,5 Dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi kullanıldı. HaCaT hücreleri 10⁴/100µL hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalakalara ekilerek 24 saat standart kültür koşullarında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki besiyeri tazelendi ve steril haldeki nanolifler pens yardımıyla kuyucuklara aktarılarak standart kültür koşullarında 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon sürelerinin ardından örnekler ve besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırılarak DMEM ortamı içerisinde hazırlanan 100 µL %10 MTT çözeltisi kuyucuklara eklendi ve 4 saat süreyle inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyonun ardından oluşan her kuyucuğa 150 µL DMSO çözeltisi eklenerek orbital karıştırıcıda formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Ardından UV-VIS spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen değerler kontrol grubu olan PCL-CA (9:1, v:v) referans alınarak % canlılık olarak hesaplandı. Çalışmalar dört tekrarlı gerçekleştirildi.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda PCL-CA-MA (25 mM) nanolifleri ile çalışmaların devam etmesine karar verildi.

3.4.8. PCL-CA-MA nanoliflerinin yara kapama etkinlikleri

PCL-CA (9:1, v:v) ve PCL-CA-MA (25 mM) nanoliflerinin yara kapama etkinlikleri Culture-Insert 2 Well (ibidi) kullanılarak 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında gerçekleştirildi. Kuyucuklara yerleştirilen Culture-Insert üzerindeki her bir bölmeye 3x10⁵

hücre/mL HaCaT hücre stoğundan 70 µL hücre ekimi gerçekleştirildi ve 24 saat süresince 37 °C, %5,0 CO₂ içeren inkübatörde hücrelerin konfluent hale gelmesi için kültive edildi. Kültivasyonun ardından Culture-Insertler dikkatlice çıkarılarak kuyucuklara 2 mL taze DMEM besiyeri ilave edildi. Ardından 2x2 cm ebatlarında kesilip UV ışık altında steril edilen nanolif örnekleri kuyucuklara pens yardımıyla eklendi ve 0-2-4-6-8-24-48 ve 72 saat görüntüleri alınarak migrasyon temelli yara kapama modeli oluşturuldu. Kullanılan Culture-Insert sayesinde 500 µm açıklığında oluşturulan yara açıklığının kapanması incelendi (Şekil 3.1).

3.4.9. PCL-CA-MA nanoliflerinin zamana bağlı temas açısı ölçümleri

PCL-CA-MA (25 mM) nanoliflerinin zamana bağlı olarak temas açısı değerindeki değişimi gözlemek amacıyla Attention Theta Gonimeter cihazıyla damlacık görüntüsü tamamen kaybolana kadar (bir saat süresince) ölçümler gerçekleştirildi.

3.4.10. PCL, CA PCL-CA ve PCL-CA-MA nanoliflerinin şişme testleri

Nanolif örneklerinin şişme testleri gravimetrik metotla gerçekleştirildi. Nanolifler kuru ağırlıkları kaydedilerek her biri 50 mM pH=7,4 PBS tamponu içerisine daldırılarak 37 °C 'de inkübe edildi. 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 ve 72. saatlerde örnekler tampon içerisinden pens yardımıyla alınarak yüzeydeki fazla sıvı kurutma kağıdına emdirilip ardından tartımlar alınarak aşağıda verilen formül doğrultusunda hesaplamalar yapıldı.

$$\% \text{ Şişme} = \frac{W_s - W_0}{W_0} \times 100$$

W_0 = kuru numune ağırlığı

W_s = şişmiş numune ağırlığı

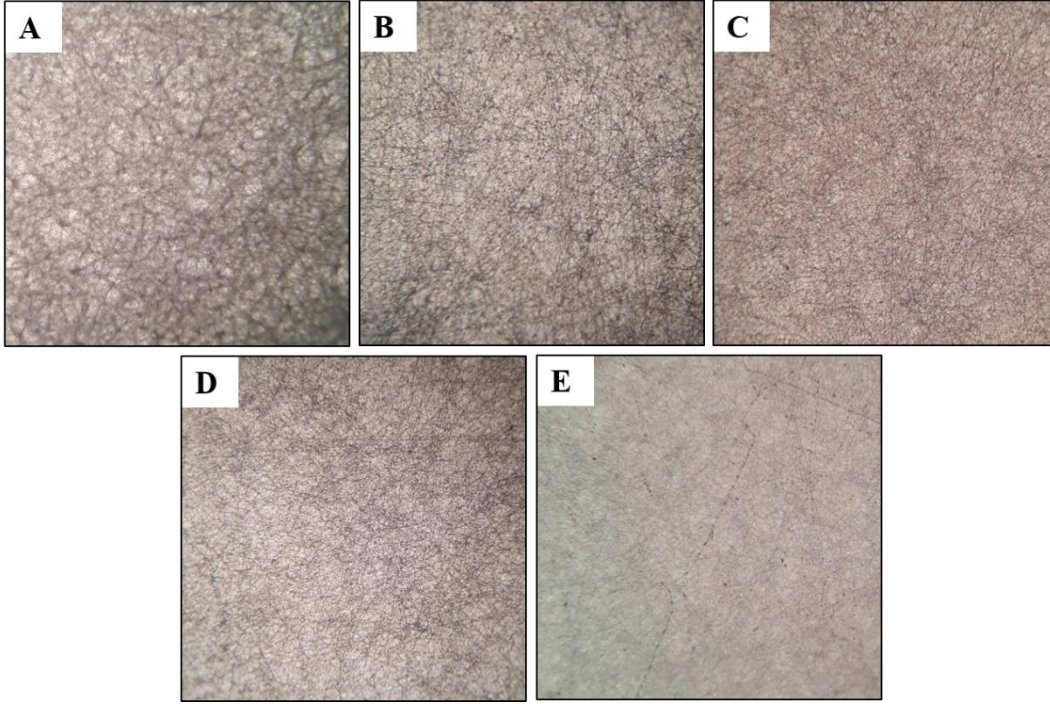
4. BULGULAR

4.1. PCL-Kar-ÇOY Nanoliflerinden Doku İskelesi Geliştirilmesi

4.1.1. PCL–Kar nanoliflerin karakterizasyonu

4.1.1.1. Işık mikroskobu

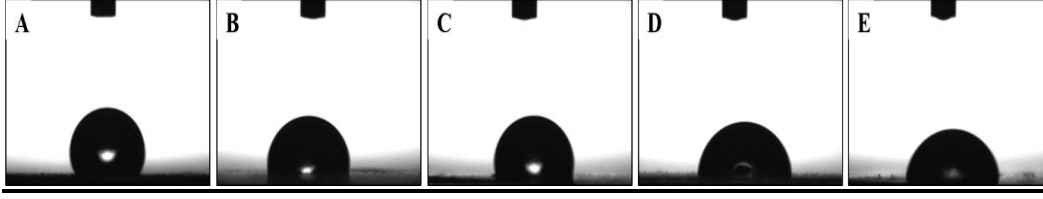
Elde edilen PCL-Kar (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 5:5, v:v) nanoliflerinin karakterizasyonunda ilk basamak ışık mikroskobu görüntülerinin alınmasıdır. Bu aşamada temel olarak lif üretilip üretilmediği ve genel olarak morfolojileri incelendi. Elde edilen görüntüler Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1 PCL-Kar (v:v) A) 10:0; B) 9:1; C) 8:2; D) 7:3; E) 5:5 nanoliflerinin ışık mikroskobu görüntüleri

4.1.1.2. Temas açısı

PCL-Kar (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 5:5, v:v) nanoliflerinin hidrofilik/hidrofobik karakterlerinin belirlenmesi amacıyla Attention Theta Gonimeter cihazıyla temas ölçümleri alındı. Elde edilen görüntüler Şekil 4.2; ilgili değerler ise Çizelge 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.2 PCL-Kar (v:v) A) 10:0; B) 9:1; C) 8:2; D) 7:3; E) 5:5 nanoliflerinin temas açısı görüntüleri

Çizelge 4.1 PCL-Kar (v:v) (10:0; 9:1; 8:2; 7:3; 5:5) nanoliflerinin temas açısı ölçüm değerleri

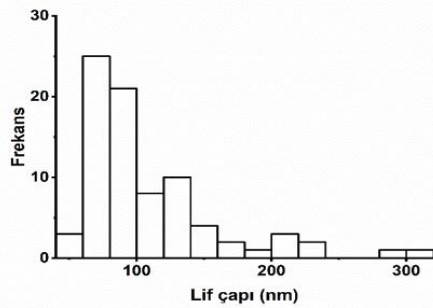
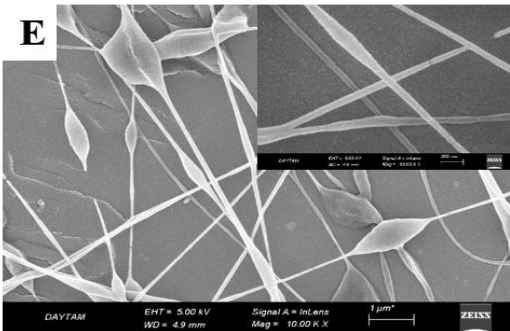
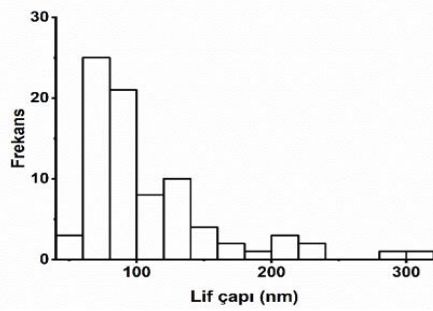
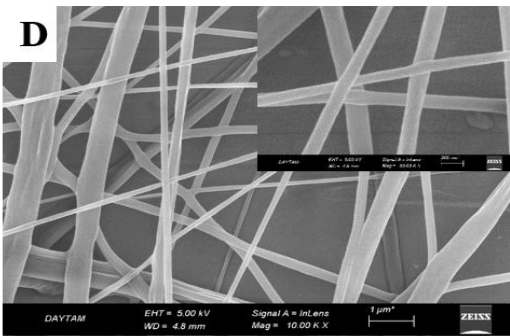
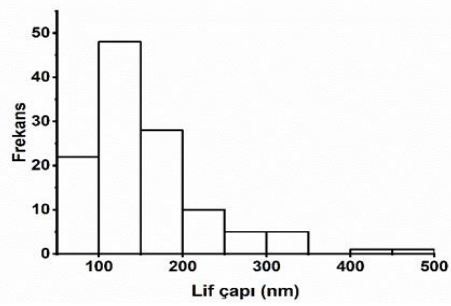
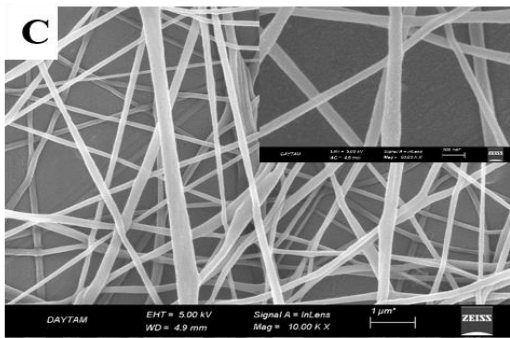
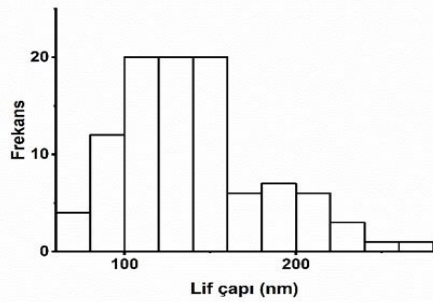
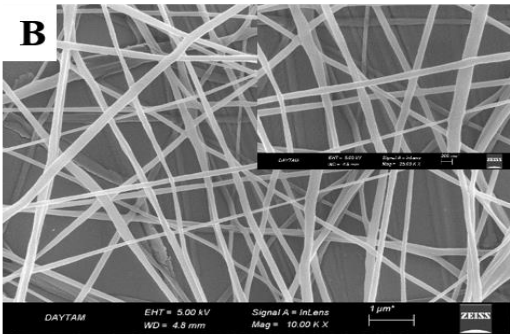
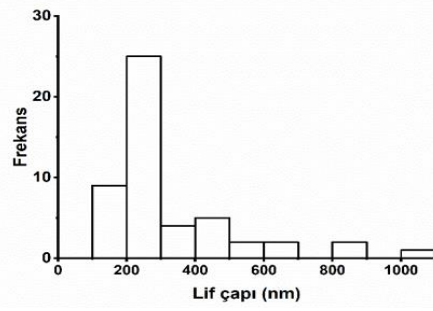
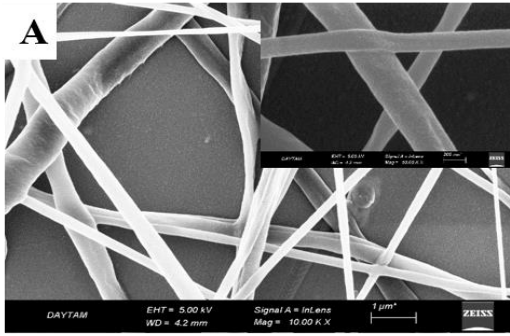
	PCL (10:0, v:v)	PCL-Kar (9:1, v:v)	PCL-Kar (8:2, v:v)	PCL-Kar (7:3, v:v)	PCL-Kar (5:5, v:v)
Temas Açısı (°)	120,30±1,24	91,46±5,32	95,96±2,50	86,09±2,99	79,58±4,55

4.1.1.3. SEM

Karakterizasyon basamağının son aşamasında PCL-Kar (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 5:5, v:v) nanoliflerinin morfolojileri detaylı olarak incelenerek; SEM mikrografları yardımıyla lif çapı dağılım grafikleri çizildi ve ortalama lif çapları hesaplandı. Elde edilen SEM mikrografları ve lif çapı dağılım histogramları Şekil 4.3 ve ortalama lif çapları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 PCL-Kar (10:0; 9:1; 8:2; 7:3; 5:5; v:v) nanoliflerinin ortalama lif çapları

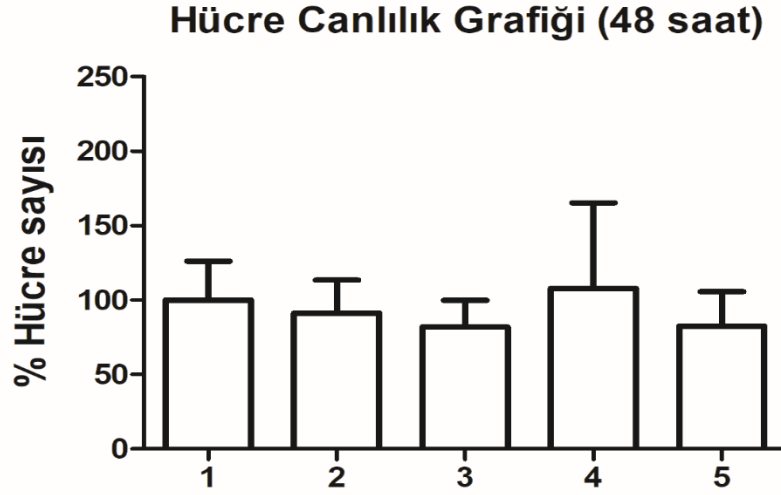
	PCL (10:0, v:v)	PCL-Kar (9:1, v:v)	PCL-Kar (8:2, v:v)	PCL-Kar (7:3, v:v)	PCL-Kar (5:5, v:v)
Ortalama Lif Çapı (nm)	233,8±8,22	127,37±3,49	130,65±2,99	148,43±18,97	79,27±2,03



Şekil 4.3 PCL-Kar (v:v) A) 10:0; B) 9:1; C) 8:2; D) 7:3; E) 5:5 nanoliflerinin SEM mikrografları ve lif çapı dağılım histogramları

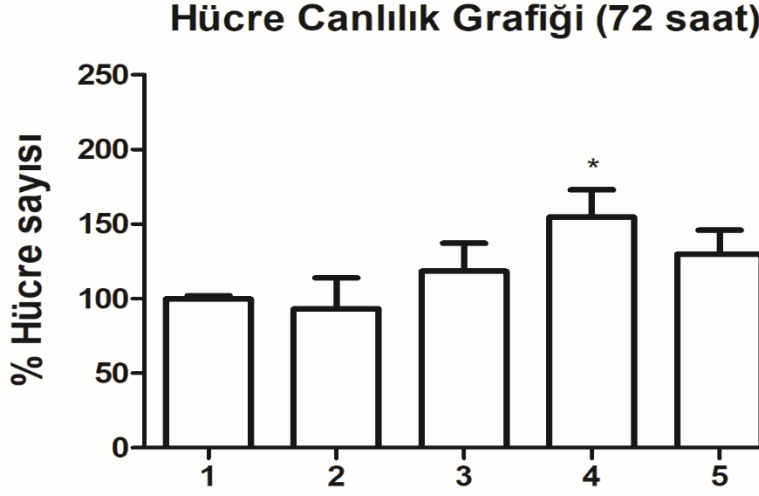
4.1.2. Nanoliflerin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri

PCL-Kar (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 5:5; v:v) nanolifleri üzerinde 48 ve 72 saat süreyle kültive edilen HaCaT hücrelerinin canlılığı; hücre çekirdeklerinin DAPI ile işaretlenmesinin ardından floresans mikroskopla alınan görüntülerin işlenmesiyle belirlendi. 48 saat süren canlılık denemesinin sonuçları incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 PCL-Karragenan nanolifleri üzerinde 48 saat süresince kültive edilen HaCaT hücrelerinin canlılığı. 1:PCL; 2:PCL-Kar (9:1, v:v); 3: PCL-Kar (8:2, v:v); 4: PCL-Kar (7:3, v:v); 5: PCL-Kar (5:5, v:v).

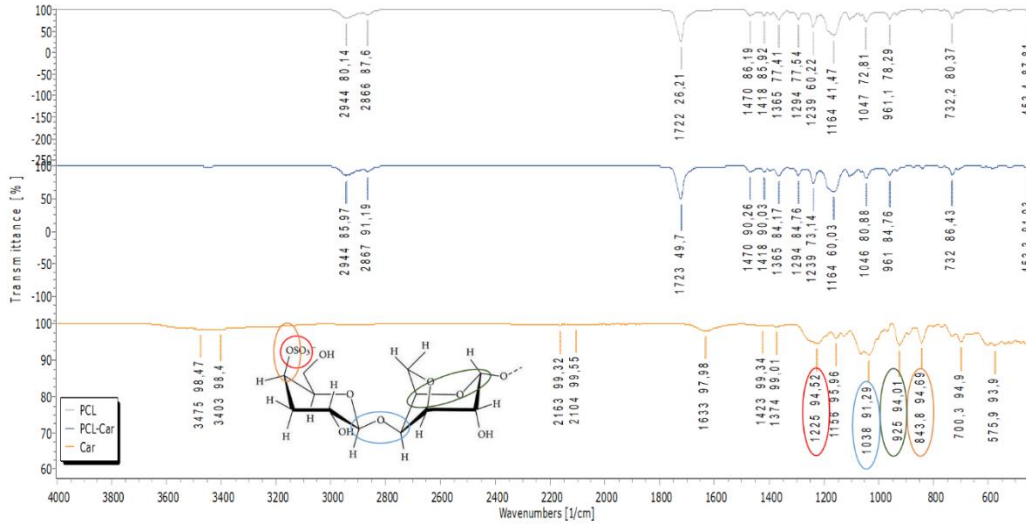
72 saat süreyle PCL-Kar (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 5:5, v:v) nanolifleri üzerinde kültive edilen HaCaT hücreleri canlılığına ilişkin veriler değerlendirildiğinde; PCL-Kar (7:3) nanolifleri üzerinde kültive edilen hücrelerin canlılığı kontrol grubu olan PCL nanolifleri üzerinde kültive edilenlere kıyasla $154,72 \pm 18,32$ olarak belirlendi (Şekil 4.5). İlerleyen süreçte nanoliflerin zenginleştirilmesi amacıyla farklı miktarlarda *Nigella sativa* yağı içeren PCL-Kar (7:3, v:v) nanoliflerinin kullanılmasına karar verildi.



Şekil 4.5 PCL-Karragenan nanolifleri üzerinde 72 saat süresince kültüre edilen HaCaT hücrelerinin canlılığı.
1:PCL; 2:PCL-Kar (9:1, v:v); 3: PCL-Kar (8:2, v:v); 4: PCL-Kar (7:3, v:v); 5: PCL-Kar (5:5, v:v).

4.1.3. PCL ve PCL-Kar nanoliflerinin FTIR analizleri

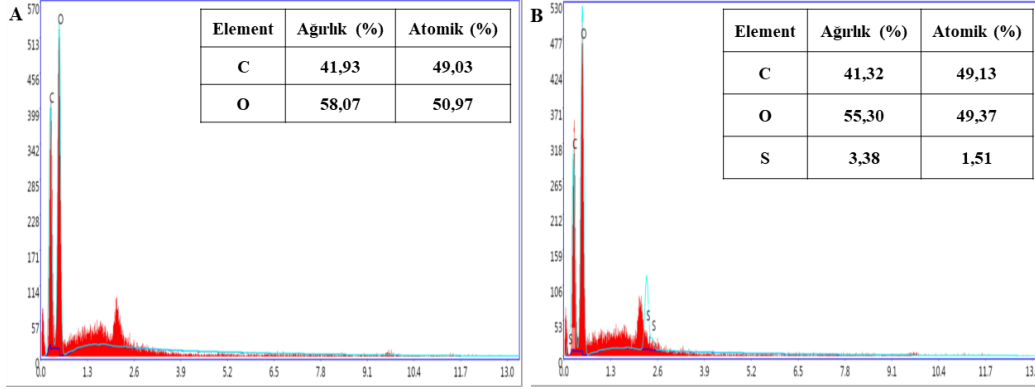
PCL-Kar nanoliflerinin içeriğindeki K-Karragenanın gösterilebilmesi amacıyla PCL, K-Karragenan ve PCL-Kar (7:3, v:v) örneklerinde gerçekleştirilen FTIR analizleri sonucunda elde edilen spektrumlar Şekil 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.6 PCL, PCL-Kar (7:3, v:v), K-Karragenan için elde edilen FTIR spektrumları.

4.1.4. PCL ve PCL-Kar nanoliflerinin SEM-EDS analizleri

PCL-Kar (7:3, v:v) nanoliflerinin K-Karragenan içeriğinin FTIR analizi sonuçlarına göre doğrulanamaması nedeniyle SEM-EDS analizleri gerçekleştirildi. Bu amaçla; PCL, PCL-Kar (7:3, v:v), örneklerinin elemental içerikleri kıyaslandı (Şekil 4.7).

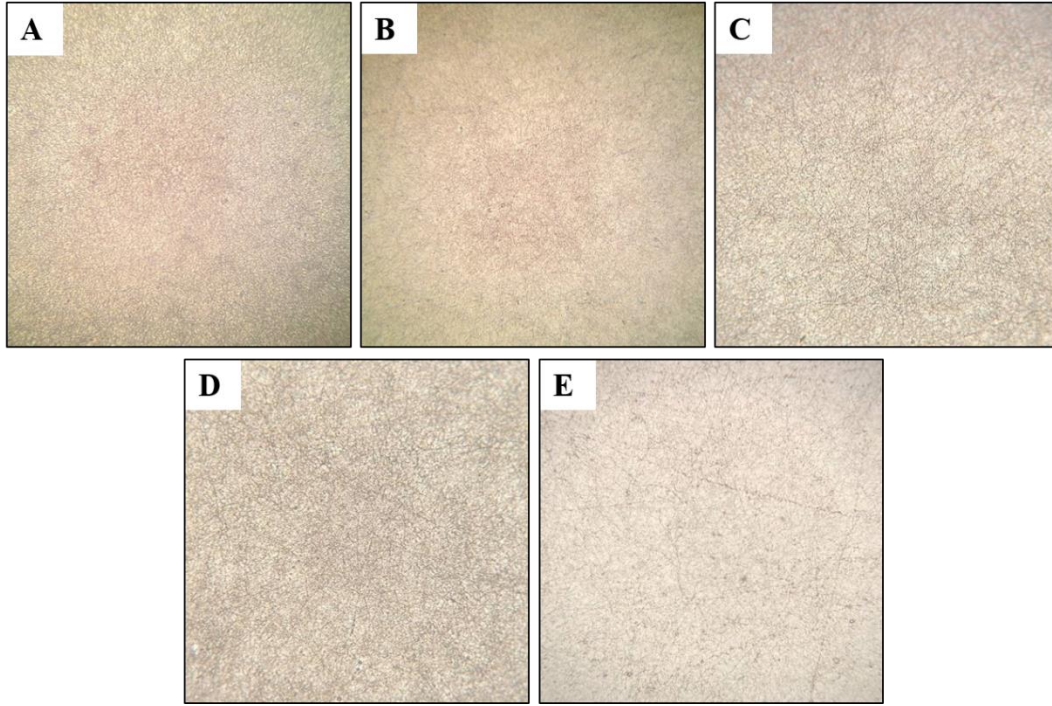


Şekil 4.7 PCL [A] ve PCL-Kar (7:3, v:v) [B] nanoliflerinin SEM-EDS sonuçları doğrultusunda elde edilen spektrumları

4.1.5. PCL–Kar–ÇOY nanoliflerin karakterizasyonu

4.1.5.1. Işık mikroskobu

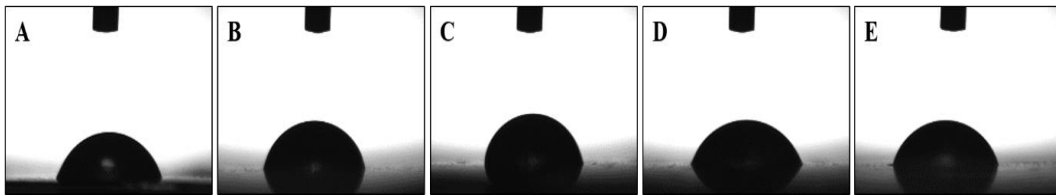
Farklı oranlarda çörek otu yağı içeren (2,5; 5; 10; 25; 50 mg/mL) PCL-Kar (7:3, v:v) nanoliflerinin karakterizasyonundaki ilk basamak ışık mikroskobu görüntülerinin alınmasıdır. Bu aşamada temel olarak lif üretilip üretilmediği ve genel olarak morfolojileri incelendi. Elde edilen görüntüler Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8 A) 2,5 mg/mL; B) 5 mg/mL; C) 10 mg/mL; D) 25 mg/mL ve E) 50 mg/mL çörek otu yağı içeren PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin ışık mikroskobu görüntüleri

4.1.5.2. Temas açısı

PCL-Kar-ÇOY (2,5; 5; 10; 25; 50 mg/mL) nanoliflerinin hidrofilik/hidrofobik karakterlerinin belirlenmesi amacıyla Attention Theta Gonimeter cihazıyla temas ölçümleri alındı. Elde edilen görüntüler Şekil 4.9; ilgili değerler ise Çizelge 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.9 A) 2,5 mg/mL; B) 5 mg/mL; C) 10 mg/mL; D) 25 mg/mL ve E) 50 mg/mL çörek otu yağı içeren PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin temas açısı görüntüleri

Çizelge 4.3 PCL-Kar-ÇOY (2,5; 5; 10; 25; 50 mg/mL) nanoliflerinin temas açısı ölçüm değerleri

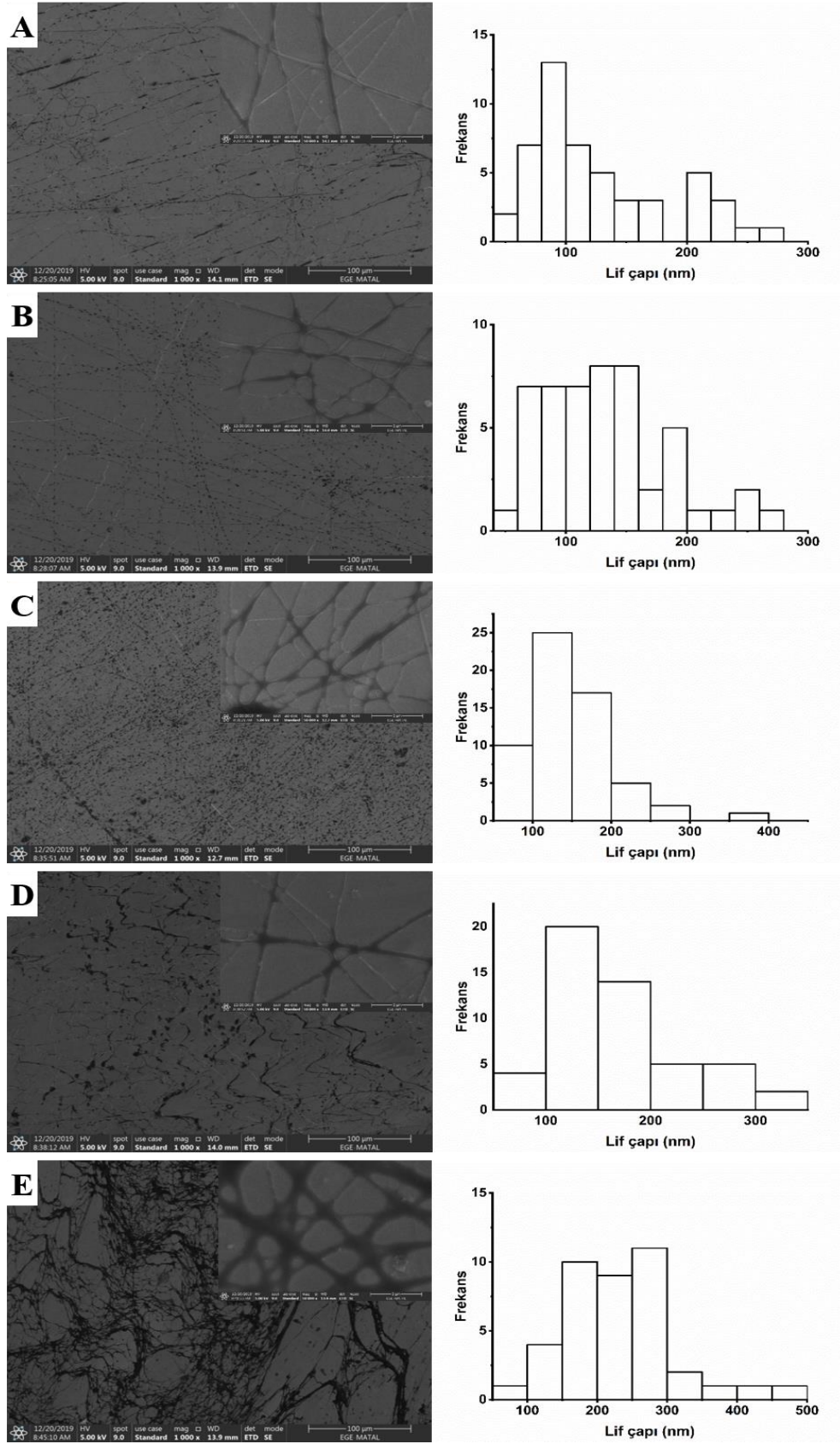
PCL-Kar-ÇOY	2,5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL
Temas Açısı (°)	71,54±7,90	79,37±2,07	82,23±5,27	83,93±3,19	72,80±1,58

4.1.5.3. SEM

Karakterizasyon basamağının son aşamasında PCL-Kar-ÇOY (2,5; 5; 10; 25; 50 mg/mL) nanoliflerinin morfolojileri detaylı olarak incelenerek; SEM mikrografları yardımıyla lif çapı dağılım grafikleri çizildi ve ortalama lif çapları hesaplandı. Elde edilen SEM mikrografları ve lif çapı dağılım histogramları Şekil 4.10 ve ortalama lif çapları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4 PCL-Kar-ÇOY (2,5; 5; 10; 25; 50 mg/mL) nanoliflerinin ortalama lif çapları

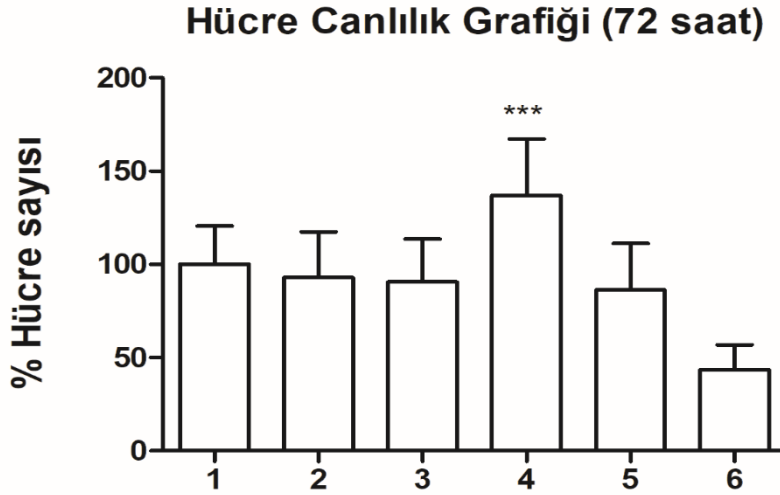
PCL-Kar-ÇOY	2,5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL
Ortalama Lif Çapı (nm)	90,83±3,17	117,82±7,83	136,16±1,99	144,52±7,21	222,91±10,58



Şekil 4.10 A) 2,5 mg/mL; B) 5 mg/mL; C) 10 mg/mL; D) 25 mg/mL ve E) 50 mg/mL çörek otu yağı içeren PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin SEM mikrografları

4.1.6. PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri

PCL-Kar (7:3, v:v) ve PCL-Kar-ÇOY (2,5; 5; 10; 25; 50 mg/mL) nanolifleri üzerinde 72 saat süreyle kültüre edilen HaCaT hücrelerinin canlılığı; hücre çekirdeklerinin DAPI ile işaretlenmesinin ardından floresan mikroskopla alınan görüntülerin işlenmesiyle belirlendi (Şekil 4.11). PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri üzerinde kültüre edilen hücrelerin canlılığı kontrol grubu olan PCL-Kar (7:3, v:v) nanolifleri üzerinde kültüre edilenlere kıyasla $136,96 \pm 30,27$ olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda 10 mg/mL çörek otu yağı içeren nanoliflerin hücre proliferasyonuna katkı yaptığı gösterilmiştir. Diğer yandan, artan yağ içeriğine bağlı olarak 25 mg/mL ve 50 mg/mL çörek otu yağı ile zenginleştirilen formülasyonların hücre canlılığına olumsuz yönde etki ettiği gözlenmiştir. İlerleyen süreçte yara kapama modeli oluşturulması ve floresan mikroskopla görüntüleme çalışmalarında ÇOY yağı içeren nanolif formülasyonlarından PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanoliflerinin kullanılmasına karar verildi.

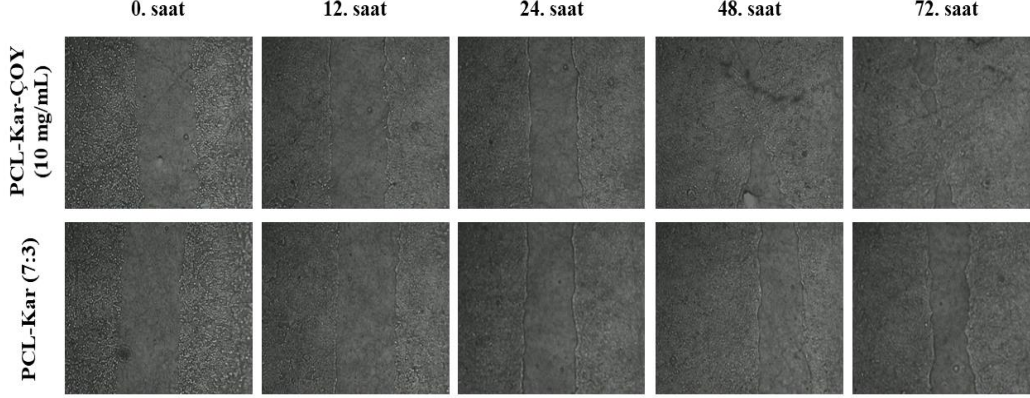


Şekil 4.11 1:PCL-Kar (7:3, v:v) ve PCL-Kar-ÇOY 2:2,5 mg/mL; 3:5mg/mL; 4:10 mg/mL; 5:25 mg/mL; 6:50 mg/mL nanolifleri üzerinde 72 saat süresince kültüre edilen HaCaT hücrelerinin canlılığı. (***) $P < 0,05$

4.1.7. PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin yara kapama etkinlikleri

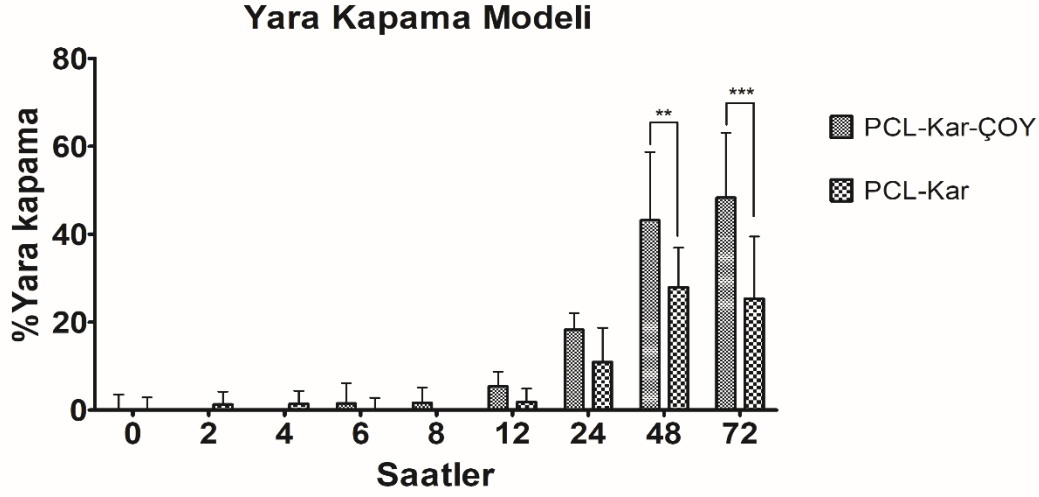
PCL-Kar (7:3, v:v) ve PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri üzerinde Culture-Insert kullanılarak 500 µm açıklığında oluşturulan yaraların kapanmaları 0-2-4-6-8-12-24-48 ve 72. saatlerde elde edilen görüntüler incelenerek yara kapama modeli oluşturuldu. Elde edilen

mikroskop fotoğraflarındaki (Şekil 4.12) yara açıklığı ImageJ programı ile ölçülerek Şekil 4.13’de verilen yara kapama modeli grafiği oluşturuldu. Elde edilen veriler doğrultusunda 24. saate kadar yapılan ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken 48. Saatten itibaren farklanmalar meydana geldiği görülmektedir.



Şekil 4.12 PCL-Kar (7:3, v:v) ve PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri üzerinde Culture-Insert kullanılarak oluşturulan yara açıklığının farklı zaman aralıklarında mikroskop görüntüleri

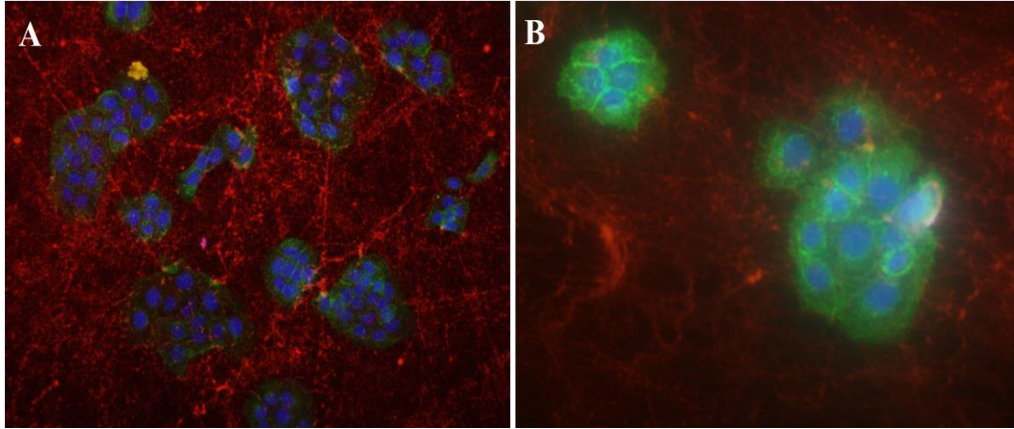
48. saat verileri göz önüne alındığında PCL-Kar (7:3, v:v) nanolifleri $27,95 \pm 8,97$ yara kapama etkinliği gösterirken, PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri üzerinde kültive edilen hücrelerde bu oran $43,16 \pm 15,56$ olarak hesaplanmıştır. 72. saat verilerinde ise PCL-Kar (7:3, v:v) nanolifleri üzerinde kültive edilen hücrelerin yara kapama etkinliği $25,41 \pm 14,07$ hesaplanırken, PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri için $48,33 \pm 14,72$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda; 10 mg/mL çörek otu yağı içeren nanoliflerin, oluşturulan yara modelinde PCL-Kar (7:3, v:v) nanoliflerine nazaran daha etkin olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.13 PCL-Kar (7:3, v:v) ve PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri üzerinde kültive edilen HaCaT hücrelerinin yara kapama etkinlikleri. (** P<0,01)(*** P<0,001)

4.1.8. Rhodamine B içeren PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin floresan mikroskop ile görüntülenmesi

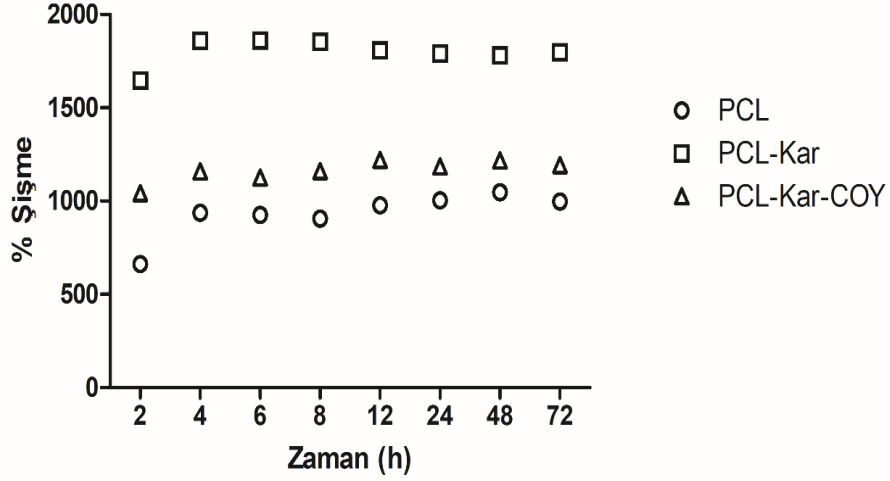
Proje kapsamında Rhodamine B içeren PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri üzerinde kültive edilen Alexa Fluor™ 488 Phalloidin ve DAPI boyaması gerçekleştirilen HaCaT hücrelerinin farklı büyütmelerdeki floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.14’de verilmiştir.



Şekil 4.14 Rhodamine B içeren PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri ve üzerinde 72 saat süreyle kültive edilen HaCaT hücrelerinin A) 20X; B) 40X floresan mikroskop görüntüleri. (Kırmızı: Rhodamine B; Yeşil: Alexa Fluor™ 488 Phalloidin; Mavi: DAPI).

4.1.9. PCL, PCL-Kar ve PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin şişme testleri

PCL, PCL-Kar (7:3, v:v) ve PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanoliflerinin şişme kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışma sonucunda elde veriler doğrultusunda Şekil 4.15’de verilen grafik elde edildi.



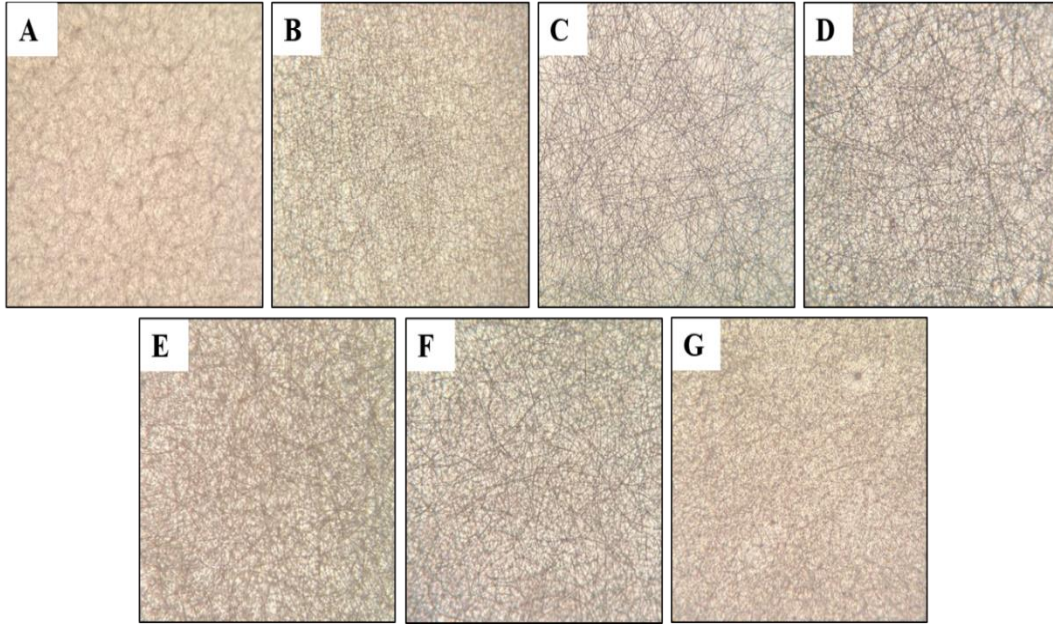
Şekil 4.15 PCL, PCL-Kar (7:3, v:v), PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri için elde edilen şişme testi sonuçları

4.2. PCL-CA-MA Nanoliflerinden Yara Örtüsü Geliştirilmesi

4.2.1. PCL-CA nanoliflerin karakterizasyonu

4.2.1.1. Işık mikroskobu

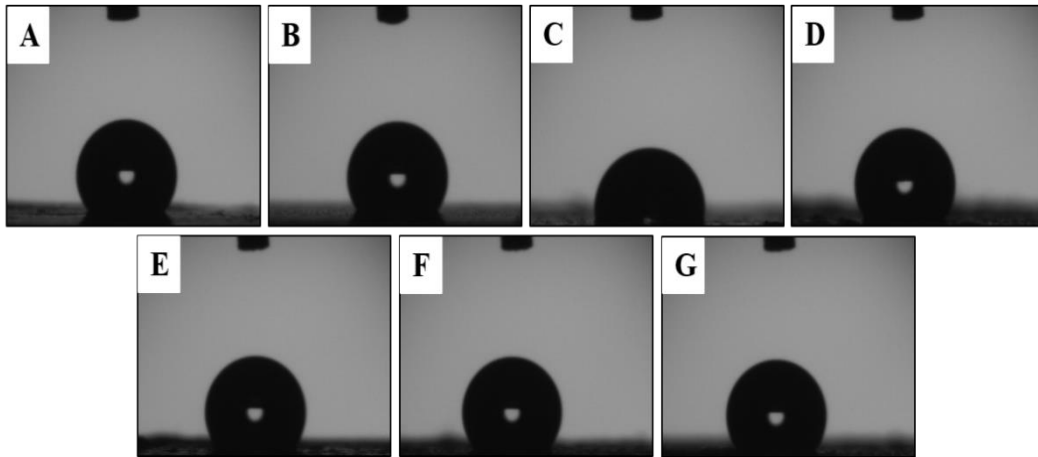
Elde edilen PCL, CA ve PCL-CA (9:1; 7:3; 5:5; 3:7; 1:9, v:v) nanoliflerinin karakterizasyonunda ilk basamak ışık mikroskobu görüntülerinin alınmasıdır. Bu aşamada temel olarak lif üretilip üretilmediği ve genel olarak morfolojileri incelendi. Elde edilen görüntüler Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.16 A) %10 PCL, B) PCL-CA (9:1, v:v), C) PCL-CA (7:3, v:v), D) PCL-CA (5:5, v:v), E) PCL-CA (3:7, v:v), F) PCL-CA (1:9, v:v) ve G) %15 CA nanoliflerinin ışık mikroskobu görüntüleri

4.2.1.2. Temas açısı

PCL, CA ve PCL-CA (9:1; 7:3; 5:5; 3:7; 1:9, v:v) nanoliflerinin hidrofilik/hidrofobik karakterlerinin belirlenmesi amacıyla Attention Theta Gonimeter cihazıyla temas ölçümleri alındı. Elde edilen görüntüler Şekil 4.17; ilgili değerler ise Çizelge 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.17 A) %10 PCL, B) PCL-CA (9:1, v:v), C) PCL-CA (7:3, v:v), D) PCL-CA (5:5, v:v), E) PCL-CA (3:7, v:v), F) PCL-CA (1:9, v:v) ve G) %15 CA nanoliflerinin temas açısı görüntüleri

Çizelge 4.5 PCL, CA ve PCL-CA (9:1; 7:3; 5:5; 3:7; 1:9, v:v) nanoliflerinin temas açısı ölçüm değerleri

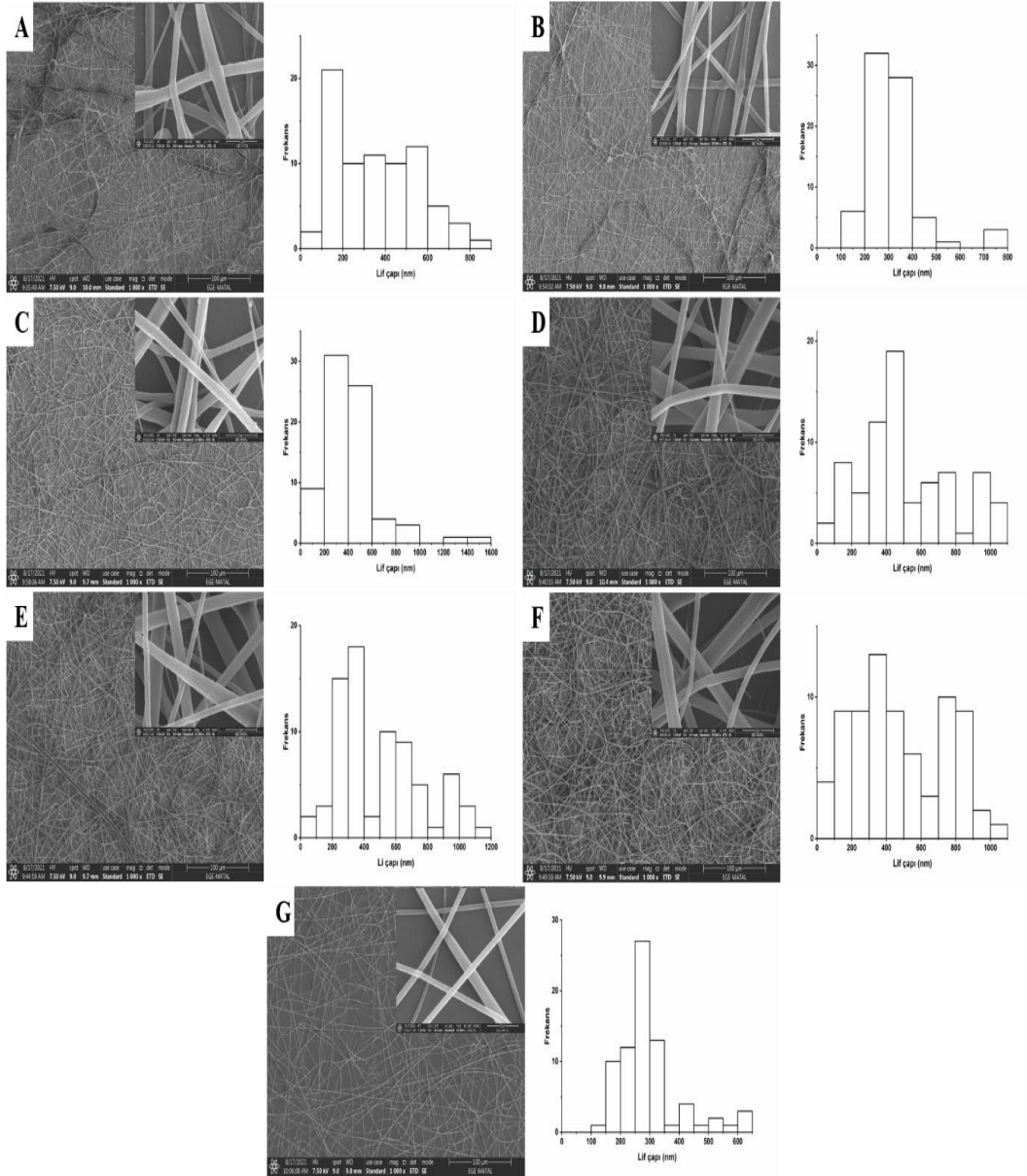
	PCL	PCL-CA (9:1, v:v)	PCL-CA (7:3, v:v)	PCL-CA (5:5, v:v)	PCL-CA (3:7, v:v)	PCL-CA (1:9, v:v)	CA
Temas	120,52	123,98	106,72	132,89	133,96	134,06	134,97
Açısı (°)	±8,20	±6,19	±3,35	±2,56	±0,83	±3,25	±2,60

4.2.1.3. SEM

Karakterizasyon basamağının son aşamasında PCL, CA ve PCL-CA (9:1; 7:3; 5:5; 3:7; 1:9, v:v) nanoliflerinin morfolojileri detaylı olarak incelenerek; SEM mikrografları yardımıyla lif çapı dağılım grafikleri çizildi ve ortalama lif çapları hesaplandı. Elde edilen SEM mikrografları ve lif çapı dağılım histogramları Şekil 4.18 ve ortalama lif çapları Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6 PCL, CA ve PCL-CA (9:1; 7:3; 5:5; 3:7; 1:9, v:v) nanoliflerinin ortalama lif çapları

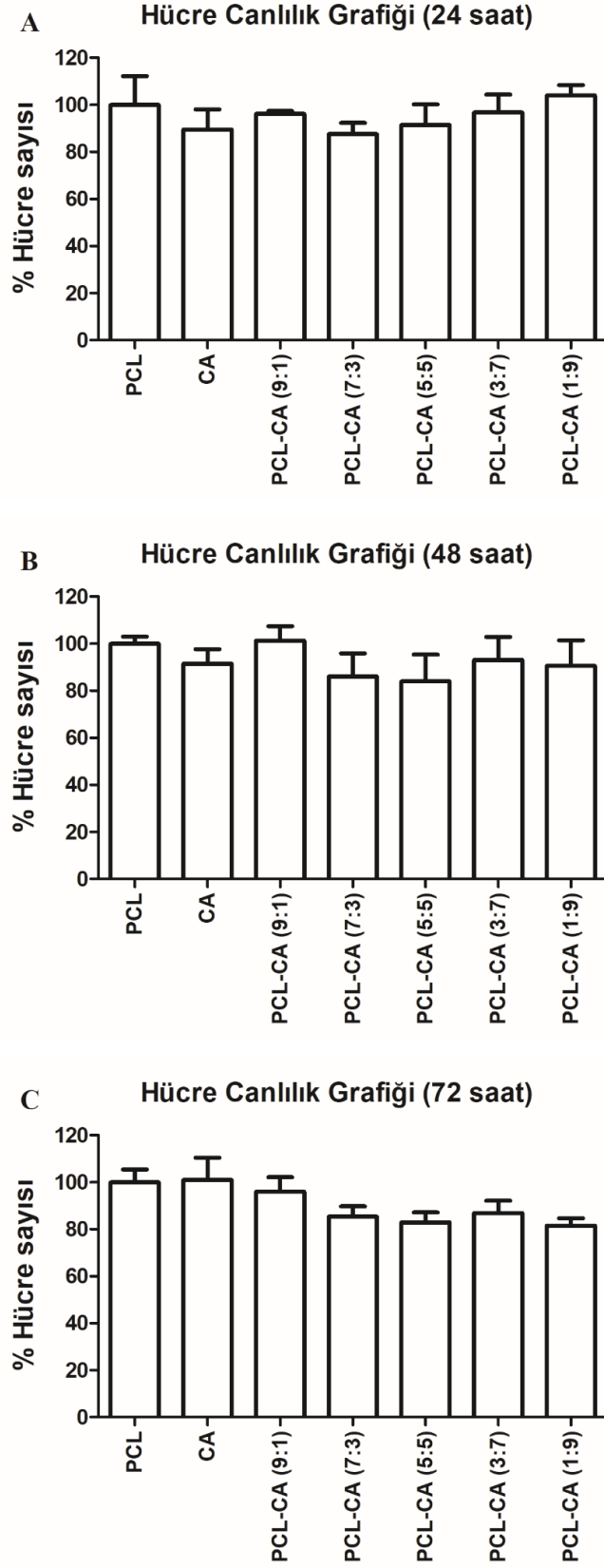
	PCL	PCL-CA (9:1, v:v)	PCL-CA (7:3, v:v)	PCL-CA (5:5, v:v)	PCL-CA (3:7, v:v)	PCL-CA (1:9, v:v)	CA
Ortalama	150,00	293,31	373,68	422,06	350,00	331,65	274,10
Lif Çapı (nm)	±46,04	±3,00	±6,75	±23,38	±32,67	±52,81	±5,92



Şekil 4.18 A) %10 PCL, B) PCL-CA (9:1, v:v), C) PCL-CA (7:3, v:v), D) PCL-CA (5:5, v:v), E) PCL-CA (3:7, v:v), F) PCL-CA (1:9, v:v) ve G) %15 CA nanoliflerinin SEM mikrografları ve lif çapı dağılım histogramları

4.2.2. PCL-CA Nanoliflerin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri

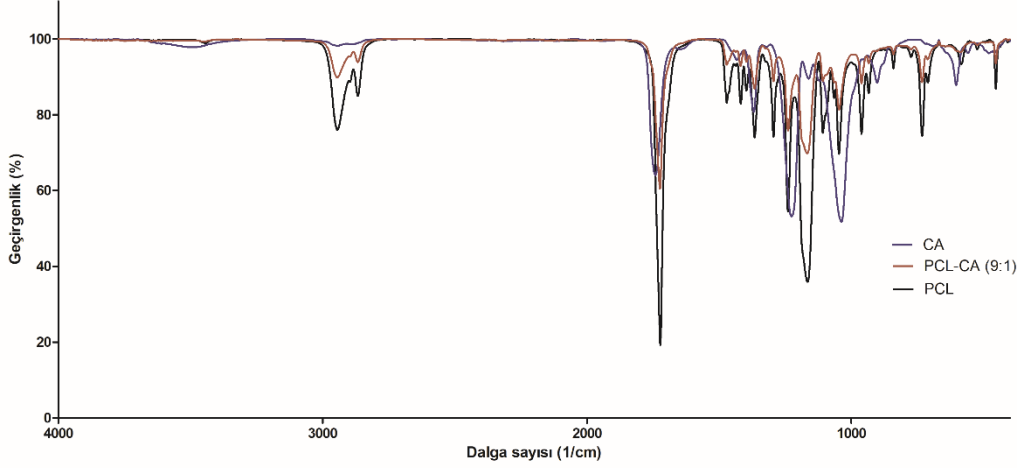
PCL-CA nanoliflerinin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelenmesi için 24, 48 ve 72 saatlik denemeler gerçekleştirildi. Şekil 4.19 A 24 saat, Şekil 4.19 B 48 saat ve Şekil 4.19 C'de 72 saat denemeleri sonucunda elde edilen grafikler verilmiştir. Elde edilen değerler doğrultusunda mandelik asit ile gerçekleştirilecek olan çalışmalarda PCL-CA (9:1; v:v) formülasyonu ile devam edilmesi kararlaştırıldı.



Şekil 4.19 PCL, CA ve PCL-CA (9:1; 7:3; 5:5; 3:7; 1:9, v:v) nanoliflerinin A) 24 saat, B) 48 saat ve C) 72 saat kültürasyon süreleri sonunda HaCaT hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri. (***) $P < 0,05$

4.2.3. PCL, CA ve PCL-CA nanoliflerinin FTIR analizleri

PCL-CA nanoliflerinin içeriğindeki CA'nın gösterilebilmesi amacıyla PCL, CA ve PCL-CA (9:1, v:v) örneklerinde gerçekleştirilen FTIR analizleri sonucunda elde edilen spektrumlar Şekil 4.20'de verilmiştir.

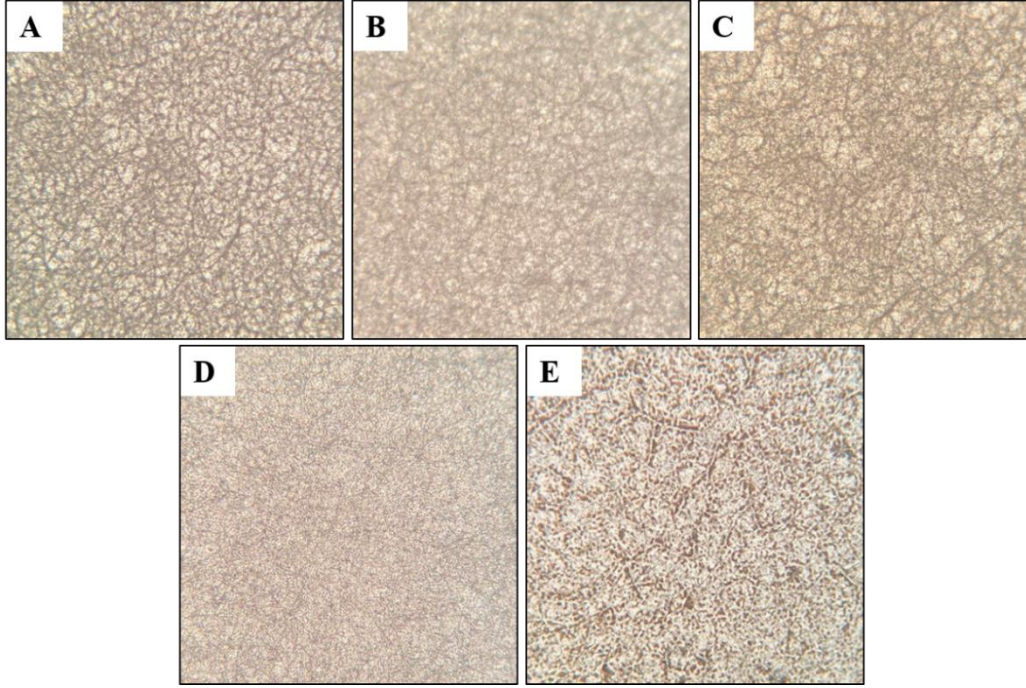


Şekil 4.20 PCL, CA ve PCL-CA (9:1, v:v) nanoliflerinin FTIR spektrumları

4.2.4. PCL-CA-MA nanoliflerinin karakterizasyonu

4.2.4.1. Işık mikroskobu

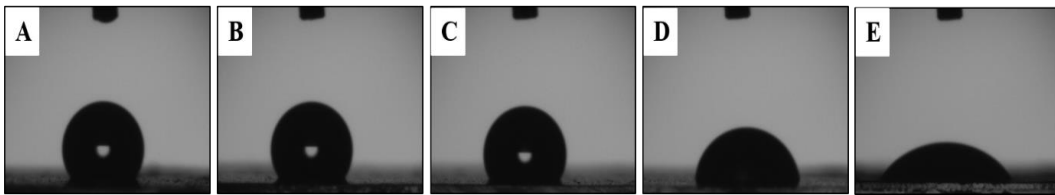
Farklı oranlarda mandelik asit (25; 50; 100; 250; 500 mM) PCL-CA (9:1, v:v) nanoliflerinin karakterizasyonundaki ilk basamak ışık mikroskobu görüntülerinin alınmasıdır. Bu aşamada temel olarak lif üretilip üretilmediği ve genel olarak morfolojileri incelendi. Elde edilen görüntüler Şekil 4.21'de verilmiştir.



Şekil 4.201 A) 25 mM; B) 50 mM; C) 100 mM; D) 250 mM ve E) 500 mM mandelik asit içeren PCL-CA-MA nanoliflerinin ışık mikroskobu görüntüleri

4.2.4.2. Temas açısı

PCL-CA-MA (25; 50; 100; 250; 500 mM) nanoliflerinin hidrofilik/hidrofobik karakterlerinin belirlenmesi amacıyla Attention Theta Gonimeter cihazıyla temas ölçümleri alındı. Elde edilen görüntüler Şekil 4.22; ilgili değerler ise Çizelge 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.212 A) 25 mM; B) 50 mM; C) 100 mM; D) 250 mM ve E) 500 mM mandelik asit içeren PCL-CA-MA nanoliflerinin temas açısı görüntüleri

Çizelge 4.7 PCL-CA-MA (25; 50; 100; 250; 500 mM) nanoliflerinin temas açısı ölçüm değerleri

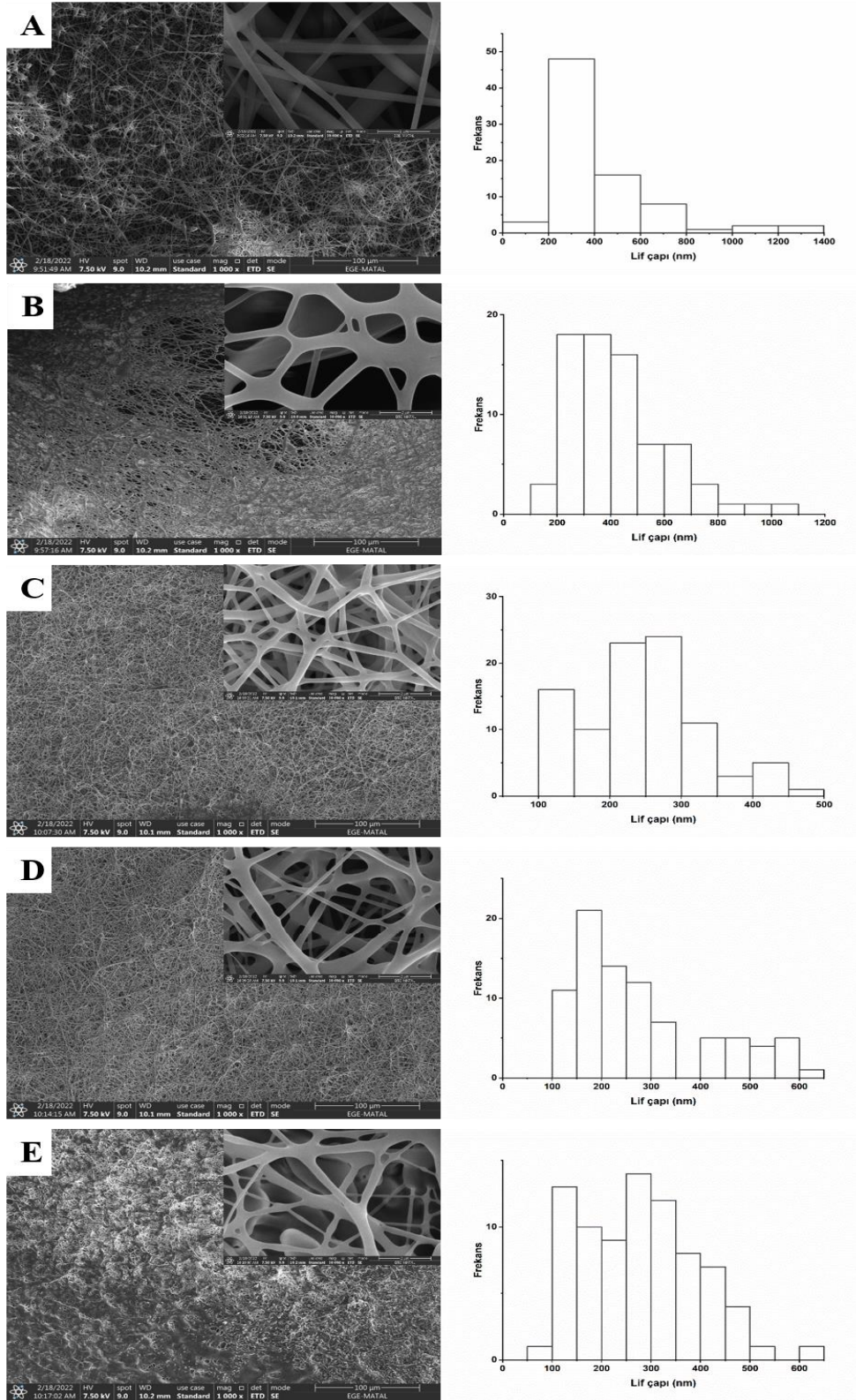
PCL-CA-MA	25 mM	50 mM	100 mM	250 mM	500 mM
Temas Açısı (°)	130,25±2,87	129,77±1,41	125,49±7,06	91,38±3,60	44,72±6,82

4.2.4.3. SEM

Karakterizasyon basamağının son aşamasında PCL-CA-MA (25; 50; 100; 250; 500 mM) nanoliflerinin morfolojileri detaylı olarak incelenerek; SEM mikrografları yardımıyla lif çapı dağılım grafikleri çizildi ve ortalama lif çapları hesaplandı. Elde edilen SEM mikrografları ve lif çapı dağılım histogramları Şekil 4.23 ve ortalama lif çapları Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8 PCL-CA-MA (25; 50; 100; 250; 500 mM) nanoliflerinin ortalama lif çapları

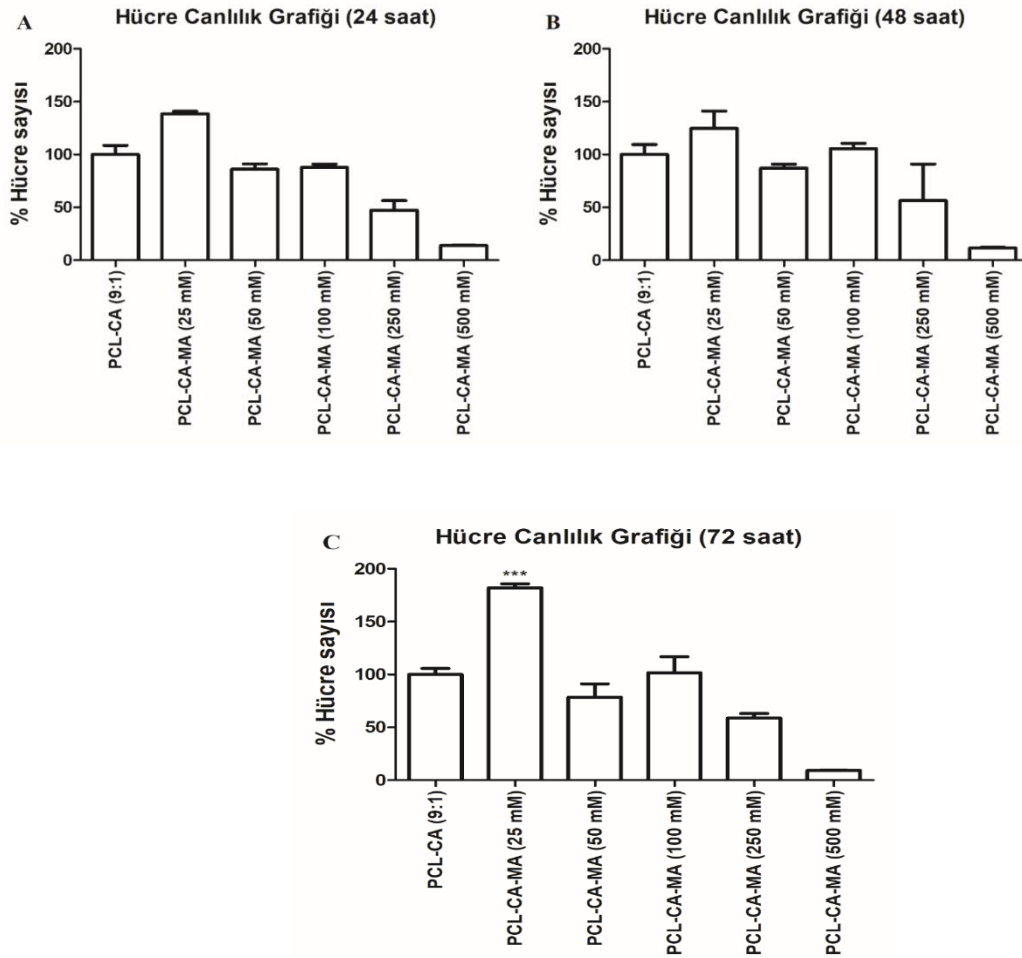
PCL-CA-MA	25 mM	50 mM	100 mM	250 mM	500 mM
Ortalama Lif Çapı (nm)	351,04±33,41	361,06±18,46	241,03±15,71	192,33±11,89	262,64±20,21



Şekil 4.223 PCL-CA-MA A) 25 mM; B) 50 mM; C) 100 mM; D) 250 mM; E) 500 mM nanoliflerinin SEM mikrografları ve lif çapı dağılım histogramları

4.2.5. PCL-CA-MA nanoliflerinin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri

PCL-CA-MA nanoliflerinin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelenmesi için 24, 48 ve 72 saatlik denemeler gerçekleştirildi. Şekil 4.24 A 24 saat, Şekil 4.24 B 48 saat ve Şekil 4.24 C'de 72 saat denemeleri sonucunda elde edilen grafikler verilmiştir. Elde edilen değerler doğrultusunda PCL-CA-MA (25 mM) formülasyonu ile yara kapama çalışmalarının gerçekleştirilmesine karar verildi.

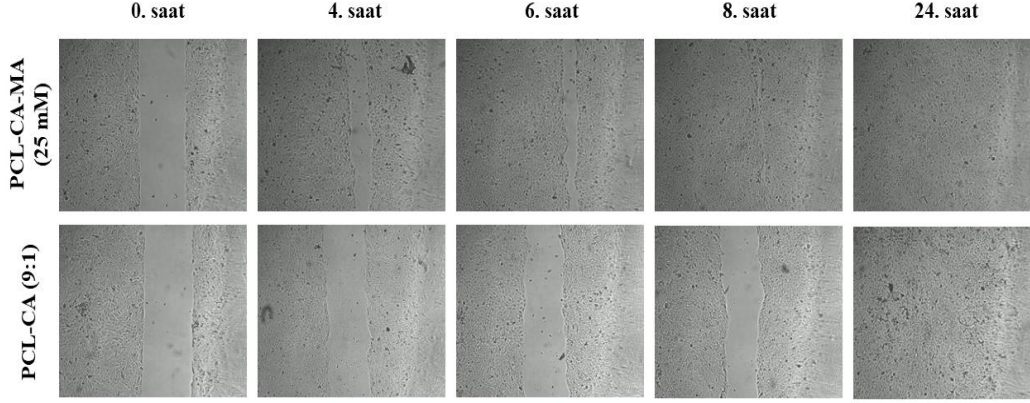


Şekil 4.234 PCL-CA (9:1, v:v) ve PCL-CA-MA (25; 50; 100; 250; 500 mM) nanoliflerinin A) 24 saat, B) 48 saat ve C) 72 saat kültürasyon süreleri sonunda HaCaT hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri. (***) $P < 0,0001$

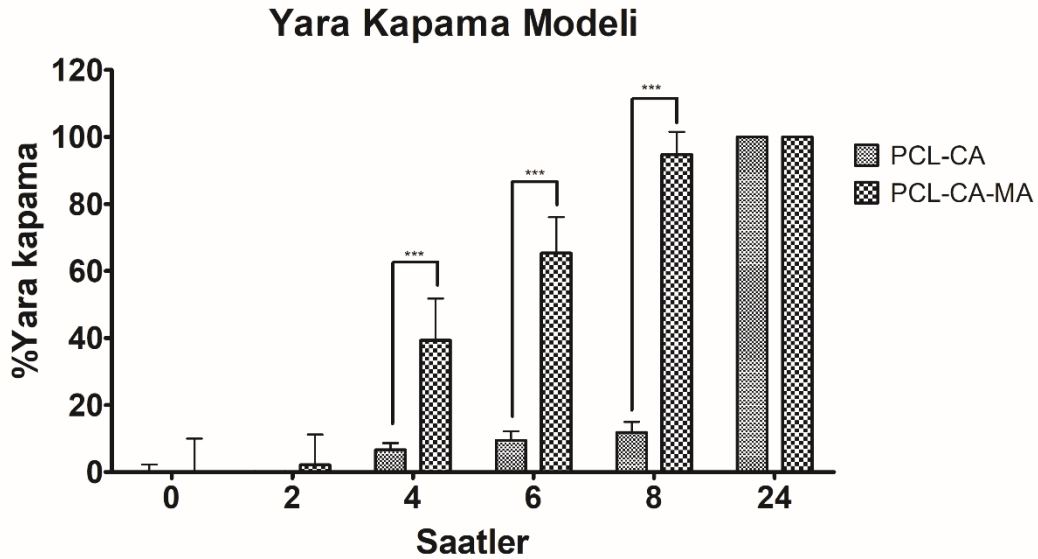
4.2.6. PCL-CA-MA nanoliflerinin yara kapama etkinlikleri

PCL-CA (9:1, v:v) ve PCL-CA-MA (25 mM) nanoliflerinin yara kapama etkinlikleri Culture-Insert kullanılarak; 500 μ m açıklığında oluşturulan yara açıklıklarının 0-2-4-6-8 ve 24. saatlerde elde edilen görüntülerinin incelenmesiyle değerlendirildi. Elde edilen mikroskop

fotoğraflarındaki (Şekil 4.25) yara açıklığı ImageJ programı ile ölçülerek Şekil 4.26’da verilen yara kapama modeli grafiği oluşturuldu. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde PCL-CA (9:1, v:v) ve PCL-CA-MA (25 mM) nanoliflerinin % yara kapama etkinlikleri sırasıyla 4. saatte $17,88 \pm 3,34$ ve $39,35 \pm 12,46$; 6. saatte $19,36 \pm 6,64$ ve $65,31 \pm 10,74$; 8. saatte $29,07 \pm 7,66$ ve $94,78 \pm 6,77$ olarak hesaplanmıştır.



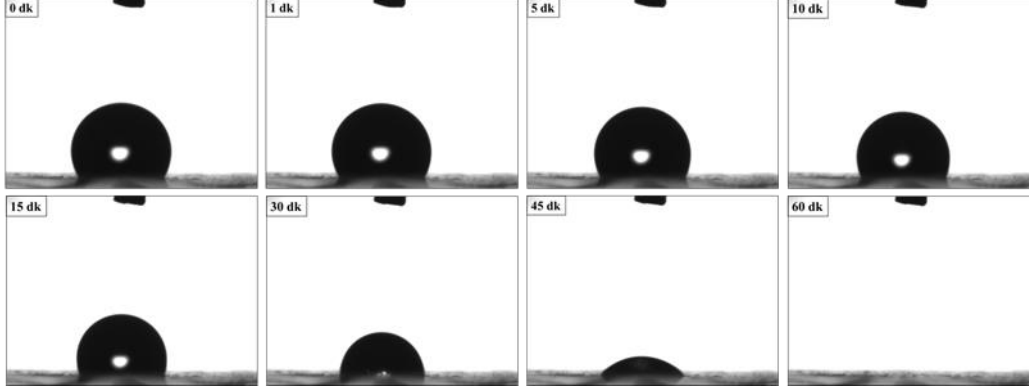
Şekil 4.245 Culture-Insert kullanılarak HaCaT hücreleri üzerinde oluşturulan yara açıklığının PCL-CA (9:1, v:v) ve PCL-CA-MA (25 mM) nanolifleri ile yara kapama etkinliklerinin farklı zaman aralıklarında mikroskop görüntüleri



Şekil 4.256 PCL-CA (9:1, v:v) ve PCL-CA-MA (25 mM) nanoliflerinin HaCaT hücreleri üzerinde yara kapama etkinlikleri (***) $P < 0,001$.

4.2.7. PCL-CA-MA nanoliflerinin zamana bağlı temas açısı değerlerinin incelenmesi

Attention Theta gonimeter cihazıyla gerçekleştirilen zamana bağımlı ölçüm sonucunda Şekil 4.27’de verilen görüntüler ve Çizelge 4.9’da verilen ölçüm değerleri elde edildi. Elde edilen sonuçlara göre zamana bağlı olarak temas açısı ölçüm değerlerinde azalma meydana geldiği bir saatin sonunda tamamen kaybolduğu gözlemlendi.



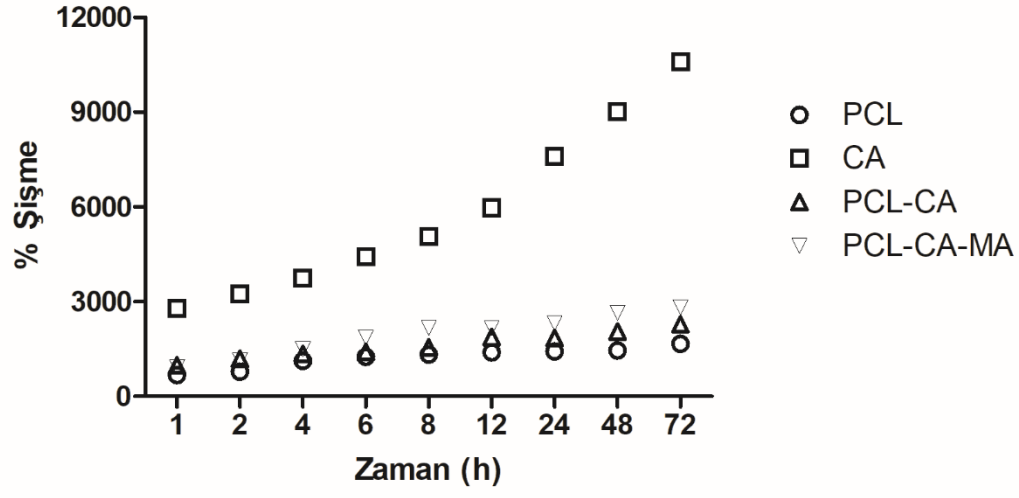
Şekil 4.267 PCL-CA-MA (25 mM) nanoliflerinin zamana bağlı olarak (0-1-5-10-15-30-45-60 dk) temas açılarında meydana gelen değişim

Çizelge 4.9 PCL-CA-MA (25 Mm) nanoliflerine ait 0-1-5-10-15-30-45 ve 60 dk sonunda elde edilen temas açısı ölçüm değerleri

Süre (dk)	0	1	5	10	15	30	45	60
Temas açısı (°)	125,23	123,99	120,80	116,29	111,34	88,5	43,42	0

4.2.8. PCL, CA, PCL-CA ve PCL-CA-MA nanoliflerinin şişme testleri

PCL, CA, PCL-CA (9:1, v:v) ve PCL-CA-MA (25 mM) nanoliflerinin şişme kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışma sonucunda elde veriler doğrultusunda Şekil 4.28’de verilen grafik elde edildi.



Şekil 4.278 PCL, CA, PCL-CA (9:1), PCL-CA-MA (25mM) nanolifleri için elde edilen şişme testi sonuçları.

5. TARTIŞMA

Polimer çözeltilerinden yola çıkarak elektroegirme teknolojisi ile nanoliflerin üretimi, işlem basamaklarının optimizasyonu, karakterizasyonu ve elde edilen platformların doku mühendisliği çalışmalarında kullanım potansiyellerinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilen “Doku Mühendisliğinde Kullanıma Uygun Nanoliflerin Elektroegirme ile Üretimi ve Karakterizasyonu” proje; PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinden doku iskelesi geliştirilmesi ve PCL-CA-MA nanoliflerinden yara örtüsü geliştirilmesi olmak üzere iki ayrı başlık altında gerçekleştirildi.

Canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek veya desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemeler olarak biyomalzemeler; sürekli veya belirli aralıklarla vücut akışkanları ile temas halindedir. Biyolojik sistemlerle ara yüzey oluşturarak ya da dokuların, organların ve vücut fonksiyonlarının yerine geçerek iyileşmesini, büyümesini ve onarılmasını sağlar. Biyomalzemeler doku mühendisliği çalışmalarında genellikle doku iskelesi (scaffold) olarak kullanılmaktadır. Doku iskeleleri yapısal destek sağlayarak hücrelerin tutunmasına ve çoğalmasına olanak verir. Ayrıca hücre tutunması ve göçü, hücre ve biyokimyasal moleküllerin iletimi ve gerekli besinlerin difüzyonuna olanak tanıyacak yapıda olmaları gerekir.

Projenin doku iskelesi geliştirilmesine yönelik ilk kısmında farklı karışım oranlarındaki PCL ile K-karragenan polimeri birlikte kullanılarak elektroegirme tekniği ile nanolif üretimi gerçekleştirildi. Karakterizasyon ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları sonucunda uygun görülen PCL-Kar oranı belirlenerek biyoaktif bileşen ile zenginleştirme basamağına geçildi. Bu amaçla; PCL-Kar nanolifleri farklı miktarlarda *Nigella sativa* tohum yağı ile birlikte hazırlanarak elde edilen nanoliflerin karakterizasyonu ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirildi. En etkin PCL-Kar-ÇOY oranının belirlenmesinin ardından *in vitro* yara modeli oluşturularak nanoliflerin yara kapama etkinlikleri incelendi.

Projenin her iki kısmında da; nontoksik, biyouyumlu, yüksek mekanik özelliklere sahip, biyobozunur (düşük bozunma hızı), düşük maliyetli ve FDA onaylı (Barhoum et al., 2019; Ghosal et al., 2017; Kee Woei Ng et al., 2001; Li et al., 2003; Ranjbar-mohammadi and Bahrami, 2015) olması gibi özellikleri nedeniyle PCL polimerinin kullanımı tercih edilmiştir. PCL polimer çözeltilerinin hazırlanmasında aseton, asetik asit, kloroform, DCM, DMF, formik

asit, HFIP, THF gibi birçok farklı çözügen veya çözügen sistemleri kullanılmaktadır (Abedalwafa et al., 2013). Nanoliflerin kullanılan çözügene göre yüzey özellikleri, biyouyumluluk, elektroğrılme gibi birçok özelliğinin etkilendiği bilinmektedir. Proje kapsamında PCL polimer çözeltilerinin hazırlanmasında FA/Ac (3:7) çözügen sistemi kullanılmıştır (Prasad et al., 2015).

Elektroğırme ile üretilen nanoliflerin yapısal özelliği, hücre bağlanmasına etki etmektedir. Bu nedenle, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılması amaçlanan herhangi bir iskelenin ECM yapısını iyi bir şekilde taklit etmesi gerekir. Bu bağlamda, sentetik polimerlerin fonksiyonel gruba sahip olmamaları ve birçoğunun yüksek hidrofobik karakteri dezavantaj teşkil etmektedir. Doğal polimerlerin kullanımında ise zayıf mekanik özellikler ve biyobozunurluklarının hızlı olması genel kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Hem sentetik hem de doğal polimerlerden elde edilen malzemelerin avantaj ve dezavantajları göz önüne alındığında, farklı polimer karışımlarının kullanımı yaygınlaşmaktadır. Sentetik polimerler, elde edilen liflerin kolay işlenebilirliğini ve iyi mekanik özelliklerini sağlarken, doğal polimerler, liflerin iyileşme sürecinde yer alan biyomoleküllerle aktif olarak etkileşime girme kapasitesini artırmaktadır (Abrigo et al., 2014; Gunn and Zhang, 2010). Bu amaçla projede kapsamında lineer sülfatlanmış doğal bir polisakkarit olan K-Karragenan kullanılması tercih edildi. Karragenanlar, biyouyumluluk, biyobozunurluk, yüksek jelleşme kapasitesi, düşük maliyet, protein ve enzimlerle kovalent bağlanabilmesi gibi özellikleri sayesinde birçok biyoteknolojik uygulamada büyük ilgi görmektedir (Elnashar and Yassin, 2009; L. Li et al., 2014; Nogueira et al., 2016; Nourmohammadi et al., 2017; Santo et al., 2009). Daha önce Popa ve ark. tarafından yaş eğirme yöntemi kullanılarak aljinat/karragenan nanolifleri hazırlanmıştır. İlgili yöntemde, nanoliflerin suda çözünmesini engellemek için kalsiyum klorür ile muamelesi ek bir işlem basamağı getirmektedir. Ayrıca gerçekleştirilen çalışmada nanoliflerin hidrofilik karakterizasyonları hakkında herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır (Popa et al., 2011). Tüm bu özellikleri ve taşıdığı yüksek potansiyel nedeniyle projenin doku iskelesi geliştirilmesine yönelik ilk kısmında PCL ile birlikte K-karragenan kullanılmıştır. K-karragenan polimerinin suda çözünürlüğü çok yüksek olmasına karşın organik çözücülerde çözünürlüğü sınırlıdır. Aseton içerisinde ise %55 oranında çözünürlük gösterdiği bilinmektedir (Ramakrishnan and Prud'Homme, 2000). Proje kapsamında Kar polimer çözeltilerinin hazırlanmasında FA/Ac (3:7, v:v) çözügen sistemi kullanıldı.

PCL-Kar nanoliflerinin morfolojilerinin ve nanolif çaplarının belirlenmesi amacıyla SEM görüntüleri alındı. Görüntüler ImageJ programı ile değerlendirilerek ortalama nanolif çapları ve nanolif çapı dağılım histogramları oluşturuldu. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda PCL, PCL-Kar (9:1, v:v), PCL-Kar (8:2, v:v), PCL-Kar (7:3, v:v) ve PCL-Kar (5:5, v:v) nanoliflerin ortalama lif çapları sırasıyla $233,85 \pm 8,22$ nm; $127,37 \pm 3,49$; $130,65 \pm 2,99$; $148,43 \pm 18,97$ ve $79,27 \pm 2,03$ olarak hesaplandı. Nanoliflerin içeriğindeki Kar oranı arttıkça ortalama çaplarda incelmeye olduğu gözlemlendi. Bunun temel nedeni Kar yapısındaki iyonlaşabilen grupların polimer çözeltilerinin iletkenliğini artırması ve sonuç olarakta daha ince nanoliflerin elde edilmesi olarak açıklanabilir (Aras et al., 2019; Ramakrishna et al., 2005). PCL-Kar nanoliflerinin temas açısı ölçüm sonuçlarında ise K-karragenanın hidrofilik karakterinden dolayı beklendiği üzere nanolif içeriğindeki oranı arttıkça temas açısı değerlerinde hidrofobik özellikten hidrofilik özelliğe doğru kayma gözlemlendi.

PCL-Kar nanoliflerinin *in vitro* hücre kültürü denemeleri için HaCaT hücre hattı, model olarak kullanıldı. PCL-Kar nanolifleri üzerinde 48 ve 72 saat süreyle kültüre edilen HaCaT hücrelerinin canlılığı; hücre çekirdeklerinin DAPI ile işaretlenmesinin ardından floresans mikroskopla alınan görüntülerin işlenmesiyle belirlendi. 48 saat süren canlılık denemesinin sonuçları incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken; 72 saat süren denemenin sonuçlarına göre; PCL-Kar (7:3, v:v) nanolifleri üzerinde kültüre edilen hücrelerin canlılığı kontrol grubu olan PCL nanolifleri üzerinde kültüre edilenlere kıyasla $154,72 \pm 18,32$ olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda nanoliflerin zenginleştirilmesi amacıyla farklı miktarlarda *Nigella sativa* yağı içeren PCL-Kar (7:3, v:v) nanoliflerinin kullanılmasına karar verildi.

PCL-Kar nanoliflerinin K-Karragenan içeriğinin kanıtlanması amacıyla PCL, Kar ve PCL-Kar (7:3, v:v) örnekleri için FTIR analizleri; PCL ve PCL-Kar (7:3, v:v) örnekleri için ise SEM-EDS analizleri gerçekleştirildi. FTIR analizlerinde PCL-Kar (7:3, v:v) nanolifi için elde edilen spektrumda K-karragenan parmak izi bölgesinde karakteristik piklere içerikteki başlangıç karragenan miktarının (%0,5) az olması nedeniyle rastlanamadı. Bu nedenle örneklerde SEM-EDS analizleri gerçekleştirilmesine karar verildi. SEM-EDS analizleri sonucunda elde edilen sonuçlar incelendiğinde ise PCL nanoliflerinde kükürt elementine ait pik gözlenmezken; PCL-Kar (7:3, v:v) nanoliflerinde %3,38 (ağırlık olarak) - %1,51 (atomik olarak) K-karragenanın yapısında yer alan kükürt varlığı kanıtlandı.

Nanolifler yara iyileşme proseslerinde klasik preparatlardan farklı olarak; hasarlı dokunun üzerini örtmenin yanı sıra yüksek gözenekli yapısı sayesinde daha etkin oksijen transferine olanak tanınmasıyla birlikte biyoaktif moleküllerin salımına da imkan vermektedir (Sundaramurthi et al., 2014). Projenin doku iskelesi geliştirilmesine yönelik ilk kısmında PCL-Kar nanoliflerin biyoaktif bileşenle zenginleştirilmesinde; analjezik, anti-inflamatuvar, antioksidan ve yara iyileştirici gibi özellikleri nedeniyle *Nigella sativa* tohumu yağı kullanıldı (Apaydin and Gedikli, 2019; Guler et al., 2014; Kalhori et al., 2019; Ng et al., 2011).

Son konsantrasyonu 2,5; 5; 10; 25 ve 50 mg/mL olacak şekilde çörek otu yağı (ÇOY) içeren PCL-Kar-ÇOY elektroegirme çözeltilerinden yola çıkılarak PCL-Kar-ÇOY nanolifleri elektroegirme tekniği ile üretildi. Karakterizasyon amacıyla gerçekleştirilen temas açısı sonuçları değerlendirildiğinde; PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin içeriğindeki çörek otu yağı miktarının artmasına bağlı olarak ortalama lif çaplarının arttığı gözlemlendi. PCL-Kar (7:3, v:v) lif çaplarına ($148,43 \pm 18,97$) kıyasla çörek otu yağı içeren nanoliflerin ortalama lif çapları daha düşük (50 mg/mL hariç) bulundu. Elde edilen bulgu çörek otu yağının asidik bir yapıya sahip olmasıyla açıklanabilir. Şöyle ki; Ramakrishna ve ark. tarafından yapılan çalışmaya göre, egirme çözeltilisine asidik bir bileşen eklenmesi, iyon sayısındaki artış nedeniyle çözeltinin iletkenliğinde artışa neden olur. Bunun sonucunda da nanoliflerin çapının etkilenebildiği ve daha iletken çözeltilerden daha ince nanolifler üretilbildiği görülmektedir (Aras et al., 2019; Ramakrishna et al., 2005).

PCL-Kar-ÇOY nanoliflerinin *in vitro* hücre kültürü denemeleri için HaCaT hücre hattı, model olarak kullanıldı. 72 saat süren çalışmanın sonucunda elde edilen sonuçlar doğrultusunda; PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri üzerinde kültive edilen hücrelerin canlılığı kontrol grubu olan PCL-Kar (7:3, v:v) nanolifleri üzerinde kültive edilenlere kıyasla $136,96 \pm 30,27$ olarak belirlendi. Artan ÇOY içeriğine bağlı olarak da 25 mg/mL ve 50 mg/mL ÇOY içeren nanoliflerin hücre canlılığına olumsuz yönde etki ettiği (sırasıyla %86 ve %43) gözlemlendi. İlerleyen süreçte yara kapama modeli oluşturulması ve floresan mikroskopla görüntüleme çalışmalarında *Nigella sativa* yağı içeren nanolif formülasyonlarından PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanoliflerinin kullanılmasına karar verildi.

PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanoliflerinin yara kapama etkinlikleri incelenirken; standart bir yara açıklığı oluşturması ve çizik atma yöntemine kıyasla mekanik bir hasar oluşturulmasına

gerek kalmaması nedeniyle 2 kuyucuklu Culture-Insert (ibidi) tercih edildi. İlk 24 saat içerisinde PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri ile kontrol grubu olan PCL-Kar (7:3, v:v) nanolifleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. 48. saat için ise PCL-Kar (7:3, v:v) ve PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri sırasıyla $27,95 \pm 8,97$ ve $43,16 \pm 15,56$ yara kapama etkinliği gösterirken; 72. Saat bu değerler $25,41 \pm 14,07$ ve $48,33 \pm 14,72$ olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *N. sativa* tohum yağının taşıdığı proliferasyon ve yara kapama etkinliklerini (Apaydin and Gedikli, 2019; Guler et al., 2014). PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanoliflerinin de taşıdığı gösterilerek zenginleştirme işleminin başarılı olduğu sonucuna ulaşıldı.

Son olarak Rhodamine B içeren PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri üzerinde 72 saat süreyle HaCaT hücreleri kültive edildikten sonra Alexa Fluor™ 488 Phalloidin ve DAPI ile boyanarak floresan mikroskop görüntüler alındı ve ImageJ programı yardımıyla karşılaştırıldı. Elde edilen görüntüler, geliştirilen nanoliflerin bozunmadan kaldığını ve yüzeylerinde hücrelerin tutunmasına olanak tanıdığını gösterdi. Ayrıca, *in vitro* hücre kültürü denemelerinde elde edilen sonuçların da hücreler ve nanolifler arasındaki etkileşimden kaynaklandığının kanıtlanmasına olanak tanıdı. PCL, PCL-Kar (7:3, v:v) ve PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanolifleri üzerinde gravimetrik yöntemle şişme testleri gerçekleştirildi. Fizyolojik koşullar ve *in vitro* hücre kültürü çalışmalarının parametrelerine de uyum göstermesi açısından çalışma parametreleri şişme testi pH=7,4'te 37 °C 'de gerçekleştirildi. Hidrofilik karakterli K-karragenan içeriğinin yüksek olmasından dolayı PCL-Kar (7:3, v:v) nanolifleri en yüksek şişme kapasitene sahipken; hidrofobik karakterli ÇOY içeriği nedeniyle PCL-Kar-ÇOY (10 mg/mL) nanoliflerinin şişme kapasitesi daha düşük hesaplandı. Hidrofobik bir polimer olan PCL kullanılarak elde edilen PCL nanoliflerinin ise diğerlerine kıyasla en düşük şişme kapasitesine sahip olduğu belirlendi. Johnson ve ark tarafından kitosan-Kar hidrojellerinin kullanıldığı çalışmada şişme kapasitelerinin 6. saate kadar hızla arttığı (%4000 dolaylarında) daha sonradan neredeyse sıfırlandığı rapor edilmiştir (12. Saatte). Bunun nedeni ise yüksek derecede şişmiş hidrojellerde bağ kopmasının, kırılğan yapılarından kaynaklanması olarak açıklanmıştır. (Johnson et al., 2020). Bu bağlamda elde edilen nanoliflerin yapılarında herhangi bir bozulma olmaması geliştirilen platformların bir avantajı olarak ön plana çıkmaktadır.

Yara örtüsü geliştirilmesine yönelik gerçekleştirilen projenin ikinci kısmında PCL ile CA polimeri birlikte kullanılarak nanolif üretimi gerçekleştirildi. Farklı karışım oranlarında PCL-

CA çözeltilerinden elektroğirme tekniği ile nanolif üretimi gerçekleştirildi. Karakterizasyon ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları sonucunda uygun görülen PCL-CA oranı belirlenerek biyoaktif bileşen ile zenginleştirme basamağına geçildi. Bu amaçla; PCL-CA nanolifleri farklı miktarlarda mandelik asit ile birlikte hazırlanarak elde edilen nanoliflerin karakterizasyon ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirildi. En etkin PCL-CA-MA oranının belirlenmesinin ardından *in vitro* yara modeli oluşturularak nanoliflerin yara kapama etkinlikleri incelendi.

Elektroğirme tekniği ile CA nanoliflerinin elde edilmesinde DMF (Ju and Oh, 2017), aseton:dimetilasetamid (Matos et al., 2018) asetik asit:su (Boriboon et al., 2018; Han et al., 2005), diklorometan:metanol (Ramphul et al., 2017), aseton:su (Son et al., 2004), aseton:DMF:trifloroetilen (Ma et al., 2005), DMF:dioksan (Zhang and Hsieh, 2008) ve aseton:dimetilasetamid (Liu and Tang, 2007) gibi bir çok çözügen ve çözügen sistemi kullanılabilir. Gerçekleştirilen çalışmalarda CA polimer çözeltileri hazırlanırken Ac:DMF (9:1, v:v) çözügen sistemi tercih edildi. Ac; elektroğirme için tercih edilen düşük yüzey gerilimi ve CA polimerinin çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle (Liu and Hsieh, 2002), DMF ise aynı nedenlerin yanı sıra çözünürlük parametrelerinin CA ile çok yakın olması ve elektroğirme ile CA nanoliflerinin üretiminde düşük hacimde DMF bulunduğu durumlarda nanolif oluşumunu olumlu yönde etkilemesi nedeniyle tercih edilmiştir (Attari and Hausler, 2020; Lee et al., 2018).

PCL-CA nanoliflerinin morfolojilerinin ve nanolif çaplarının belirlenmesi amacıyla SEM görüntüleri alındı. Görüntüler ImageJ programı ile değerlendirilerek ortalama nanolif çapları ve nanolif çapı dağılım histogramları oluşturuldu. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda PCL, PCL-CA (9:1; v:v), PCL-CA (7:3, v:v), PCL-CA (5:5, v:v), PCL-CA (3:7, v:v), PCL-CA (1:9, v:v) ve CA nanoliflerinin ortalama lif çapları sırasıyla $150,00 \pm 46,04$; $293,31 \pm 3,00$; $373,68 \pm 6,75$; $422,06 \pm 23,38$; $350,99 \pm 32,67$; $331,65 \pm 52,81$; $350,99 \pm 32,67$ ve $274,10 \pm 5,92$ nm olarak hesaplandı. Farklı oranlarda hazırlanan PCL-CA nanoliflerinin temas açısı değerleri incelendiğinde de örnekler arasında bariz farklanmanın olmadığı gözlemlendi.

PCL, CA ve farklı oranlarda PCL-CA çözeltilerinden elektroğirme yöntemiyle üretilen nanoliflerin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri MTT testi ile belirlendi. 24, 48 ve 72 saat süreyle gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda kontrol grubu olarak kullanılan PCL nanoliflerinin uygulandığı hücrelere kıyasla diğer nanolif örneklerinde anlamlı bir fark

gözlenmedi. Bu nedenle SEM mikrografları ve ortalama lif çaplarına bakıldığında; farklı oranlarda hazırlanan PCL-CA nanolifleri içerisinde diğer örneklerle nazaran, nispeten daha düşük ortalama lif çapına ($293,31 \pm 3,00$) ve tek düze-boncuksuz bir yapıya sahip olan PCL-CA (9:1, v:v) nanolifleri ile projeye devam edilmesine karar verildi.

PCL-CA nanoliflerinin CA içeriğinin kanıtlanması amacıyla PCL, CA ve PCL-CA (9:1, v:v) örnekleri için FTIR analizleri gerçekleştirildi. Tüm örnekler için $1740-1745 \text{ cm}^{-1}$ (C=O); 1370 cm^{-1} (C-CH_3); 2940 cm^{-1} ve 2860 cm^{-1} sırasıyla asimetrik ve simetrik CH_2 ; 1240 cm^{-1} (C-O-C) gerilmelerinden kaynaklı olan pikler gözlemlendi (Alemán-Domínguez et al., 2019; Gaminian and Montazer, 2017; Yezer and Demirkol, 2020). Nanoliflerin FTIR spektrumları arasındaki temel farklılık CA'nın yapısından kaynaklı olarak 3480 cm^{-1} dalga sayısı etrafından görünen karaktersistik -OH gerilmesinden kaynaklanmaktadır (Gaminian and Montazer, 2017; Yezer and Demirkol, 2020). CA nanoliflerin bu pik belirgin bir şekilde gözlenirken PCL-CA (9:1, v:v) nanoliflerinde belirgin değildir.

Pasif, interaktif, gelişmiş ve biyoaktif olarak dört ana sınıfta değerlendirilen yara örtülerinden; iyileşme sürecini hızlandırması, enfeksiyonu önlemesi, deri yapısını ve işlevini eski haline getirmesi beklenmektedir. Bunların içerisinde yara iyileşme sürecinde aktif rol oynayan biyoaktif bileşenlerle zenginleştirilmiş yara örtüleri ön plana çıkmaktadır. Projenin bu kısmında antibakteriyel, antiinflamatuvar ve hücre proliferasyonuna katkıda bulunması gibi taşıdığı özellikler nedeniyle PCL-CA (9:1, v:v) nanoliflerinin zenginleştirilmesi amacıyla MA kullanıldı.

Biyaktif yara örtülerinin geliştirilmesi amacıyla 25, 50, 100, 250 ve 500 mM MA içeren PCL-CA-MA elektroegirme çözeltileri kullanılarak nanolif üretimi gerçekleştirildi. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda PCL-CA-MA nanoliflerinin temas açılarında nanolif içeriğindeki hidrofilik karakterli MA konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak beklenildiği üzere düşüş gözlemlendi. Benzer şekilde PCL-CA-MA nanoliflerinin ortalama lif çaplarında da MA konsantrasyonuna bağlı olarak düşüş gözlemlendi. Daha önce de bahsedildiği üzere, bu düşüşün nedeni elektroegirme çözeltisinin asidik içeriğinin artmasına bağlı olarak çözeltinin iyon şiddetinin artması ve sonuç olarak da iletkenlikte meydana gelecek artış nedeniyle görece olarak daha ince nanoliflerin üretilebilmesidir (Aras et al., 2019; Ramakrishna et al., 2005).

PCL-CA-MA nanoliflerinin HaCaT hücre canlılığı üzerine etkileri MTT yöntemi ile belirlendi. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda 24 ve 48 saat sonunda kontrol grubu olan PCL-CA (9:1, v:v) nanoliflerine kıyasla herhangi bir MA konsantrasyonuna bağlı olarak HaCaT hücre canlılığında bir artış gözlenmedi. Fakat 72 saat sonuçları incelendiğinde PCL-CA-MA (25 mM) nanoliflerinin uygulandığı hücrelerin canlılığı $182,01 \pm 3,68$ olarak belirlenerek kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendi. Ayrıca nanoliflerdeki artan mandelik asit konsantrasyonuna bağlı olarak da 24, 48 ve 72 saat sonunda (250 mM, 500 mM;) HaCaT hücrelerinin canlılığı üzerine olumsuz etki gösterdiği belirlendi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda nanoliflerin yara kapama etkinliklerinin incelenmesinde PCL-CA-MA (25 mM) nanoliflerinin kullanılmasına karar verildi.

PCL-CA-MA (25mM) nanoliflerinin yara kapama etkinlikleri projenin ilk kısmında da olduğu gibi 2 kuyucuklu Culture-Insert (ibidi) kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak PCL-CA (9:1, v:v) nanoliflerinin kullanıldığı çalışma 24 saat sonunda her iki örnek için oluşturulan yara açıklığının kapanması nedeniyle 24. saatte sonlandırıldı. PCL-CA-MA (25 mM) nanoliflerinin kontrol grubuna kıyasla 4. saatten itibaren daha hızlı kapanma dinamiği sergilediği gözlemlendi. Ayrıca oluşturulan yara modelinde ilk temasın da 8. saatte gerçekleştiği belirlendi.

Temas açısı değeri PCL-CA (9:1, v:v) nanolifleri (başlık 4.2.1.2) için $123,98 \pm 6,19^\circ$ olarak ölçülürken; PCL-CA-MA (25mM) nanolifleri (başlık 4.2.3.2) için $130,25 \pm 2,87^\circ$ değeri elde edildi. İçeriğindeki mandelik asitten kaynaklı olarak PCL-CA-MA (25 mM) nanoliflerinin hidrofilik karakterinde ve dolayısıyla da temas açıları değerlerinde düşüş beklenmekteydi fakat sonuçlar incelendiğinde tam tersi bir durum söz konusudur. Nanoliflerin hidrofilik /hidrofobik özelliklerini netleştirebilmek için zamana bağlı ölçümler alındı. Elde edilen ölçüm sonuçlarına göre nanoliflerin temas açısında zamanla azalma gözlemlendi. Son olarak PCL, CA, PCL-CA (9:1, v:v) ve PCL-CA-MA (25mM) nanoliflerinin şişme testleri gravimetrik metotla gerçekleştirildi. 72 saat süren çalışma sonuçları incelendiğinde; PCL nanolifleri diğerlerine nazaran hidrofobik karakterinden dolayı en düşük şişme kapasitesine (% sahipken, PCL-CA (9:1, v:v) nanoliflerinde içerikteki CA'dan kaynaklı olarak PCL nanoliflerinden, PCL-CA-MA (25mM) nanolifleri de içeriğindeki hidrofilik karakterli mandelik asitten kaynaklı olarak PCL-CA (9:1, v:v) nanoliflerinden daha yüksek şişme yeteneği gösterdi. CA nanolifleri ise diğer nanoliflere kıyasla oldukça yüksek şişme değerleri gösterdi. CA nanolifleri için literatürle uyumlu bir şekilde,

suyun liflere nüfuz etmesine olanak tanıdığı ve sudaki düşük çözünürlüğü nedeniyle dayanıklı ve ideal bir materyal olduğu sonucuna varıldı (Nootem et al., 2018; Phiriyawirut and Phaechamud, 2012; Taepaiboon et al., 2007).

Sonuç olarak yara iyileşme proseslerinde etkin rol oynayacak aktif yara örtüleri geliştirilmesi amacıyla yola çıkılan projenin ikinci kısmı da, PCL-CA-MA (25 mM) nanoliflerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda başarılı bir şekilde sonlandırıldı.

6. SONUÇ

“Doku Mühendisliğinde Kullanıma Uygun Nanoliflerin Elektroeğirme İle Üretimi Ve Karakterizasyonu” başlıklı proje çalışması kapsamında doku iskelesi geliştirilmesi ve yara örtüsü geliştirilmesine yönelik olmak üzere iki ayrı çalışma gerçekleştirildi. Bu amaçla farklı polimer çözeltilerinden yola çıkılarak elektroeğirme teknolojisi ile nanoliflerin üretimi, işlem basamaklarının optimizasyonu, karakterizasyonu ve elde edilen platformların doku mühendisliği çalışmalarında kullanım potansiyelleri detaylı bir şekilde araştırıldı.

Projenin ilk kısmında Poli(ϵ -kaprolakton)–K-Karragenan–Çörek otu tohumu yağı (PCL-Kar-ÇOY) nanoliflerinden doku iskelesi geliştirilmesine yönelik yürütülen çalışmalar sonucunda; 10 mg/mL ÇOY içeren PCL-Kar (7:3, v:v) nanoliflerinin HaCaT hücrelerinin yüzeye tutunup çoğalmalarına imkan vererek hücre canlılığına olumlu yönde etkilerinin gözlenmesinin yanı sıra oluşturulan yara kapama modeli ile hücre göçüne de olanak sağlayan yapı ve içeriğe sahip olduğu kontrollü deneylerle gösterildi. Çalışmanın ikinci kısmında ise Poli(ϵ -kaprolakton)–Selüloz asetat–Mandelik asit (PCL-CA-MA) nanoliflerinden yara örtüsü geliştirilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirildi. 25 mM MA içeren PCL-CA nanoliflerinin yara kapama etkinlikleri değerlendirildiğinde nanolif temelli potansiyel bir biyoaktif yara örtüsü geliştirildi.

Elde edilen çıktılar ışığında geliştirilen her iki nanolif temelli platform için *in vivo* çalışmalar gerçekleştirilerek ticarileşme potansiyelleri üzerinde durulabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abedalwafa, M., Wang, F., Wang, L., Li, C.,** 2013. 'Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review', *Reviews on Advanced Materials Science*, 34, 123–140.
- Abrigo, M., McArthur, S.L., Kingshott, P.,** 2014. 'Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: Advances, challenges, and future prospects', *Macromolecular Bioscience*, 14, 772–792.
- Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Lagaron, J.M., López-Rubio, A.,** 2015a. 'Photoprotection of folic acid upon encapsulation in food-grade amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) protein isolate - Pullulan electrospun fibers', *LWT - Food Science and Technology*, 62, 970–975.
- Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Rodríguez, B.A., Lagaron, J.M., López-Rubio, A.,** 2015b. 'Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during in-vitro digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers', *Journal of Functional Foods*, 12, 332–341.
- Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S.A., Najmi, A.K., Siddique, N.A., Damanhour, Z.A., Anwar, F.,** 2013. 'A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3, 337–352.
- Ahmed, F., Saleemi, S., Khatri, Z., Abro, M.I., Kim, I.-S.,** 2015. 'Co-electrospun poly(epsilon-caprolactone)/cellulose nanofibers-fabrication and characterization.', *Carbohydrate polymers*, 115, 388–93.
- Alborzi, S., Lim, L.T., Kakuda, Y.,** 2014. 'Release of folic acid from sodium alginate-pectin-poly(ethylene oxide) electrospun fibers under invitro conditions', *LWT - Food Science and Technology*, 59, 383–388.
- Alborzi, S., Lim, L.T., Kakuda, Y.,** 2013. 'Encapsulation of folic acid and its stability in sodium alginate-pectin-poly(ethylene oxide) electrospun fibres', *Journal of Microencapsulation*, 30, 64–71.
- Albright, V., Xu, M., Palanisamy, A., Cheng, J., Stack, M., Zhang, B., Jayaraman, A., Sukhishvili, S.A., Wang, H.,** 2018. 'Micelle-Coated, Hierarchically Structured

- Nanofibers with Dual-Release Capability for Accelerated Wound Healing and Infection Control', *Advanced Healthcare Materials*, 7.
- Alemán-Domínguez, M.E., Giusto, E., Ortega, Z., Tamaddon, M., Benítez, A.N., Liu, C.,** 2019. 'Three-dimensional printed polycaprolactone-microcrystalline cellulose scaffolds', *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 107, 521–528.
- Ali, B., Blunden, G.,** 2003. 'Pharmacological and Toxicological Properties of *Nigella sativa*', *Phytotherapy Research*, 17, 299–305.
- Ali, S., Khatri, Z., Oh, K.W., Kim, I.-S., Kim, S.H.,** 2014. 'Zein/cellulose acetate hybrid nanofibers: Electrospinning and characterization', *Macromolecular Research*, 22, 971–977.
- Angel, N., Guo, L., Yan, F., Wang, H., Kong, L.,** 2020. 'Effect of processing parameters on the electrospinning of cellulose acetate studied by response surface methodology', *Journal of Agriculture and Food Research*, 2, 100015.
- Apaydin, Y.B., Gedikli, S.,** 2019. 'Wound healing effects of *Nigella sativa* L. essential oil in streptozotocin induced in diabetic rats', *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 7, 030–039.
- Aras, C., Düzyer, Ş., Tümay Özer, E., KARACA, E.,** 2019. 'Çörekotu Yağı İçeren Poliüretan Nanolifli Yüzeylerin Morfolojik Özellikleri Üzerine Bazı Proses Parametrelerinin Etkilerinin Araştırılması', *Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering*, 24, 671–684.
- Arslan, A., Şimşek, M., Aldemir, S.D., Kazaroğlu, N.M., Gümüşderelioğlu, M.,** 2014. 'Honey-based PET or PET/chitosan fibrous wound dressings: Effect of honey on electrospinning process', *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25, 999–1012.
- Atila, D., Keskin, D., Tezcaner, A.,** 2015. 'Cellulose acetate based 3-dimensional electrospun scaffolds for skin tissue engineering applications', *Carbohydrate Polymers*, 133, 251–261.
- Atta, M.B.,** 2003. 'Some characteristics of *nigella* (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile', *Food Chemistry*, 83, 63–68.
- Attari, N., Hausler, R.,** 2020. 'Morphological investigation of Cellulose Acetate nanofibrous membranes', *Proceedings of the 4th International Conference of Recent Trends in Environmental Science and Engineering (RTESE'19)*, 1–8.

- Babaeijandaghi, F., Shabani, I., Seyedjafari, E., Naraghi, Z.S., Vasei, M., Haddadi-Asl, V., Hesari, K.K., Soleimani, M.,** 2010. 'Accelerated epidermal regeneration and improved dermal reconstruction achieved by polyethersulfone nanofibers', *Tissue Engineering - Part A*, 16, 3527–3536.
- Babensee, J.E., Anderson, J.M., McIntire, L. V., Mikos, A.G.,** 1998. 'Host response to tissue engineered devices', *Advanced drug delivery reviews*, 33, 111–139.
- Babilas, P., Knie, U., Abels, C.,** 2012. 'Kosmetische und dermatologische Anwendung von Alpha-Hydroxysäuren', *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, 10, 488–491.
- Bacakova, L., Pajorova, J., Bacakova, M., Skogberg, A., Kallio, P., Kolarova, K., Svorcik, V.,** 2019a. 'Versatile Application of Nanocellulose: From Industry to Skin Tissue Engineering and Wound Healing', *Nanomaterials*, 9.
- Bacakova, L., Zikmundova, M., Pajorova, J., Broz, A., Filova, E., Blanquer, A., Matejka, R., Stepanovska, J., Mikes, P., Jencova, V., Kuzelova Kostakova, E., Sinica, A.,** 2019b. 'Nanofibrous Scaffolds for Skin Tissue Engineering and Wound Healing Based on Synthetic Polymers', in: *Applications of Nanobiotechnology*. IntechOpen, pp. 1–29.
- Bacakova, M., Pajorova, J., Stranska, D., Hadraba, D., Lopot, F., Riedel, T., Brynda, E., Zaloudkova, M., Bacakova, L.,** 2017. 'Protein nanocoatings on synthetic polymeric nanofibrous membranes designed as carriers for skin cells', *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1143–1160.
- Baddour, J.A., Sousounis, K., Tsonis, P.A.,** 2012. 'Organ repair and regeneration: An overview', *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 96, 1–29.
- Balusamy, B., Senthamizhan, A., Uyar, T.,** 2017. 'Electrospun nanofibrous materials for wound healing applications', in: *Electrospun Materials for Tissue Engineering and Biomedical Applications: Research, Design and Commercialization*. Elsevier Inc., pp. 147–177.
- Barhoum, A., Bechelany, M., Makhoul, A.S.H.,** 2019. *Handbook of Nanofibers*, Handbook of Nanofibers. Springer International Publishing.
- Barnes, C.P., Sell, S.A., Knapp, D.C., Walpoth, B.H., Brand, D.D., Bowlin, G.L.,** 2007. 'Preliminary Investigation of Electrospun Collagen and Polydioxanone for Vascular

- Tissue Engineering Applications', *International Journal of Electrospun Nanofibers and Applications*, 1, 73–87.
- Bhardwaj, N., Chouhan, D., Mandal, B.B.**, 2018. 3D functional scaffolds for skin tissue engineering, *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds: Materials, Technologies, and Applications*. Elsevier Ltd.
- Bhardwaj, N., Kundu, S.C.**, 2010. 'Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique', *Biotechnology Advances*, 28, 325–347.
- Bhardwaj, N., Sow, W.T., Devi, D., Ng, K.W., Mandal, B.B., Cho, N.J.**, 2015. 'Silk fibroin-keratin based 3D scaffolds as a dermal substitute for skin tissue engineering', *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 7, 53–63.
- Blanco-Padilla, A., López-Rubio, A., Loarca-Piña, G., Gómez-Mascaraque, L.G., Mendoza, S.**, 2015. 'Characterization, release and antioxidant activity of curcumin-loaded amaranth-pullulan electrospun fibers', *LWT - Food Science and Technology*, 63, 1137–1144.
- Boateng, J.S., Matthews, K.H., Stevens, H.N.E., Eccleston, G.M.**, 2008. 'Wound healing dressings and drug delivery systems: a review.', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 2892–2923.
- Boriboon, D., Vongsetskul, T., Limthongkul, P., Kobsiriphat, W., Tammawat, P.**, 2018. 'Cellulose ultrafine fibers embedded with titania particles as a high performance and eco-friendly separator for lithium-ion batteries', *Carbohydrate Polymers*, 189, 145–151.
- Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., Marzouk, B.**, 2008. 'Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots', *Comptes Rendus - Biologies*, 331, 48–55.
- Breitkreutz, D., Mirancea, N., Nischt, R.**, 2009. 'Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions?', *Histochemistry and cell biology*, 132, 1–10.
- Brohem, C.A., Da Silva Cardeal, L.B., Tiago, M., Soengas, M.S., De Moraes Barros, S.B., Maria-Engler, S.S.**, 2011. 'Artificial skin in perspective: concepts and applications', *Pigment cell & melanoma research*, 24, 35–50.
- Buzgo, M., Plencner, M., Rampichova, M., Litvinec, A., Prosecka, E., Staffa, A., Kralovic, M., Filova, E., Doupnik, M., Lukasova, V., Vocetkova, K., Anderova, J., Kubikova,**

- T., Zajicek, R., Lopot, F., Jelen, K., Tonar, Z., Amler, E., Divin, R., Fiori, F.,** 2019. 'Poly- ϵ -caprolactone and polyvinyl alcohol electrospun wound dressings: Adhesion properties and wound management of skin defects in rabbits', *Regenerative Medicine*, 15, 423–445.
- Castillo-Ortega, M.M., Montaña-Figueroa, A.G., Rodríguez-Félix, D.E., Prado-Villegas, G., Pino-Ocaño, K.P., Valencia-Córdova, M.J., Quiroz-Castillo, J.M., Herrera-Franco, P.J.,** 2015. 'Preparation by coaxial electrospinning and characterization of membranes releasing (–) epicatechin as scaffold for tissue engineering', *Materials Science and Engineering: C*, 46, 184–189.
- Chang, J.J., Lee, Y.H., Wu, M.H., Yang, M.C., Chien, C.T.,** 2012. 'Electrospun anti-adhesion barrier made of chitosan alginate for reducing peritoneal adhesions', *Carbohydrate Polymers*, 88, 1304–1312.
- Chen, G., Guo, J., Nie, J., Ma, G.,** 2016. 'Preparation, characterization, and application of PEO/HA core shell nanofibers based on electric field induced phase separation during electrospinning', *Polymer*, 83, 12–19.
- Cheng, F., Gao, J., Wang, L., Hu, X.,** 2015. 'Composite chitosan/poly(ethylene oxide) electrospun nanofibrous mats as novel wound dressing matrixes for the controlled release of drugs', *Journal of Applied Polymer Science*, 132, 42060.
- Cheng, L., Sun, X., Zhao, X., Wang, L., Yu, J., Pan, G., Li, B., Yang, H., Zhang, Y., Cui, W.,** 2016. 'Surface biofunctional drug-loaded electrospun fibrous scaffolds for comprehensive repairing hypertrophic scars', *Biomaterials*, 83, 169–181.
- Choi, J.S., Leong, K.W., Yoo, H.S.,** 2008. 'In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF)', *Biomaterials*, 29, 587–596.
- Chuong, C.M., Randall, V.A., Widelitz, R.B., Wu, P., Jiang, T.X.,** 2012. 'Physiological regeneration of skin appendages and implications for regenerative medicine', *Physiology*, 27, 61–72.
- Cleeton, C., Keirouz, A., Chen, X., Radacsi, N.,** 2019. 'Electrospun Nanofibers for Drug Delivery and Biosensing', *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5, 4183–4205.
- Cui, S., Yao, B., Sun, X., Hu, J., Zhou, Y., Liu, Y.,** 2016. 'Reducing the content of carrier

- polymer in pectin nanofibers by electrospinning at low loading followed with selective washing', *Materials Science and Engineering: C*, 59, 885–893.
- Dayal, S., Kalra, K.D., Sahu, P.**, 2020. 'Comparative study of efficacy and safety of 45% mandelic acid versus 30% salicylic acid peels in mild-to-moderate acne vulgaris', *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19, 393–399.
- Deitzel, J., Kleinmeyer, J., Harris, D., Beck Tan, N.**, 2001. 'The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles', *Polymer*, 42, 261–272.
- Ding, B., Kim, J., Miyazaki, Y., Shiratori, S.**, 2004. 'Electrospun nanofibrous membranes coated quartz crystal microbalance as gas sensor for NH₃ detection', *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 101, 373–380.
- Ding, B., Yamazaki, M., Shiratori, S.**, 2005. 'Electrospun fibrous polyacrylic acid membrane-based gas sensors', in: *Sensors and Actuators, B: Chemical*. Elsevier, pp. 477–483.
- Ding, J., Zhang, J., Li, J., Li, D., Xiao, C., Xiao, H., Yang, H., Zhuang, X., Chen, X.**, 2019. 'Electrospun polymer biomaterials', *Progress in Polymer Science*, 90, 1–34.
- Doğan, G., Başal, G., Bayraktar, O., Ozyildiz, F., Uzel, A., Erdoğan, I.**, 2016. 'Bioactive Sheath/Core nanofibers containing olive leaf extract', *Microscopy Research and Technique*, 79, 38–49.
- Dolcimascolo, A., Calabrese, G., Conoci, S., Parenti, R.**, 2019. 'Innovative Biomaterials for Tissue Engineering', *Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration*.
- Drupitha, M.P., Bankoti, K., Pal, P., Das, B., Parameswar, R., Dhara, S., Nando, G.B., Naskar, K.**, 2019. 'Morphology-induced physico-mechanical and biological characteristics of TPU–PDMS blend scaffolds for skin tissue engineering applications', *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 107, 1634–1644.
- Elnashar, M.M.M., Yassin, M.A.**, 2009. 'Covalent immobilization of β -galactosidase on carrageenan coated with chitosan', *Journal of Applied Polymer Science*, 114, 17–24.
- Evageliou, V.I., Ryan, P.M., Morris, E.R.**, 2019. 'Effect of monovalent cations on calcium-induced assemblies of kappa carrageenan', *Food Hydrocolloids*, 86, 141–145.
- Fathi, M., Martín, Á., McClements, D.J.**, 2014. 'Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems', *Trends in Food Science and Technology*.

- Fathollahipour, S., Abouei Mehrizi, A., Ghaee, A., Koosha, M.,** 2015. 'Electrospinning of PVA/chitosan nanocomposite nanofibers containing gelatin nanoparticles as a dual drug delivery system', *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 103, 3852–3862.
- Fu, R., Li, C., Yu, C., Xie, H., Shi, S., Li, Z., Wang, Q., Lu, L.,** 2014. 'A novel electrospun membrane based on moxifloxacin hydrochloride/poly(vinyl alcohol)/sodium alginate for antibacterial wound dressings in practical application', *Drug Delivery*, 1–12.
- Gaminian, H., Montazer, M.,** 2017. 'Decorating silver nanoparticles on electrospun cellulose nanofibers through a facile method by dopamine and ultraviolet irradiation', *Cellulose*, 24, 3179–3190.
- Ghosal, K., Manakhov, A., Zají, L., Thomas, S.,** 2017. 'Structural and Surface Compatibility Study of Modified Electrospun Poly (ϵ -caprolactone) (PCL) Composites for Skin Tissue Engineering', 18, 72–81.
- Gomes, S., Rodrigues, G., Martins, G., Henriques, C., Silva, J.C.,** 2017. 'Evaluation of nanofibrous scaffolds obtained from blends of chitosan, gelatin and polycaprolactone for skin tissue engineering', *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 1174–1185.
- Gökmeşe, F., Uslu, İ., Aytimur, A.,** 2013. 'Preparation and Characterization of PVA/PVP Nanofibers as Promising Materials for Wound Dressing', *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 52, 1259–1265.
- Guler, E., Barlas, F.B., Yavuz, M., Demir, B., Gumus, Z.P., Baspinar, Y., Coskunol, H., Timur, S.,** 2014. 'Bio-active nanoemulsions enriched with gold nanoparticle, marigold extracts and lipoic acid: In vitro investigations', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 299–306.
- Gunn, J., Zhang, M.,** 2010. 'Polyblend nanofibers for biomedical applications: perspectives and challenges', *Trends in biotechnology*, 28, 189–197.
- Guo, J., Zhou, H., Akram, M.Y., Mu, X., Nie, J., Ma, G.,** 2016. 'Characterization and application of chondroitin sulfate/polyvinyl alcohol nanofibres prepared by electrospinning', *Carbohydrate Polymers*, 143, 239–245.
- Hadisi, Z., Nourmohammadi, J., Mohammadi, J.,** 2015. 'Composite of porous starch-silk fibroin nanofiber-calcium phosphate for bone regeneration', *Ceramics International*, 41,

10745–10754.

- Haider, S., Al-Zeghayer, Y., Ahmed Ali, F.A., Haider, A., Mahmood, A., Al-Masry, W.A., Imran, M., Aijaz, M.O.,** 2013. 'Highly aligned narrow diameter chitosan electrospun nanofibers', *Journal of Polymer Research*, 20, 105.
- Han, D., Gouma, P.I.,** 2006. 'Electrospun bioscaffolds that mimic the topology of extracellular matrix', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2, 37–41.
- Han, S.O., Son, W.K., Youk, J.H., Lee, T.S., Park, W.H.,** 2005. 'Ultrafine porous fibers electrospun from cellulose triacetate', *Mater Lett*, 59, 2998–3001.
- Hivechi, A., Bahrami, S.H., Siegel, R.A.,** 2019. 'Drug release and biodegradability of electrospun cellulose nanocrystal reinforced polycaprolactone', *Materials Science and Engineering: C*, 94, 929–937.
- Horzum, N., Boyaci, E., Eroğlu, A.E., Shahwan, T., Demir, M.M.,** 2010. 'Sorption efficiency of chitosan nanofibers toward metal ions at low concentrations', *Biomacromolecules*, 11, 3301–3308.
- Houshyar, S., Kumar, G.S., Rifai, A., Tran, N., Nayak, R., Shanks, R.A., Padhye, R., Fox, K., Bhattacharyya, A.,** 2019. 'Nanodiamond/poly-ε-caprolactone nanofibrous scaffold for wound management', *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 100, 378–387.
- Hoveizi, E., Nabiuni, M., Parivar, K., Rajabi-Zeleti, S., Tavakol, S.,** 2014. 'Functionalisation and surface modification of electrospun polylactic acid scaffold for tissue engineering', *Cell Biology International*, 38, 41–49.
- Hu, W.W., Yu, H.N.,** 2013. 'Coelectrospinning of chitosan/alginate fibers by dual-jet system for modulating material surfaces', *Carbohydrate Polymers*, 95, 716–727.
- Huang, R., Li, W., Lv, X., Lei, Z., Bian, Y., Deng, H., Wang, H., Li, J., Li, X.,** 2015. 'Biomimetic LBL structured nanofibrous matrices assembled by chitosan/collagen for promoting wound healing', *Biomaterials*, 53, 58–75.
- Huang, S., Fu, X.,** 2010. 'Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 142, 149–159.
- Hutmacher, D.W., Schantz, T., Zein, I., Ng, K.W., Teoh, S.H., Tan, K.C.,** 2001. 'Mechanical

- properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling', *Journal of Biomedical Materials Research*, 55, 203–216.
- Ignatova, M., Manolova, N., Rashkov, I.**, 2013. 'Electrospun Antibacterial Chitosan-Based Fibers', *Macromolecular Bioscience*, 13, 860–872.
- Islam, S., Rabbani, M.M., Yang, S.B., Choi, W.S., Choi, J.H., Oh, W., Shin, J.C., Lee, J.T., Yeum, J.H.**, 2014. 'Poly (vinyl alcohol)/ Pullulan Blend Nanofibres Prepared from Aqueous Solutions Using Electrospinning Method', 22, 779–786.
- Jahanbaani, A.R., Behzad, T., Borhani, S., Darvanjooghi, M.H.K.**, 2016. 'Electrospinning of cellulose nanofibers mat for laminated epoxy composite production', *Fibers and Polymers*, 17, 1438–1448.
- Jiang, S., Lv, J., Ding, M., Li, Y., Wang, H., Jiang, S.**, 2016. 'Release behavior of tetracycline hydrochloride loaded chitosan/poly(lactic acid) antimicrobial nanofibrous membranes', *Materials Science and Engineering C*, 59, 86–91.
- Johnson, A., Kong, F., Miao, S., Lin, H.T.V., Thomas, S., Huang, Y.C., Kong, Z.L.**, 2020. 'Therapeutic effects of antibiotics loaded cellulose nanofiber and κ -carrageenan oligosaccharide composite hydrogels for periodontitis treatment', *Scientific Reports*, 10, 1–23.
- Ju, Y.W., Oh, G.Y.**, 2017. 'Behavior of toluene adsorption on activated carbon nanofibers prepared by electrospinning of a polyacrylonitrile-cellulose acetate blending solution', *Korean Journal of Chemical Engineering*, 34, 2731–2737.
- Kalhuri, F., Arkan, E., Dabirian, F., Abdi, G., Moradipour, P.**, 2019. 'Controlled Preparation and Characterization of Nigella Sativa Electrospun Pad for Controlled Release', *Silicon*, 11, 593–601.
- Kang, Y.O., Yoon, I.S., Lee, S.Y., Kim, D.D., Lee, S.J., Park, W.H., Hudson, S.M.**, 2010. 'Chitosan-coated poly(vinyl alcohol) nanofibers for wound dressings', *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 92, 568–576.
- Kee Woei Ng, Hutmacher, D.W., Schantz, J.T., Chin Seng Ng, Too, H.P., Thiam Chye Lim, Toan Thang Phan, Swee Hin Teoh**, 2001. 'Evaluation of ultra-thin poly(ϵ -caprolactone) films for tissue-engineered skin', *Tissue Engineering*, 7, 441–455.
- Khil, M.S., Cha, D. Il, Kim, H.Y., Kim, I.S., Bhattarai, N.**, 2003. 'Electrospun nanofibrous

- polyurethane membrane as wound dressing', *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 67, 675–679.
- Kiatyongchai, T., Wongsasulak, S., Yoovidhya, T.**, 2014. 'Coaxial electrospinning and release characteristics of cellulose acetate-gelatin blend encapsulating a model drug', *Journal of Applied Polymer Science*, 131, 40167.
- Kim, Y.K., Cha, S. Il, Hong, S.H., Jeong, Y.J.**, 2012. 'A new hybrid architecture consisting of highly mesoporous CNT/carbon nanofibers from starch', *Journal of Materials Chemistry*, 22, 20554–20560.
- Kobsa, S., Kristofik, N.J., Sawyer, A.J., Bothwell, A.L.M., Kyriakides, T.R., Saltzman, W.M.**, 2013. 'An electrospun scaffold integrating nucleic acid delivery for treatment of full-thickness wounds', *Biomaterials*, 34, 3891–3901.
- Koosha, M., Mirzadeh, H.**, 2015. 'Electrospinning, mechanical properties, and cell behavior study of chitosan/PVA nanofibers', *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103, 3081–3093.
- Korehei, R., Kadla, J.F.**, 2014. 'Encapsulation of T4 bacteriophage in electrospun poly(ethylene oxide)/cellulose diacetate fibers', *Carbohydrate Polymers*, 100, 150–157.
- Kriegel, C., Arrechi, A., Kit, K., McClements, D.J., Weiss, J.**, 2008. 'Fabrication, functionalization, and application of electrospun biopolymer nanofibers', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 775–797.
- Lai, H.-J., Kuan, C.-H., Wu, H.-C., Tsai, J.-C., Chen, T.-M., Hsieh, D.-J., Wang, T.-W.**, 2014. 'Tailored design of electrospun composite nanofibers with staged release of multiple angiogenic growth factors for chronic wound healing', *Acta Biomaterialia*, 10, 4156–4166.
- Langer, R., Vacanti, J.P.**, 1993a. 'Tissue engineering', *Science (New York, N.Y.)*, 260, 920–926.
- Langer, R., Vacanti, J.P.**, 1993b. 'Tissue engineering', *Science*, 260, 920–926.
- Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J.**, 2020. *Principles of tissue engineering*, Sidalc.Net.
- Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J.P.**, 2013. *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition*, Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition.
- Lee, H., Nishino, M., Sohn, D., Lee, J.S., Kim, I.S.**, 2018. 'Control of the morphology of

- cellulose acetate nanofibers via electrospinning', *Cellulose*, 25, 2829–2837.
- Lee, K.H., Kim, H.Y., Khil, M.S., Ra, Y.M., Lee, D.R.**, 2003. 'Characterization of nano-structured poly(ϵ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning', *Polymer*, 44, 1287–1294.
- Leong, K.F., Cheah, C.M., Chua, C.K.**, 2003. 'Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs', *Biomaterials*, 24, 2363–2378.
- Leung, V., Ko, F.**, 2011. 'Biomedical applications of nanofibers', *Polymers for Advanced Technologies*, 22, 350–365.
- Li, D., Wang, Y., Xia, Y.**, 2004. 'Electrospinning Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays and Layer-by-Layer Stacked Films', *Advanced Materials*, 16, 361–366.
- Li, J.J., Yang, Y.Y., Yu, D.G., Du, Q., Yang, X.L.**, 2018. 'Fast dissolving drug delivery membrane based on the ultra-thin shell of electrospun core-shell nanofibers', *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 122, 195–204.
- Li, L., Ni, R., Shao, Y., Mao, S.**, 2014. 'Carrageenan and its applications in drug delivery', *Carbohydrate Polymers*, 103, 1–11.
- Li, M., Mondrinos, M.J., Gandhi, M.R., Ko, F.K., Weiss, A.S., Lelkes, P.I.**, 2005. 'Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering', *Biomaterials*, 26, 5999–6008.
- Li, W., Danielson, K.G., Alexander, P.G., Tuan, R.S.**, 2003. 'Biological response of chondrocytes cultured in three- dimensional nanofibrous poly (ϵ -caprolactone) scaffolds'.
- Li, W., Yu, Q., Yao, H., Zhu, Y., Topham, P.D., Yue, K., Ren, L., Wang, L.**, 2019. 'Superhydrophobic hierarchical fiber/bead composite membranes for efficient treatment of burns', *Acta Biomaterialia*, 92, 60–70.
- Li, W.J., Laurencin, C.T., Caterson, E.J., Tuan, R.S., Ko, F.K.**, 2002. 'Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering', *Journal of Biomedical Materials Research*, 60, 613–621.
- Li, Z., Kang, H., Li, Q., Che, N., Liu, Z., Li, P., Zhang, C., Liu, R., Huang, Y.**, 2014.

- 'Ultrathin core-sheath fibers for liposome stabilization', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 122, 630–637.
- Liao, N., Unnithan, A.R., Joshi, M.K., Tiwari, A.P., Hong, S.T., Park, C.-H., Kim, C.S.,** 2015. 'Electrospun bioactive poly (ϵ -caprolactone)–cellulose acetate–dextran antibacterial composite mats for wound dressing applications', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 469, 194–201.
- Lin, H.-Y., Chen, H.-H., Chang, S.-H., Ni, T.-S.,** 2013. 'Pectin-chitosan-PVA nanofibrous scaffold made by electrospinning and its potential use as a skin tissue scaffold', *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 24, 470–484.
- Lionelli, G.T., Lawrence, W.T.,** 2003. 'Wound dressings', *The Surgical clinics of North America*, 83, 617–638.
- Liu, H., Hsieh, Y. Lo,** 2002. 'Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate', *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 40, 2119–2129.
- Liu, H., Tang, C.,** 2007. 'Electrospinning of cellulose acetate in solvent mixture N,N-dimethylacetamide (DMAc)/acetone', *Polym J*, 39, 65–72.
- López-Rubio, A., Sanchez, E., Wilkanowicz, S., Sanz, Y., Lagaron, J.M.,** 2012. 'Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids', *Food Hydrocolloids*, 28, 159–167.
- Ma, Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S.,** 2005. 'Electrospun cellulose nanofiber as affinity membrane', *J Membr Sci*, 265, 115–123.
- MacNeil, S.,** 2007. 'Progress and opportunities for tissue-engineered skin', *Nature*, 445, 874–880.
- Mahmoudi, N., Eslahi, N., Mehdipour, A., Mohammadi, M., Akbari, M., Samadikuchaksaraei, A., Simchi, A.,** 2017. 'Temporary skin grafts based on hybrid graphene oxide-natural biopolymer nanofibers as effective wound healing substitutes: pre-clinical and pathological studies in animal models', *Journal of materials science. Materials in medicine*, 28.
- Manoukian, O.S., Ahmad, A., Marin, C., James, R., Mazzocca, A.D., Kumbar, S.G.,** 2016. 'Bioactive nanofiber dressings for wound healing', in: *Wound Healing Biomaterials*. Elsevier Inc., pp. 451–481.

- Matos, R.J.R., Chaparro, C.I.P., Silva, J.C., Valente, M.A., Borges, J.P., Soares, P.I.P.,** 2018. 'Electrospun composite cellulose acetate/iron oxide nanoparticles non-woven membranes for magnetic hyperthermia applications', *Carbohydrate Polymers*, 198, 9–16.
- Meli, L., Miao, J., Dordick, J.S., Linhardt, R.J.,** 2010. 'Electrospinning from room temperature ionic liquids for biopolymer fiber formation', *Green Chemistry*, 12, 1883–1892.
- Metcalfe, A.D., Ferguson, M.W.J.,** 2007. 'Tissue engineering of replacement skin: The crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration', *Journal of the Royal Society Interface*, 4, 413–417.
- Mikes, P., Horakova, J., Saman, A., Vejsadova, L., Topham, P., Punyodom, W., Dumklang, M., Jencova, V.,** 2021. 'Comparison and characterization of different polyester nano/micro fibres for use in tissue engineering applications', *Journal of Industrial Textiles*, 50, 870–890.
- Min, B.M., Lee, S.W., Lim, J.N., You, Y., Lee, T.S., Kang, P.H., Park, W.H.,** 2004. 'Chitin and chitosan nanofibers: Electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers', *Polymer*, 45, 7137–7142.
- Mochane, M.J., Motsoeneng, T.S., Sadiku, E.R., Mokhena, T.C., Sefadi, J.S.,** 2019. 'Morphology and properties of electrospun PCL and its composites for medical applications: A mini review', *Applied Sciences (Switzerland)*, 9, 1–17.
- Moghe, A.K., Hufenus, R., Hudson, S.M., Gupta, B.S.,** 2009. 'Effect of the addition of a fugitive salt on electrospinnability of poly(ϵ -caprolactone)', *Polymer*, 50, 3311–3318.
- Mohiti-Asli, M., Lobo, E.G.,** 2016. 'Nanofibrous smart bandages for wound care', in: *Wound Healing Biomaterials*. Elsevier Inc., pp. 483–499.
- Motamedifar, M., Bazargani, A., Namazi, M.R., Sarai, H.S.E.,** 2014. 'Antimicrobial activity of mandelic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A novel finding with important practical implications', *World Applied Sciences Journal*, 31, 925–929.
- Ng, W.K., Yazan, L.S., Ismail, M.,** 2011. 'Thymoquinone from *Nigella sativa* was more potent than cisplatin in eliminating of SiHa cells via apoptosis with down-regulation of Bcl-2 protein', *Toxicology in Vitro*, 25, 1392–1398.
- Nogueira, L.F.B., Maniglia, B.C., Pereira, L.S., Tapia-Blácido, D.R., Ramos, A.P.,** 2016.

- 'Formation of carrageenan-CaCO₃ bioactive membranes', *Materials Science and Engineering: C*, 58, 1–6.
- Nootem, J., Chalorak, P., Meemon, K., Mingvanish, W., Pratumyot, K., Ruckthong, L., Srisuwannaket, C., Niamnont, N.**, 2018. 'Electrospun cellulose acetate doped with astaxanthin derivatives from *Haematococcus pluvialis* for in vivo anti-aging activity', *RSC Advances*, 8, 37151–37158.
- Norouzi, M., Boroujeni, S.M., Omidvarkordshouli, N., Soleimani, M.**, 2015. 'Advances in Skin Regeneration: Application of Electrospun Scaffolds', *Advanced Healthcare Materials*.
- Nourmohammadi, J., Roshanfar, F., Farokhi, M., Haghbin Nazarpak, M.**, 2017. 'Silk fibroin/kappa-carrageenan composite scaffolds with enhanced biomimetic mineralization for bone regeneration applications', *Materials Science and Engineering C*, 76, 951–958.
- O'Brien, F.J.**, 2011. 'Biomaterials & scaffolds for tissue engineering', *Materials Today*.
- Oktay, B., Baştürk, E., Kayaman-Apohan, N., Kahraman, M.V.**, 2013. 'Highly porous starch/poly(ethylene-alt-maleic anhydride) composite nanofiber mesh', *Polymer Composites*, 34, 1321–1324.
- Pakravan, M., Heuzey, M.-C., Ajji, A.**, 2011. 'A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning', *Polymer*, 52, 4813–4824.
- Papini, R.**, 2004. 'Management of burn injuries of various depths', *BMJ (Clinical research ed.)*, 329, 158–160.
- Peh, P., Lim, N.S.J., Blocki, A., Chee, S.M.L., Park, H.C., Liao, S., Chan, C., Raghunath, M.**, 2015. 'Simultaneous Delivery of Highly Diverse Bioactive Compounds from Blend Electrospun Fibers for Skin Wound Healing', *Bioconjugate Chemistry*, 26, 1348–1358.
- Persidis, A.**, 1999. 'Tissue engineering', *Nature biotechnology*, 17, 508–510.
- Pezeshki-Modaress, M., Zandi, M., Mirzadeh, H.**, 2015. 'Fabrication of gelatin/chitosan nanofibrous scaffold: Process optimization and empirical modeling', *Polymer International*, 64, 571–580.
- Pham, Q.P., Sharma, U., Mikos, A.G.**, 2006. 'Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review', *Tissue Engineering*, 12, 1197–1211.

- Phiriyawirut, M., Phaechamud, T.,** 2012. 'Gallic Acid-loaded Cellulose Acetate Electrospun Nanofibers: Thermal Properties, Mechanical Properties, and Drug Release Behavior', *Open Journal of Polymer Chemistry*, 02, 21–29.
- Popa, E.G., Gomes, M.E., Reis, R.L.,** 2011. 'Cell Delivery Systems Using Alginate–Carrageenan Hydrogel Beads and Fibers for Regenerative Medicine Applications', *Biomacromolecules*, 12, 3952–3961.
- Prabhakaran, M.P., Venugopal, J., Chan, C.K., Ramakrishna, S.,** 2008. 'Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering', *Nanotechnology*, 19.
- Prasad, T., Shabeena, E.A., Vinod, D., Kumary, T. V, Kumar, P.R.A.,** 2015. 'Characterization and in vitro evaluation of electrospun chitosan / polycaprolactone blend fibrous mat for skin tissue engineering', *J Mater Sci: Mater Med*, 26, 28.
- Qi, H., Sui, X., Yuan, J., Wei, Y., Zhang, L.,** 2010. 'Electrospinning of cellulose-based fibers from NaOH/urea aqueous system', *Macromolecular Materials and Engineering*, 295, 695–700.
- Qian, J., Xu, W., Yong, X., Jin, X., Zhang, W.,** 2014. 'Fabrication and in vitro biocompatibility of biomorphic PLGA/nHA composite scaffolds for bone tissue engineering', *Materials Science and Engineering C*, 36, 95–101.
- Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.-E., Lim, T.-C., Ma, Z.,** 2005. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. WORLD SCIENTIFIC.
- Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.-E., Yong, T., Ma, Z., Ramaseshan, R.,** 2006. 'Electrospun nanofibers: solving global issues', *Materials Today*, 9, 40–50.
- Ramakrishnan, S., Prud'Homme, R.K.,** 2000. 'Behavior of κ -carrageenan in glycerol and sorbitol solutions', *Carbohydrate Polymers*, 43, 327–332.
- Ramphul, H., Bhaw-Luximon, A., Jhurry, D.,** 2017. 'Sugar-cane bagasse derived cellulose enhances performance of polylactide and polydioxanone electrospun scaffold for tissue engineering', *Carbohydrate Polymers*, 178, 238–250.
- Ranjbar-mohammadi, M., Bahrami, S.H.,** 2015. 'Development of nano fibrous scaffolds containing gum tragacanth / poly (ϵ -caprolactone) for application as skin scaffolds', *Materials Science & Engineering C*, 48, 71–79.
- Rho, K.S., Jeong, L., Lee, G., Seo, B.M., Park, Y.J., Hong, S.D., Roh, S., Cho, J.J., Park,**

- W.H., Min, B.M.**, 2006. 'Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing', *Biomaterials*, 27, 1452–1461.
- Rodero, M.P., Khosrotehrani, K.**, 2010. 'Skin wound healing modulation by macrophages', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3, 643.
- Sakuldao, S., Yoovidhya, T., Wongsasulak, S.**, 2011. 'Coaxial electrospinning and sustained release properties of gelatin-cellulose acetate core-shell ultrafine fibres', *ScienceAsia*, 37, 335–343.
- Salgado, A.J., Coutinho, O.P., Reis, R.L.**, 2004. 'Bone tissue engineering: state of the art and future trends', *Macromolecular bioscience*, 4, 743–765.
- Santo, V.E., Frias, A.M., Carida, M., Cancedda, R., Gomes, M.E., Mano, J.F., Reis, R.L.**, 2009. 'Carrageenan-Based Hydrogels for the Controlled Delivery of PDGF-BB in Bone Tissue Engineering Applications', *Biomacromolecules*, 10, 1392–1401.
- Sas, I., Gorga, R.E., Joines, J.A., Thoney, K.A.**, 2012. 'Literature review on superhydrophobic self-cleaning surfaces produced by electrospinning', *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 50, 824–845.
- Schiffman, J.D., Schauer, C.L.**, 2008. 'A review: Electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications', *Polymer Reviews*, 48, 317–352.
- Sekiya, N., Ichioka, S., Terada, D., Tsuchiya, S., Kobayashi, H.**, 2013. 'Efficacy of a poly glycolic acid (PGA)/collagen composite nanofibre scaffold on cell migration and neovascularisation in vivo skin defect model', *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*, 47, 498–502.
- Sharma, J., Lizu, M., Stewart, M., Zygula, K., Lu, Y., Chauhan, R., Yan, X., Guo, Z., Wujcik, E.K., Wei, S.**, 2015. Multifunctional nanofibers towards active biomedical therapeutics, *Polymers*.
- Siqueira, N.M., Garcia, K.C., Bussamara, R., Both, F.S., Vainstein, M.H., Soares, R.M.D.**, 2015. 'Poly (lactic acid)/chitosan fiber mats: Investigation of effects of the support on lipase immobilization', *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 998–1004.
- Skórkowska-Telichowska, K., Czemplik, M., Kulma, A., Szopa, J.**, 2013. 'The local

- treatment and available dressings designed for chronic wounds', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 68.
- Son, W.K., Youk, J.H., Lee, T.S., Park, W.H.**, 2004. 'Electrospinning of ultrafine cellulose acetate fibers: studies of a new solvent system and deacetylation of ultrafine cellulose acetate fibers', *J Polym Sci B*, 42, 5–11.
- Soto, K.M., Hernández-Iturriaga, M., Loarca-Piña, G., Luna-Bárcenas, G., Gómez-Aldapa, C.A., Mendoza, S.**, 2016. 'Stable nisin food-grade electrospun fibers', *Journal of Food Science and Technology*, 53, 3787–3794.
- Sousa Coelho, D., Veleirinho, B., Alberti, T., Maestri, A., Yunes, R., Fernando Dias, P., Maraschin, M.**, 2018. 'Electrospinning Technology: Designing Nanofibers toward Wound Healing Application', in: *Nanomaterials - Toxicity, Human Health and Environment*. IntechOpen, pp. 1–19.
- Spadaccio, C., Rainer, A., Centola, M., Trombetta, M., Chello, M., Lusini, M., Covino, E., Toyoda, Y., Genovese, J.A.**, 2010. 'Heparin-releasing scaffold for stem cells: a differentiating device for vascular aims', *Regenerative Medicine*, 5, 645–657.
- Sundaramurthi, D., Krishnan, U.M., Sethuraman, S.**, 2014. 'Electrospun nanofibers as scaffolds for skin tissue engineering', *Polymer Reviews*, 54, 348–376.
- Supp, D.M., Boyce, S.T.**, 2005. 'Engineered skin substitutes: Practices and potentials', *Clinics in Dermatology*, 23, 403–412.
- Tabata, Y.**, 2009. 'Biomaterial technology for tissue engineering applications', *Journal of The Royal Society Interface*, 6.
- Taepaiboon, P., Rungsardthong, U., Supaphol, P.**, 2007. 'Vitamin-loaded electrospun cellulose acetate nanofiber mats as transdermal and dermal therapeutic agents of vitamin A acid and vitamin E', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, 387–397.
- Taghavian, H., Ranaei-Siadat, S.O., Kalaei, M.R., Mazinani, S., Ranaei-Siadat, S.E., Harati, J.**, 2015. 'Optimizing the activity of immobilized phytase on starch blended polyacrylamide nanofibers-nanomembranes by response surface methodology', *Fibers and Polymers*, 16, 1048–1056.
- Tan, S.-H., Inai, R., Kotaki, M., Ramakrishna, S.**, 2005. 'Systematic parameter study for

- ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process', *Polymer*, 46, 6128–6134.
- Tang, S., Zhao, Z., Chen, G., Su, Y., Lu, L., Li, B., Liang, D., Jin, R.**, 2016. 'Fabrication of ampicillin/starch/polymer composite nanofibers with controlled drug release properties by electrospinning', *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 77, 594–603.
- Teilaghi, S., Movaffagh, J., Bayat, Z.**, 2020. 'Preparation as Well as Evaluation of the Nanofiber Membrane Loaded with *Nigella sativa* Extract Using the Electrospinning Method', *Journal of Polymers and the Environment*, 28, 1614–1625.
- Tirrell, M., Kokkoli, E., Biesalski, M.**, 2002. 'The role of surface science in bioengineered materials', *Surface Science*, 500, 61–83.
- Topuz, F., Uyar, T.**, 2017. 'Electrospinning of gelatin with tunable fiber morphology from round to flat/ribbon', *Materials Science and Engineering: C*, 80, 371–378.
- Torres-Giner, S., Ocio, M.J., Lagaron, J.M.**, 2009a. 'Novel antimicrobial ultrathin structures of zein/chitosan blends obtained by electrospinning', *Carbohydrate Polymers*, 77, 261–266.
- Torres-Giner, S., Ocio, M.J., Lagaron, J.M.**, 2009b. 'Novel antimicrobial ultrathin structures of zein/chitosan blends obtained by electrospinning', *Carbohydrate Polymers*, 77, 261–266.
- Unnithan, A.R., Sasikala, A.R.K., Murugesan, P., Gurusamy, M., Wu, D., Park, C.H., Kim, C.S.**, 2015. 'Electrospun polyurethane-dextran nanofiber mats loaded with Estradiol for post-menopausal wound dressing', *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 1–8.
- Viswanathan, G., Murugesan, S., Pushparaj, V., Nalamasu, O., Ajayan, P.M., Linhardt, R.J.**, 2006. 'Preparation of biopolymer fibers by electrospinning from room temperature ionic liquids', *Biomacromolecules*, 7, 415–418.
- Wang, X., Drew, C., Lee, S.-H., Senecal, K.J., Jayant, K., Samuelson, L.A.**, 2002. 'Electrospun Nanofibrous Membranes for Highly Sensitive Optical Sensors', *Nano Letters*, 2, 1273–1275.
- Wang, Z., Qian, Y., Li, L., Pan, L., Njunge, L.W., Dong, L., Yang, L.**, 2016. 'Evaluation of emulsion electrospun polycaprolactone/hyaluronan/epidermal growth factor nanofibrous scaffolds for wound healing', *Journal of Biomaterials Applications*, 30, 686–698.

- Weller, C., Sussman, G.,** 2006. 'Wound Dressings Update', *Journal of Pharmacy Practice and Research*, 36, 318–324.
- Wen, P., Wen, Y., Zong, M.H., Linhardt, R.J., Wu, H.,** 2017. 'Encapsulation of Bioactive Compound in Electrospun Fibers and Its Potential Application', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 9161–9179.
- Wong, V.W., Gurtner, G.C.,** 2012. 'Tissue engineering for the management of chronic wounds: current concepts and future perspectives', *Experimental dermatology*, 21, 729–734.
- Wu, Y., He, J.H., Xu, L., Yu, J.,** 2015. 'Electrospinning drug-loaded poly (Butylenes Succinate-cobutylene Terephthalate) (PBST) with acetylsalicylic acid (aspirin).', *International Journal of Electrospun Nanofibers and Applications.*, 1, 1–6.
- Yao, C.H., Yeh, J.Y., Chen, Y.S., Li, M.H., Huang, C.H.,** 2017. 'Wound-healing effect of electrospun gelatin nanofibres containing *Centella asiatica* extract in a rat model', *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 11, 905–915.
- Yezer, I., Demirkol, D.O.,** 2020. 'Cellulose acetate–chitosan based electrospun nanofibers for bio-functionalized surface design in biosensing', *Cellulose* 2020 27:17, 27, 10183–10197.
- Yoo, H.S., Kim, T.G., Park, T.G.,** 2009. 'Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery', *Advanced Drug Delivery Reviews*.
- Yu, X., Tang, X., Gohil, S. V., Laurencin, C.T.,** 2015. 'Biomaterials for Bone Regenerative Engineering', *Advanced Healthcare Materials*, 4, 1268–1285.
- Zarghami, A., Irani, M., Mostafazadeh, A., Golpour, M., Heidarinasab, A., Haririan, I.,** 2015. 'Fabrication of PEO/chitosan/PCL/olive oil nanofibrous scaffolds for wound dressing applications', *Fibers and Polymers*, 16, 1201–1212.
- Zhang, L., Hsieh, Y.-L.,** 2008. 'Ultra-fine cellulose acetate/poly(ethylene oxide) bicomponent fibers', *Carbohydrate Polymers*, 71, 196–207.
- Zhong, S., Teo, W.E., Zhu, X., Beuerman, R., Ramakrishna, S., Yung, L.Y.L.,** 2005. 'Formation of Collagen–Glycosaminoglycan Blended Nanofibrous Scaffolds and Their Biological Properties', *Biomacromolecules*, 6, 2998–3004.
- Zhou, W., He, J., Cui, S., Gao, W.,** 2011. 'Preparation of electrospun silk fibroin/Cellulose Acetate blend nanofibers and their applications to heavy metal ions adsorption', *Fibers and*

Polymers, 12, 431–437.

Zhou, Y., Yang, H., Liu, X., Mao, J., Gu, S., Xu, W., 2013. 'Electrospinning of carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol)/silk fibroin nanoparticles for wound dressings', *International Journal of Biological Macromolecules*, 53, 88–92.