

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN NANOFİBER YAPIDA ÇİFT  
TABAKALI YARA ÖRTÜ MALZEMESİ ÜRETİMİ VE  
KARAKTERİZASYONU**

**Ayşe Nur EROĞLU**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2014**

**Her hakkı saklıdır**

## TEZ ONAYI

Ayşe Nur EROĞLU tarafından hazırlanan " **Biyomedikal Uygulamalar için Nanofiber Yapıda Çift Tabakalı Yara Örtü Malzemesi Üretimi ve Karakterizasyonu**" adlı tez çalışması 12/06/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof. Dr. Ayla ÇALIMLI  
**Eş Danışman** : Doç. Dr. R. Seda TIĞLI AYDIN

### Jüri Üyeleri:

**Başkan** : Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU  
Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi  
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. Ayla ÇALIMLI  
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

**Üye** : Doç. Dr. R. Seda TIĞLI AYDIN  
Bülent Ecevit Üniversitesi Mühendislik Fakültesi  
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

**Üye** : Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ  
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Berna TOPUZ  
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**

**Prof. Dr. İbrahim DEMİR**  
**Enstitü Müdürü**

## ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

12.06.2014

AYŞE NUR EROĞLU

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### BİYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN NANOFİBER YAPIDA ÇİFT TABAKALI YARA ÖRTÜ MALZEMESİ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Ayşe Nur EROĞLU

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ayla ÇALIMLI  
Eş Danışman: Doç. Dr. R. Seda TIĞLI AYDIN

Sunulan tez çalışmasında, kronik yara defektlerindeki dermis tabakasının iyileşme sürecinde sürekli yenilenerek kullanılabilen yara örtüsünün tasarımı ve üretim açısından etkin parametrelerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çift tabakalı membranların alt tabakası jelatin bazlı biyobozunur malzemeden, üst tabakası ise poli-2-hidroksietil metakrilat (PHEMA) bazlı polimer çözeltisinden elektroğirme yöntemi ile elde edilmiştir. Üretilen nanofiber membranlar; SEM, FTIR-ATR, şişme deneyleri, mekanik dayanım testi ve biyobozunurluk çalışmaları ile karakterize edilmiştir. SEM analizi görüntülerinden fiberlerin morfolojisi incelenmiş ve ortalama çapları hesaplanarak membranların üretimde en uygun elektroğirme parametreleri belirlenmiştir. PHEMA nanofiberlerin üretiminde, parametrelerin fiber çaplarına etkisi yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile incelenmiştir. Çift tabakalı nanofiber membranlarda ampisilin (AMP) miktarı arttıkça fiber çaplarında artma olduğu ve fiber çaplarının yaklaşık 270 nm ile 1125 nm arasında değiştiği belirlenmiştir. FTIR-ATR analizi ile membranların yüzey kimyasal yapıları incelenmiştir. Membranların şişme analizleri yapılmış ve su alım kapasiteleri (% 1100 - % 1700) AMP yüklü membranlarda, boş membrana göre daha yüksek çıkmıştır. Mekanik dayanım testi ile membranların çekme mukavemetleri ve elastik modülleri belirlenmiştir. Biyobozunurluk çalışmalarıyla membranlardaki fiberlerin yapılarının değiştiği SEM analizleri ile belirlenmiştir. Yapılan mikroorganizma çalışmalarından Escherichia coli bakterisiyle karşılaştırdığımızda Staphylococcus aureus bakterisine karşı membranların daha duyarlı olduğu saptanmıştır. AMP yüklü çift tabakalı membranlardan antibiyotiğin kontrollü salımı gerçekleştirilerek, yapılan nicel ölçümler sonucunda kümülatif salım verimliliğinin bazik ortamda (pH: 8.0 ve pH: 8.5) daha yüksek çıkması salımın bu ortamda daha iyi olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, pH duyarlı ve antimikrobiyal etkili nanofiber yapıda çift tabakalı yara örtü malzemesinin başarılı bir şekilde üretildiğini göstermektedir.

**Haziran 2014, 92 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Nanofiber, çift tabaka, poli-2-hidroksietil metakrilat (PHEMA), ampisilin (AMP), yara örtü malzemesi, elektroğirme, deri doku mühendisliği.

## ABSTRACT

Master Thesis

### SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF THE DOUBLE-LAYERED WOUND DRESSING MATERIAL IN NANOFIBER STRUCTURE FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Ayşe Nur EROĞLU

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ayla ÇALIMLI  
Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. R. Seda TIĞLI AYDIN

The aim of the study is to design a renewable wound dressing during healing of chronic wound defects and to determine effective parameters in terms of production. The lower surface of double-layered membranes was produced from gelatin based biodegradable material and the upper surface of them was produced from poly-2-hydroxyethyl methacrylate (PHEMA) based polymer solution by electrospinning method. Nanofiber membranes were characterized by SEM, FTIR-ATR, swelling tests, mechanical strength test and biodegradation studies. The morphology of fibers was evaluated from SEM analyses images and the most appropriate electrospinning parameters were determined in membranes production by considering the calculation of average diameters of these fibers. In PHEMA nanofiber production, the effect of parameters on fiber diameters was evaluated by reply surface method (RSM). Results showed that by increasing the ampicillin (AMP) amount in the double-layered nanofiber membranes the fiber diameters increase. Estimated fiber diameters were ranging from about 270 nm to 1125 nm. The chemical structure of membrane surfaces was examined by FTIR-ATR analysis. Swelling experiments were performed. The water absorption capacity (1100 % - 1700 %) was higher in the AMP loaded membranes than unloaded membranes. Tensile strengths and modules of the membranes were determined by mechanical strength test. In biodegradability studies, changes in fiber structure of the membranes were determined by SEM analysis. In microorganism studies, it was determined that membranes were more sensitive against to Staphylococcus aureus than Escherichia coli. Based on the quantitative measurements by controlled release of antibiotic from AMP loaded double layered membranes, cumulative release efficiency was found to be higher in basic environment (pH: 8.0 and pH: 8.5). The results obtained showed that pH-sensitive and antimicrobial effective double layered wound dressing materials in nanofiber structure which can be applied to injured area was produced successfully.

**June 2014, 92 pages**

**Key Words:** Nanofiber, double layer, poly-2-hydroxyethyl methacrylate (PHEMA), ampicillin (AMP), wound dressing material, electrospinning, skin tissue engineering.

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca, engin bilgi ve tecrübeleriyle yönlendiren, finansal destek sağlanması konusunda beni destekleyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof.Dr. Ayla ÇALIMLI'ya (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarım süresince çalışmalarımda bana yol gösteren ve yönlendiren eş danışman hocam Doç.Dr. R. Seda TIĞLI AYDIN'a (Bülent Ecevit Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı), yürüttüğümüz projede yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ'ye (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı), çalışmalarım sırasında desteklerinden dolayı araştırma grup arkadaşlarım Arş. Gör. Eda SEMİZER, Arş. Gör. Ceren ATİLA DİNÇER, Arş. Gör. Zafer ÇIPLAK ve Emre YÜKSEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca bana karşı sabırlı ve anlayışlı, attığım her adımda bana güvenen, beni yetiştiren, maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim canım annem, babam ve abime sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi minnetle sunarım.

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi BAP tarafından "Nanofiber Yapıdaki Çift Tabakalı Membranların Sentezi ve Karakterizasyonu (12B4343021) " ve "Poli-2-hidroksietil metakrilat (PHEMA) Nanofiber Membranların Üretiminde Yanıt Yüzey Yönteminin (RSM) Uygulanması (13H4343006) " konulu projeler ile desteklenmiştir.

Ayşe Nur EROĞLU

Ankara, Haziran 2014

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
SİMGELER DİZİNİ .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Deri Doku Mühendisliği .....	3
2.1.1 Derinin işlevi ve fizyolojik yapısı .....	4
2.2 Yara Tipleri ve Yara İyileşmesi.....	5
2.3 Yara Örtüleri.....	6
2.4 Yara Örtüsü Çeşitleri .....	7
2.4.1 Geleneksel örtüler .....	7
2.4.2 Biyolojik örtüler .....	8
2.4.3 Modern yara örtüleri .....	8
2.5 Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler .....	10
2.5.1 Jelatin .....	11
2.5.2 Polikaprolakton (PCL) .....	12
2.5.3 Poli-2-hidroksietil metakrilat (PHEMA) .....	12
2.5.4 Poliakrilik asit (PAA).....	13
2.6 Elektroğirme Yöntemi ve Sistemin Kullanılması.....	14
2.6.1 Elektroğirmeyi Etkileyen Parametreler.....	15
2.6.1.1 Polimer çözeltisi parametreleri.....	16
2.6.1.2 İşlem parametreleri.....	18
2.7 Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) .....	19
2.8 Süreli Yayın Araştırması.....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	26

3.1 Malzemeler.....	26
3.2 2-Hidroksietil metakrilat'ın (HEMA) Polimerizasyonu.....	27
3.3 Poli (HEMA-ko-AA) Kopolimerin Hazırlanması .....	27
3.4 PHEMA-PAA Polimer Karışımının Hazırlanması .....	28
3.5 Elektroçirme Yöntemi ile Nanofiber Membranların Üretimi .....	28
3.5.1 PHEMA nanofiber membranların üretim koşullarının belirlenmesi .....	30
3.5.2 PHEMA-PAA nanofiber membranların üretim koşullarının belirlenmesi....	30
3.5.3 Çift tabakalı nanofiber yapıda yara örtüsü üretimi .....	31
3.6 PHEMA Nanofiber Membranların Üretiminde Yanıt Yüzey Yönteminin (RSM) Uygulanması.....	32
3.7 Nanofiber Membranların Karakterizasyonu .....	34
3.7.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi .....	34
3.7.2 FTIR-ATR analizi .....	34
3.7.3 Şişme deneyleri .....	34
3.7.4 Mekanik dayanım testi .....	35
3.7.5 Biyobozunurluk çalışmaları .....	35
3.8. Çift Tabakalı Yara Örtüsünün Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi.....	36
3.9 Çift Tabakalı Yara Örtüsünden Ampisilin Salımının İzlenmesi.....	37
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	39
4.1 Sentezlenen Polimer Örneklerinin <sup>1</sup> H-NMR ve FTIR Analizleri.....	39
4.2 Nanofiber Membranların Üretimi.....	44
4.2.1 PHEMA nanofiber membranların üretimi.....	45
4.2.2 Poli (HEMA-ko-AA) nanofiber membranların üretimi .....	51
4.2.3 PHEMA-PAA nanofiber membranların üretimi .....	52
4.2.4 Çift tabakalı nanofiber yapıdaki membranların (yara örtüsünün) üretimi... 58	
4.3 PHEMA Nanofiberlerin Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) ile Optimizasyonu .....	64
4.4 Nanofiber Membranların Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi .....	72
4.4.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi .....	73
4.4.2 FTIR-ATR analizi .....	73
4.4.3 Şişme deneyleri .....	74
4.4.4 Mekanik dayanım testi .....	76
4.4.5 Biyobozunurluk çalışmaları .....	76



<b>4.5 Çift Tabakalı Yara Örtüsünün Antimikrobiyal Etkinliğinin Kanıtlanması .....</b>	<b>79</b>
<b>4.6 Çift Tabakalı Yara Örtüsünden Ampisilin Salımının İzlenmesi .....</b>	<b>80</b>
<b>5. SONUÇ.....</b>	<b>83</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>86</b>
<b>EK 1 Nicel Ölçümler için Dalgaboyunun Belirlenmesi ve Kalibrasyon Grafiği ....</b>	<b>91</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>92</b>

## SİMGELER DİZİNİ

cm	Santimetre
°C	Santigrat
dk	Dakika
HCL	Hidroklorik Asit
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Potasyum persülfat
kV	kilovolt
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
µm	Mikrometre
mm	Milimetre
MPa	Megapaskal
NaOH	Sodyum hidroksit
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Sodyum metabisülfat
nm	Nanometre
rpm	Dakikada devir
sa	Saat

### Kısaltmalar

AA	Akrilik asit
AIBN	Azobisisobütironitril
AMP	Ampisilin
ANOVA	Modelin Varyans Analizi
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Toplam Yansıması Zayıflatılmış- Fourier Dönüşümlü Kızılötesi)
BSA	Bovine Serum Albumin
CCD	Central Composite Design(Merkezi Bileşik Tasarımı)
CFU	Colony forming unit (koloni oluşturan birim)
Coll	Kollojen
DEX	Dekstran
DMF	N,N-dimetil formamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
ECM	Hücre Dışı Matrisi
E.coli	Escherichia coli
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FESEM	Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HA	Hidroksiapatit
HDF	Human Dermal Fibroblast
HEMA	2-Hidroksietil metakrilat
HFIP	Hekzafloroizopropanol
<sup>1</sup> H-NMR	Proton-Nükleer Manyetik Rezonans
PAA	Poliakrilik asit
PAF	Trombosit aktivasyon faktörü

PAN	Poliakrilonitril
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PCL	Polikaprolakton
PDGF	Trombosit tabanlı büyüme faktörü
PGA	Poli-glikolik asit
PHEMA	Poli-2-hidroksietil metakrilat
PLA	Poli-laktik asit
PLCL	Poli-L-laktik asit-ko-ε-kaprolakton
PLGA	Poli-laktik-ko-glikolik asit
PLLA	Poli-L-laktik asit
PU	Poliüretan
RSM	Yanıt Yüzey Yöntemi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
S.aureus	Staphylococcus aureus
TGF-β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
v/v	Hacim/Hacim oranı
w/v	Ağırlık/Hacim oranı
w/w	Ağırlık/Ağırlık oranı

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Derinin yapısı.....	5
Şekil 2.2 Modern yara örtüsü çeşitleri .....	10
Şekil 2.3 Jelatinin kimyasal yapısı .....	11
Şekil 2.4 Polikaprolakton sentezi.....	12
Şekil 2.5 PHEMA'nın sentezi.....	13
Şekil 2.6 Akrilik asidin kimyasal yapısı .....	13
Şekil 2.7 Basit bir elektroğirme düzeneği .....	14
Şekil 2.8 Polimer çözeltisi damlası artan voltaj etkisiyle; a.yarı küresel damladan, b,c. Taylor konisine geçişi, d. Taylor konisindeki şekli ve sonunda jet halinde çıkışı.....	15
Şekil 2.9 Çekirdek-kabuk yapıları nanofiberler üretmek için elektroğirme sürecinin şematik gösterimi .....	21
Şekil 2.10 Elektroğirme yöntemiyle oluşan nanofiberlerin SEM görüntüleri.....	22
Şekil 2.11 Nanofiberlerin SEM görüntüleri .....	23
Şekil 2.12 Kollajen/kitosan kompozit nanofiber membranların SEM ve FESEM görüntüleri (a ve c ) orijinal, (b ve d) çapraz bağlanma .....	23
Şekil 3.1 Nanofiber membranların üretildiği elektroğirme düzeneği.....	29
Şekil 3.2 PHEMA-PAA nanofiber membran.....	31
Şekil 4.1 Sentezlenen PHEMA'nın <sup>1</sup> H-NMR görüntüsü .....	40
Şekil 4.2 Sentezlenen PHEMA'nın FTIR görüntüsü .....	40
Şekil 4.3 Sentezlenen Poli(HEMA-ko-AA) FTIR görüntüsü .....	41
Şekil 4.4 Sentezlenen PAA'nın <sup>1</sup> H-NMR görüntüsü .....	42
Şekil 4.5 Sentezlenen PHEMA-PAA polimer karışımının <sup>1</sup> H-NMR görüntüsü .....	43
Şekil 4.6 Sentezlenen PHEMA-PAA polimer karışımının <sup>1</sup> H-NMR görüntüsü büyütmüş spektrumlar .....	43
Şekil 4.7 25°C olan PHEMA'dan elde edilen fiberlerin optik mikroskop görüntüleri 3.8µL/dk, 15 cm .....	45
Şekil 4.8 25°C olan PHEMA'dan elde edilen fiberlerin optik mikroskop görüntüleri 10 µL/dk, 15 cm .....	46
Şekil 4.9 +4°C olan PHEMA'dan elde edilen fiberlerin optik mikroskop görüntüleri 3.8 µL/dk, 15 cm .....	46
Şekil 4.10 +4°C olan PHEMA'dan elde edilen fiberlerin optik mikroskop görüntüleri 10 µL/dk,15 cm .....	46

Şekil 4.11 PHEMA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, Etanol/PHEMA (v/v) : 2/1, 20 kV .....	48
Şekil 4.12 PHEMA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, Etanol/PHEMA (v/v) : 2/1, 18 kV .....	48
Şekil 4.13 PHEMA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, Etanol/PHEMA (v/v) : 2/1, 15 kV .....	49
Şekil 4.14 PHEMA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, Etanol/PHEMA (v/v) : 2/1, 10 kV .....	49
Şekil 4.15 PHEMA nanofiber membranların SEM görüntüsü, 3.8µL/dk, 15 cm, 10 kV .....	51
Şekil 4.16 PHEMA nanofiber membranların SEM görüntüsü, 10µL/dk, 15 cm, 10 kV .....	51
Şekil 4.17 Poli(HEMA-ko-AA) fiberlerin optik mikroskop görüntüleri, 10 µL/dk, 15 cm, 18 kV .....	52
Şekil 4.18 PHEMA-PAA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, 10 µL/dk.....	53
Şekil 4.19 PHEMA-PAA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, 7.5 µL/dk.....	54
Şekil 4.20 PHEMA-PAA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, 5 µL/dk.....	54
Şekil 4.21 PHEMA-PAA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, 3.8 µL/dk.....	55
Şekil 4.22 PHEMA-PAA nanofiber membranların SEM görüntüleri, 20 kV.....	56
Şekil 4.23 PHEMA-PAA nanofiber membranların SEM görüntüleri, 18 kV.....	56
Şekil 4.24 PHEMA-PAA nanofiber membranların SEM görüntüleri, 5 µL/dk,18 kV...	57
Şekil 4.25 PCL-Jelatin nanofiber membranların SEM görüntüleri.....	58
Şekil 4.26 Çift tabakalı membranların SEM görüntüleri .....	60
Şekil 4.27 Tek tabakalı membranların (üst tabaka) SEM görüntüleri .....	60
Şekil 4.28 Yükseltilmiş parametrelerde üretilen boş (AMP içermeyen) membranların SEM görüntüsü .....	62
Şekil 4.29 Yükseltilmiş parametrelerde üretilen membranların SEM görüntüsü .....	63
Şekil 4.30 Yükseltilmiş parametrelerde üretilen çift tabakalı membranların SEM görüntüsü .....	64
Şekil 4.31 Optimizasyon sonucunda üretilen PHEMA nanofiberlerin SEM görüntüleri .....	66
Şekil 4.32 Optimizasyon sonucunda üretilen PHEMA nanofiberlerin SEM görüntüleri .....	67
Şekil 4.33 Parametreler ile ln (fiber çapı) değişimlerinin tek boyutlu grafikleri.....	70
Şekil 4.34 Parametreler ile ln (fiber çapı) değişimlerinin üç boyutlu grafikleri.....	70
Şekil 4.35 Design Expert-6 yazılım programının önerdiği koşullar .....	71

Şekil 4.36 Programın verdiği koşulda üretilen PHEMA nanofiberlerin SEM görüntüsü (Büyültme oranı: 5000X) .....	72
Şekil 4.37 Gerçek ve tahmin edilen yanıt değerleri arasındaki ilişki.....	72
Şekil 4.38 Üretilen membranlara ait FTIR-ATR spektrumu .....	74
Şekil 4.39 (a,b,c,d) Denge şişme eğrileri ve (e) farklı pH değerlerine karşı membranların % su içeriği.....	75
Şekil 4.40 Hazırlanan membranların 14 günlük süre sonunda % ağırlık kaybı.....	77
Şekil 4.41 Çift tabakalı membranların bozunma öncesi ve sonrası SEM görüntüleri ....	78
Şekil 4.42 Farklı miktarlarda AMP içeren çift tabakalı membranların inhibisyon bölgesi görüntüleri .....	80
Şekil 4.43 Kümülatif salım grafikleri .....	81
Şekil 4.44 Farklı pH değerlerine karşı zamanla salınan miktarlar .....	82

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Farklı değerlerdeki k için bazı değerler .....	20
Çizelge 3.1 Bağımsız değişkenlerin gerçek ve kodlanmış değerleri.....	33
Çizelge 3.2 RSM deney programı.....	33
Çizelge 4.1 PHEMA nanofiberlerin üretiminde kullanılan elektroğirme parametreleri.....	47
Çizelge 4.2 Etanolün ve PHEMA'nın şırıngaya besleme oranları ve PHEMA fiberlerin ortalama fiber çapları.....	50
Çizelge 4.3 PHEMA-PAA nanofiberlerin elektroğirme parametreleri .....	52
Çizelge 4.4 PHEMA-PAA nanofiber membranların üretim koşulları ve fiber çapları...	57
Çizelge 4.5 Çift tabakalı membranların elektroğirme parametreleri ve fiber çapları ...	59
Çizelge 4.6 Yükseltilmiş elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen membranlar.....	61
Çizelge 4.7 Kodlanmış ve gerçek değerler cinsinden deney programı ve elde edilen yanıt.....	65
Çizelge 4.8 Minimum fiber çapının belirlenmesinde kullanılan modelin ANOVA testi sonuçları.....	68
Çizelge 4.9 Boş ve AMP içeren çift tabakalı membranların mekanik özellikleri ve boyutları .....	76
Çizelge 4.10 İnhibisyon bölgeleri .....	79

## 1. GİRİŞ

Vücut ile dış ortam arasında koruyucu bir ara yüz olan deri dokusu vücudumuzda en çok zarar gören organdır. Deri dokusunun geri kazanılması için uygulanan klasik tedavi yöntemleri sonucunda sağlıklı deri dokusunda kayıp meydana gelmekte, beklenmeyen kozmetik sonuçlar ortaya çıkmakta ve iyileşme haftalar sürebilmektedir.

Deri doku kayıpları tedavileri için doku tahribatına neden olmadan yaradan rahatça çıkarılabilen, yara iyileşme süreci içerisinde değiştirilmeyecekse biyobozunabilen yapıya ve uzun süreli kullanımlar için antimikrobiyal özeliğe sahip ideal bir yara örtüsü üretimi için yeni yaklaşımlar geliştirilmesi konusunda tüm dünyada yoğun araştırma faaliyetleri sürdürülmektedir. Bu yaklaşımlar deri doku kayıplarının onarımına yönelik olarak hazırlanan "yara örtü malzemeleri"dir. Günümüzde kullanılan yara örtüleri, sadece yarayı kapatmakla kalmayıp, aynı zamanda dermis yenilenmesini uyararak yara iyileşmesi sürecine katkıda bulunması sonucunda özellikle yanıklarda ve diyabetik ülser gibi hastalıkların tedavisinde geleneksel tedavi yöntemlerine göre üstünlük sağlamaktadır.

Yara örtü malzemeleri, yüksek gözeneklilik ve uygun mekanik dayanım özellikleriyle beraber, biyouyumluluk ve biyobozunma özelliklerine sahip olan biyomalzemelerden üretilmektedir. Yara örtüleri, su buharlaşmasını kontrol eder, yüksek oksijen geçirgenliği sağlar ve yara eksudasını ortamdaki uzaklaştırır. Bununla beraber, üretilen yara örtü malzemeleri, yara dokudaki nano ölçekte fibröz yapılardan oluşan hücre dışı matris (extracellularmatrix, ECM) yapısına benzer nitelikte olmalıdır. Bu nitelikte üretebilmek için en iyi yöntem elektrodepozitasyondur (Lannutti vd. 2007).

Yara örtü materyallerinin kullanım alanındaki en büyük kısıtlamalardan biri kullanılan malzemelerin uzun süreli kullanımlar için antimikrobiyal özelliklerinin olmayışlarıdır. Bu noktada, üretilen yara örtüsü malzemelerinin uygun bir antibiyotik ajan ya da gümüş nanopartiküller gibi antimikrobiyal etkileri kanıtlanmış çeşitli malzemelerin kullanılması öngörülmüştür (Liu vd. 2010, Xu ve Zhou 2010). Kronik defektlerde, yara örtü materyallerinin uzun süreli antimikrobiyal özeliğe sahip olması büyük önem taşımaktadır. Söz konusu uzun süreli antimikrobiyal özellik, malzemenin düşük



yapışkanlık özeliğiyle beraber, malzemeden çeşitli ilaçların kontrollü salımı gerçekleştirilerek sağlanabilir. Olası bir enfeksiyon karşısında nakledilecek ilacın, tek seferde yüksek dozda verilmesi yerine kontrollü salımının gerçekleştirilmesi ile etkinliği yüksek bir korunma sağlanabilir. Bu amaçla birçok yapı kullanılmakta olup, bu sistemlerden özellikle pH duyarlı akıllı polimerler ön plana çıkmaktadır. Sağlıklı derinin ve iyileşmiş yaraların pH değerleri 5'in altındadır. Yara iyileşim sürecinde bir komplikasyon meydana geldiğinde bu pH değeri yükselmeye başlar. Yara bölgesindeki pH 6.5-8.5 aralığı ise bir enfeksiyon olduğuna işarettir (März vd. 2011).

Sunulan tez çalışmasında deri doku rejenerasyonunda etkinliği kanıtlanan jelatin bazlı nanofiber membranın üzerine antibiyotik yüklü PHEMA-PAA nanofiber membranın üretilmesi sonucunda çift tabakalı bir yara örtü malzemesinin üretimi yapılmıştır. Söz konusu hedef doğrultusunda bir taraftan doku oluşumu desteklenirken diğer taraftan pH değişimi karşısında kontrollü antibiyotik salımı gerçekleşmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

Bu bölümde tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili literatür bilgisine yer verilmiştir. Öncelikle deri doku mühendisliği ile ilgili olarak derinin işlevi ve yapısı, yara tipleri ve yara iyileşmesi, yara örtüleri hakkında bilgiler verilmiştir. Ardından doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler, elektroğirme yöntemi ve sistemin kullanılması ve yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile ilgili açıklamalarda bulunulmuştur. Son olarak yapılan süreli yayın araştırmaları anlatılmıştır.

### 2.1 Deri Doku Mühendisliği

Kazalar ya da çeşitli hastalıklar sonucunda organ ve doku hasarları meydana gelmektedir. Bu hasarlar biyolojik ya da yapay bileşenler yardımıyla giderilebilir. Doku mühendisliği de bir bilim dalı olarak bu hasarlara alternatif çözümler üretmektedir. Doku mühendisliği terimi Kaliforniya Üniversitesi'nden Dr. Y.C. Fung tarafından 1987 yılında ilk kez dile getirilmiştir. Doku ve organ kayıplarının artmasıyla beraber gerçek anlamda 1990'ların başından itibaren bu konudaki mühendislik yaklaşımları yaygınlaşmaya başlamıştır. Geleneksel tedavi yöntemlerinin yetersiz kalması nedeniyle doku mühendisliği yaklaşımı ön plana çıkmıştır. Bu yaklaşımın temel bileşenleri hedef dokuyu oluşturabilme potansiyelinde olan hücreler, doğal ve sentetik polimer bazlı yapı iskeleleri ve biyosinyal molekülleridir (Gümüşderelioğlu 2007) .

Doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan doku iskelesi terimi ise yapay bir "hücre dışı matris"dir (extracellular matrix=ECM). ECM, hücreler için fiziksel destek sağlamanın yanı sıra, hücre gelişmesi, farklılaşması ve fonksiyonları açısından önemli bir role sahiptir. Örneğin geniş çaplı bir doku hasarının, hasarlı bölgeye hücre yerleştirilmesi ile giderilmesi olanıdır yoktur. Bu nedenle yapay bir ECM oluşturacak bir iskelenin hücrelerle birlikte bu bölgeye yerleştirilerek hasarlı bölgenin onarımı sağlanır (Gümüşderelioğlu ve Demirtaş 2011).

Doku mühendisliğinin öncül çalışma alanlarından biri olan deri doku mühendisliği ise deri doku kayıplarının onarımına yönelik araştırmalar yapan bir alt disiplindir. Bu alan,

yara onarımı tedavileri için yara örtü malzemelerinin üretimine odaklıdır (Chen vd. 2008).

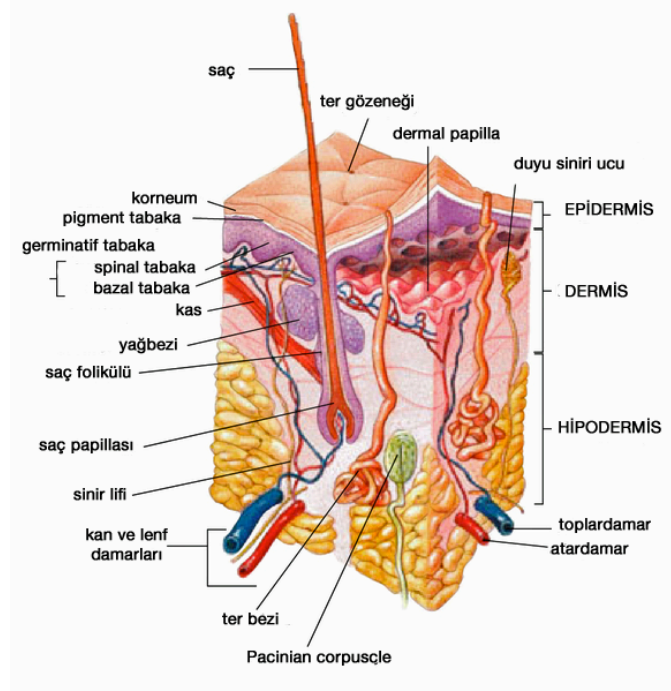
### **2.1.1 Derinin işlevi ve fizyolojik yapısı**

En büyük duyu organımız olan deri vücudumuzun dışını tamamen kaplayarak fiziksel bir bariyer oluşturmaktadır. İki boyutlu geometriye sahip olan deri vücut ısısını ayarlar, solunum ve boşaltıma yardımcı olur ve vücudu dış etkilerden korur. Deri başlıca üç tabakadan oluşmuştur. Hipodermis, dermis ve epidermis olmak üzere en alttan en üstte doğru sıralanmaktadır (Şekil 2.1).

**Hipodermis**, deri altı tabakası dermisin altında bulunur. Göz kapakları haricinde vücudun birçok bölgesinde 1-2 mm kalınlığında bulunmaktadır. Dermisin derin katlardaki devamını oluşturup gevşek bağ dokusu içerir. Hipodermis yani subkütan doku yağ, ter ve geri kalan kıl foliküllerini içerir. Özellikle yağ metabolizmasında önemli rolü vardır. Ayrıca fiziksel şoka karşı mekanik korumada sağlamaktadır (Rizzo 2001).

**Dermis**, asıl deriyi oluşturan alt deridir. Hipodermisle arasında kesin bir sınır olmadığı için kalınlığı kesin bir şekilde ölçülmez. Ortalama kalınlığı 1-2 mm'dir. Lifli ve damarlı bir yapıya sahiptir. Bağ dokusu, sebasöz bezler ve bazı kıl foliküllerini içerir. Deriye mekanik destek sağlamaktadır. Bol kanla beslenir ve epidermisin beslenmesini sağlar (Rizzo 2001).

**Epidermis**, derinin en dıştaki tabakasını oluşturan üst deridir. Keratinosit adı verilen hücrelerden oluşur. Vücutta yaklaşık olarak 0.06-0.12 mm değişen kalınlıklarda vücudun bölümüne, yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değişir. Mekanik hasar, kuruma, mikrop ve su girişini önler. UV ışınlarına karşı koruma sağlar. Kan damarları içermeyen bu tabaka düzenli olarak kendini yenileyebilir. Epidermis kendi içinde dört farklı katmandan oluşur. En alt tabaka tek sıra hücrelerden oluşan bazal tabakadır (stratum basale). Daha sonra spinozum (malpighi) tabakası (stratum spinosum) ve granüler tabakası (stratum granulosum) gelir. En üstte ise nerdeyse ölmüş hücrelerden oluşan korneum tabakası (stratum corneum) gelir (Rizzo 2001).



Şekil 2.1 Derinin yapısı (www.acikbilim.com, 2014)

## 2.2 Yara Tipleri ve Yara İyileşmesi

Yara; mekanik, termal, elektriksel ve kimyasal zedelenmeler, tıbbi ya da fizyolojik rahatsızlıkların altında yatan nedenler sonucu deri ya da doku bütünlüğünün kaybolması olarak tanımlanabilir (Altay ve Başal 2010). Doku kaybının olup olmadığına göre yaralar sınıflandırılabilir. Doku kaybının olmadığı yaralar yani kapalı yaralar derinin bütünlüğü bozulmadan herhangi bir darbe nedeniyle deri altındaki dokularda kanamanın oluşmasıdır. Doku kaybının olduğu yaralar ise açık yaralardır. Deri katlarının bir kısmının ya da tamamının hasara uğraması ya da kaybedilmesi söz konusudur.

Yara iyileşmesi travmalar sonucu meydana gelen hasarların giderilerek yeni dokunun oluşması için birçok fizyolojik ve hücrel aktivitenin organize şekilde çalışması sürecidir. Bu süreç üç temel evreden oluşur. Bunlar: inflamasyon, proliferasyon (çoğalma evresi) ve maturasyon evreleridir.

**İnflamasyon evresi:** Yaralanmadan sonra hemen başlayıp, yaklaşık olarak 72 saat sürmektedir. Alınan hasar sonucunda kan damarlarının bütünlüğü bozulur ve kanama meydana gelir. Hemostazis yani kanamanın durdurulması gerekmektedir. Kan

pıhtılaşma sistemini aktive ederek 72 saat içerisinde trombositlerden trombosit tabanlı büyüme faktörü (PDGF), trombosit aktivasyon faktörü (PAF), tromboksan salımı gerçekleşmektedir (Velnar vd. 2009).

**Proliferasyon evresi:** Yaralamadan sonra 3. gün başlar ve yaklaşık iki hafta sürer. Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- $\beta$ ) fibroblastları yaraya doğru harekete geçirir. Bol damarlardan oluşan granülasyon dokusunun meydana gelebilmesi için fibroblastlar tarafından kollojen ve proteoglikan üretilir. Bu doku oluştuktan sonra dokudaki fibroblastlar farklılaşarak miyofibroblastlar oluşur ve bu yapılar yara alanın küçülmesi sağlar. Yara iyileşme işlemi süresince yer değiştirip kan pıhtılarından elde edilen aminoasitleri substrat olarak kullanarak fibroblastlar sayıca çoğalır (Brown vd. 2011).

**Maturasyon evresi:** Yara iyileşme sürecinin son basamağı onarım evresidir. Bu süreç oldukça uzundur. Yaklaşık 1 ya da 2 yıl sürebilir. Bu evrede fibroblastların sayısı azalır ve kollojen üretimi dengeye gelir. Kollojen fibriller olgunlaştıkça yara bölgesindeki hücre yoğunluğu azalır. Hücresel ve damarlı yapıya sahip olan granülasyon dokusu daha az hücre ve damara sahip skar dokusuna dönüşür (Velnar vd. 2009).

### 2.3 Yara Örtüleri

Deri doku kayıplarının onarımına yönelik olarak hazırlanan yara örtü malzemeleri için araştırmalar M.Ö'ki yıllara kadar dayanmaktadır. Araştırmalara göre ilk çalışmalar Çin ve Mısır'da yapılmıştır. Bitki lifleri yarayı kapatabilmek için kullanılmıştır. 1800'lü yılların başında keten sargılar, sonlarında ise emici pamuklu yün yaraları tedavi amaçlı kullanılmıştır. 1962 yılında Winter'in domuz yaralarının kapatılması için polietilen film sargı kullanarak yara örtüleri konusunda devrim niteliğinde bir çalışma gerçekleştirmiştir. Son yıllarda ise yara örtü materyalleri film, jel, sprey ve köpük yapılarında üretilmiştir (Çakal 2004).

Yara örtüleri özellikle yanıklarda, ayak, bacak ile diyabetik ülser ve epidermolisis bullosa hastalıklarının tedavisinde son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. Söz konusu hastalıkların tedavileri için kullanılan yara örtüleri hem biyobozunur, hem de istenilirse belli bir süre sonra değiştirilebilen malzemelerden elde edilebilmektedir. İdeal bir yara

örtüsünün hasar görmüş deri dokusunda kullanılabilmesi için sahip olması gereken özellikler aşağıda maddeler halinde verilmiştir. Yara örtüsü;

- Yara yüzeyinde sıvı birikimini engellemek için yüksek su buharı geçirgenliğine sahip olmalı,
- Yaradan çıkan sızıntıları ve toksik maddeleri absorbe edebilmeli,
- Optimum gaz geçirgenliği, sıcaklık ve pH sağlamalı,
- Bakteriler ve mikroorganizmalar için engel oluşturmalı,
- Elastik olmalı ve mekanik koruma sağlamalı,
- Toksik ve alerjik olmamalı,
- Dokuya uygunluk sağlamalı,
- Doku tahribatına neden olmadan yaradan rahatça çıkartılabilmeli, yara iyileşme süreci içerisinde değiştirilmeyecekse biyobozunabilir özellikte olmalı,
- Yara kokusunu kontrol edebilmeli,
- Sterillenebilmesi kolay olmalı,
- Ekonomik olmalıdır.

## **2.4 Yara Örtüsü Çeşitleri**

Günümüzde deri defektlerinde kullanılmak üzere birçok yara örtü malzemeleri vardır. Bu malzemeler üç şekilde sınıflandırılabilir. Bunlar:

- 1.Geleneksel örtüler
- 2.Biyolojik örtüler
- 3.Modern yara örtüleri

### **2.4.1 Geleneksel örtüler**

Günümüzde yaygın olarak kullanılan bu gruptaki malzemelere gazlı bezler ve bunların pamuk kompozitleri örnek olarak verilebilir. Bu malzemeler yara iyileşim sürecinde yara yüzeyine yapıştıkları için değiştirilme esnasında yeni oluşan dokulara zarar verirler. Bu nedenle düşük yapışma eğilimi gösteren yeni materyaller geliştirilmiştir. Örneğin; dış tabakası poliamid ya da viskon liflerden, iç tabakası ise pamuk liflerden

oluşan materyaller düşük yapışma özelliklerinden dolayı yaradan kolaylıkla çıkarılabilir; ancak yara için nemli bir arayüzey oluşturmazlar (Altay ve Başal 2010).

#### **2.4.2 Biyolojik örtüler**

Elastin ve lipid içeren kollojen yapraklara sahip doğal örtülere biyolojik örtüler denir (Çakal 2004). Deri doku transplantasyonları yaraların kapatılması için uygulanan yöntemlerden biridir. Biyolojik örtü materyalleri olan deri greftleri verici (donör) alandan tamamen ayrılarak alıcı alana taşınan ve orada yeni oluşan kan damarları ile beslenerek canlılığını devam ettiren deri dokularıdır (Dalkıranoglu 2011). Deri greftleri biyolojik olarak; otogreft, allogreft, izogreft ve zenogreft şeklinde sınıflandırılabilir. Biyolojik örtülerin en büyük dezavantajı geniş ve büyük yaraları kapatabilmek için donör alan yetersizliğinin olmasıdır.

#### **2.4.3 Modern yara örtüleri**

Geleneksel ve biyolojik örtülerin çeşitli nedenlerle kullanımlarının kısıtlı olmasından dolayı yara örtü materyallerini geliştirmek için çalışmalar günümüzde halen devam etmektedir. Modern yara örtüleri olarak bilinen bu çalışmalarda amaç yara çevresini gerektiği kadar nemli tutarak yara iyileşmesini kolaylaştırmaktır. Modern yara örtüleri yapıldıkları materyaller göz önüne alınarak sınıflandırılır. Bu yara örtüleri; alginatlar, film tabakaları, hidrojeller, hidrokoloidler ve köpüklerdir (Şekil 2.2).

**Alginat örtüler:** Aljinik asidin sodyum ve kalsiyum tuzlarından yapılan bu örtüler eşsiz iyon değişim özeliğine sahiptirler (Altay ve Başal 2010). Bu özeliğiyle hidrofilik aljinat jeli, yara iyileşmesi için nemli yara ortamı sağlamaktadır. Bu örtüler yapışkan değildir ve kullanımı kolaydır. Ayrıca yüksek su absorpsiyon özeliğinden dolayı yara yüzeyindeki sızıntıları önlemektedir. Aljinat örtülere örnek olarak Sorbsan<sup>TM</sup>, Kaltostat<sup>TM</sup> ve Tegagen<sup>TM</sup> verilebilir.

**Film tabakalar:** Hidrofilik poliüretan membranlar bu gruptadır. Su ve oksijen geçirgenliği yüksek olan membran elastik değildir; ancak ıslak yara yüzeyine uygulandığında, suyu absorbe ettiği için elastik hale gelir (Çakal 2004). Yarı geçirgen

filmler yara ve ortam arasında gaz değişimini sağlayarak havayla taşınan bakterilerin yaraya bulaşmasını önler.

**Hidrojel örtüler:** Sıvı ortamda çözünmeyip şişen hidrofilik yapılardır (Çakal 2004). Jelatin, polisakkarit, polivinilalkol, polietilenoksit gibi materyaller polimerle çapraz bağ yaparak meydana gelmektedir. Bu örtüler yara yüzeyine yapışmayıp, yüksek absorpsiyon kapasitesine sahiptir. Nu-gel<sup>TM</sup> ve Purilon<sup>TM</sup> hidrojel örtülere örnek verilebilir.

**Hidrokoloid örtüler:** Klinik olarak kullanımda diğer örtülere göre daha çok tercih edilir çünkü hem nemli hem de kuru yara yüzeylerine yapışabilirler (Altay ve Başal 2010). Bu örtüler jel formundaki materyallerin elastomer ve yapışan materyallerle kombinasyonu sonucu elde edilir. Comfeel<sup>TM</sup>, Granuflex<sup>TM</sup> ve Aquacel<sup>TM</sup> hidrokoloid örtülere örnek verilebilir.

**Köpükler:** Yüksek su absorpsiyon kapasitesine sahip ve elastik özellikte olan gözenekli materyallerdir. Bu yara örtüleri silikon ve poliüretan bazlı olabilirler. Lyofoam®, Allevyn® köpük örtülere örnektir.





Şekil 2.2 Modern yara örtüsü çeşitleri (Altay ve Başal 2010)

a. Kalsiyum alginat yara örtüsü, b. Transparan poliüretan film, c. Hidrojel yara örtüsü, d. Hidrokoloid yara örtüsü, e. Silikon bazlı köpük yara örtüsü, f. Poliüretan köpük yara örtüsü

## 2.5 Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler

Doku mühendisliğinde özellikle biyobozunur polimer malzemeler kullanılmaktadır. Kullanılacak biyomalzemeler hücre dışı matris (ECM) görevini üstlenerek hücrelere destek sağlayan ve yapay organ ya da dokunun iskeletini oluşturacaktır. Biyomalzemeler; metalik, seramik, polimerik, kompozit malzemeler olmak üzere dört başlık altında gruplandırılmaktadırlar. Polimerik malzemeler ise doğal ve sentetik olmak üzere iki gruba ayrılır. Deri doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan doğal biyobozunur polimerler; jelatin, kollojen, aljinat, kitosan, ipek fibroin, elastin olarak sıralanabilir (Blitterswijk 2008). Sentetik polimerlerde ise polikaprolakton (PCL), poli-2-hidroksietil metakrilat (PHEMA), poliakrilik asit (PAA), poli(glikolik asit) (PGA),

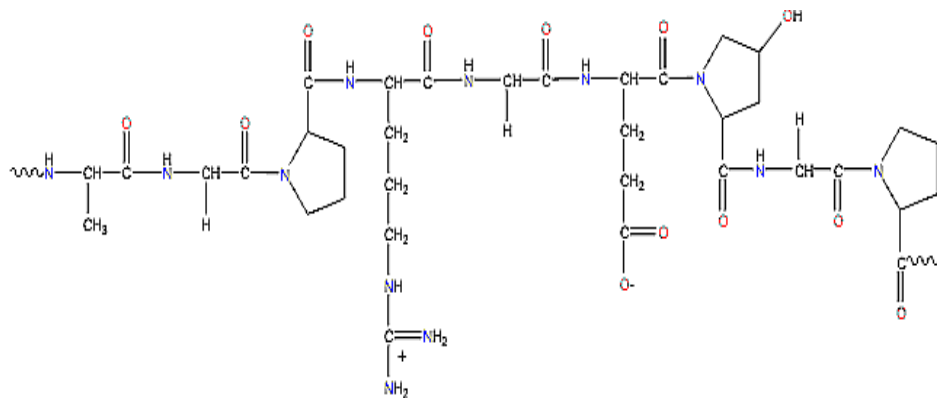
poli(l-laktik asit) (PLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poliüretan (PU) ve silikon yer alır.

Sunulan tez çalışmasında jelatin, PCL, PHEMA ve PAA kullanıldığı için bu malzemeler hakkında bilgiler verilmiştir.

### 2.5.1 Jelatin

Jelatin biyobozunur, kendisi ve bozunma ürünleri biyouyumlu hayvansal bir proteindir. ECM'nin yapısında bulunan kollojenden elde edilen hayvansal kaynaklı bir proteindir. Şekil 2.3'de jelatinin kimyasal yapısı şematik olarak verilmiştir. Jelatin suda kolaylıkla çözünerek koloidal jel çözeltileri oluşturur. Ayrıca jelatinin çözünmüş formu kullanılarak mikroküre (partikül), film ve süngerler elde edilebilir. Jelatin genellikle ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılır (Gümüşderelioğlu ve Demirtaş 2011). Yara iyileşmesinde etkinliği kanıtlanmış bir polimerdir (Ma vd. 2005).

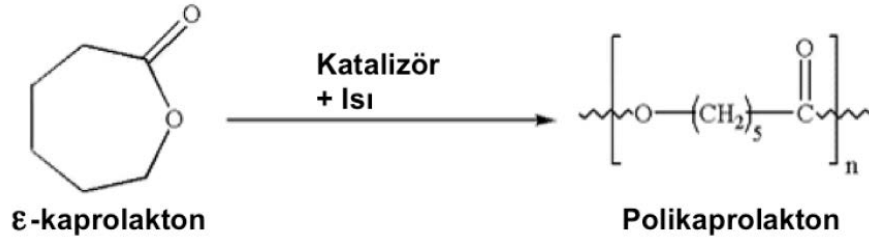
Jelatin için sınıflandırılma yapılırken jel sıklığına, jelleşme noktasına ve erime noktasına bakılır. Bunlardan en çok kullanılan jel sıklığı yani jel gücüdür (Bloom). Jelatinlerin, 50-300 Bloom arasında jel gücü değişir. Doku mühendisliğinde hazırlanan doku iskelesinin mekanik dayanımının iyi olması için 300 Bloom jel gücüne sahip jelatin kullanılır ( Fellers ve Griffeths 1928).



Şekil 2.3 Jelatinin kimyasal yapısı (www.niroinc.com, 2014)

### 2.5.2 Polikaprolakton (PCL)

Polikaprolakton sentetik polimerdir. Hidrofobik, biyobozunur, alifatik poliesterdir. Erime sıcaklığı 58°C, camsı geçiş sıcaklığı -72°C'dir. PCL genel olarak  $\epsilon$ -kaprolaktan'ın Kalayoktanat katalizör eşliğinde halka açılma polimerizasyonu ile elde edilir (Şekil 2.4 (Gümüşderelioğlu ve Demirtaş 2011)). Malzeme üretiminde dayanıklı olması nedeniyle ek polimer olarak kullanılır. Biyobozunma süresi 24 haftadan azdır. Düşük erime sıcaklığına sahip olması işlenebilirliğini artırır. Dondurarak kurutma tekniğiyle üretilir. Biyobozunurluk çalışmalarında substrat ve kontrollü ilaç salım sistemlerinde matris olarak kullanılmaktadır (Gümüşderelioğlu ve Demirtaş 2011). Ayrıca PCL doku yenileyici yapıda olduğu kanıtlanmış bir polimerdir (Chong vd. 2007)



Şekil 2.4 Polikaprolakton sentezi

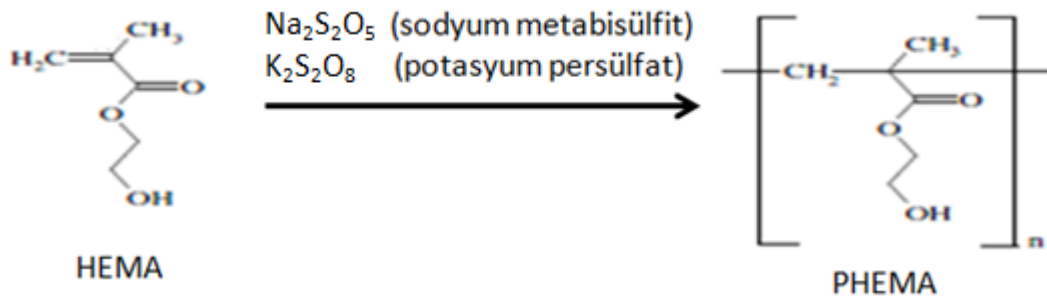
### 2.5.3 Poli-2-hidroksietil metakrilat (PHEMA)

1936 yılında Dupond araştırmacıları tarafından ilk defa sentezlenen poli-2-hidroksietil metakrilat (PHEMA) çeşitli polimerizasyon teknikleri ile sentezlenebilmektedir. Bu teknikler: Yığın, süspansiyon ve emülsiyon polimerizasyon prosesleridir. Yara örtüsü amaçlı kullanımı ise 1960'lı yıllarda gerçekleştirilmiştir.

Yapısındaki hidroksil grupları nedeniyle hidrofilik bir polimerdir (Kim vd. 2005, Ji vd. 2009). Yüksek su absorblama kapasitesine sahip (Pulat ve Abbasoğlu 1995) ve oksijen geçirgenliği yüksek olan PHEMA (Sastre ve Mateo 1988), biyouyumlu (Pradny vd. 2007) ve toksik özellik göstermeyen bir polimerdir. Günümüzde kontakt lensler ve ortopedik implantlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Liu vd. 1998). Ayrıca düşük

yapışkanlık (low-fouling) özeliğinden dolayı düşük protein adsorplama ve hücre yapışma özeliğine sahiptir (Zhang 2011).

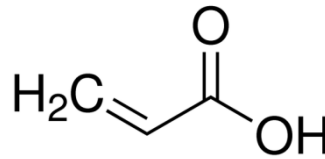
PHEMA serbest radikal polimerizasyonu tepkimesi ile sentezlenir. Kısaca, HEMA (2-hidroksietil metakrilat) monomerinin, uygun başlatıcılar (azobisisobütironitril, amonyum persülfat, potasyum persülfat, sodyum metabisülfid redoks çiftleri vb. gibi) varlığında polimerleşme reaksiyonu sonucunda elde edilmektedir (Şekil 2.5). Öncelikle serbest radikal polimerizasyonun başlama basamağıyla başlatıcılar radikal haline dönüşür. Bu radikaller HEMA monomerine bağlanır. Daha sonra zincir çoğalmasıyla monomerler birbirine bağlanır ve büyümekte olan polimer zinciri sonlanarak PHEMA polimeri oluşur (Zhang vd. 2011) .



Şekil 2.5 PHEMA'nın sentezi ( Zhang vd. 2011)

#### 2.5.4 Poliakrilik asit (PAA)

Akrilik asit (AA) monomerinin serbest radikalik polimerizasyonu ile sentezlenen PAA, pH duyarlı bir polimer olarak bilinir (Basan vd. 2002, Yarımkaya ve Basan 2007, Yue vd. 2009). Bu özeliğinden dolayı hidrojellerle birlikte ilaç salım sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Biyokimyasal işlevinden dolayı biyopolimer grubundandır.

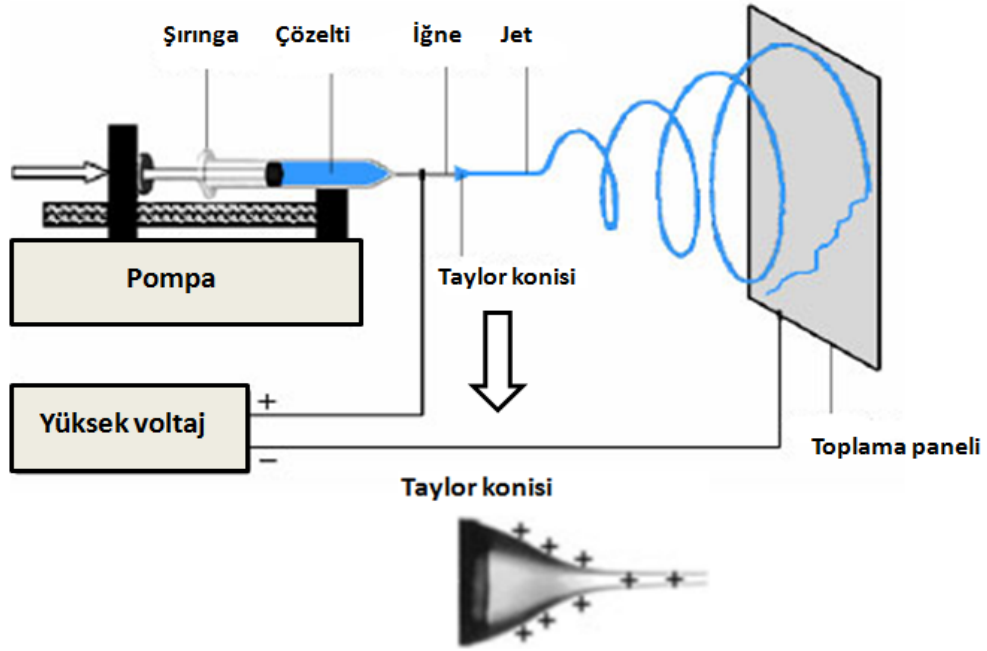


Şekil 2.6 Akrilik asidin kimyasal yapısı (www.sigmaaldrich.com, 2014)

## 2.6 Elektroğirme Yöntemi ve Sistemin Kullanılması

Elektroğirme, William Gilbert tarafından 1600'lü yıllarda keşfedilmiştir. Elektromanyetizmanın sıvılar üzerindeki etkisi ile ortaya çıkmıştır. 19.yüzyılın başında elektriksel spinleme adıyla bilinen bu yöntem 1994 yılından itibaren "electrospinning" adı ile bilinmektedir. William Gilbert çalışmasında bir su damlasının elektriksel olarak kuru bir yüzeyden belli bir uzaklıkta, bir koni biçiminde çekildiğine işaret etmiştir; bu elektrosprey ve elektro üretim işleminin tarihinin başladığı noktadır. Elektroğirme sistem düzeneği temel olarak üç ana parçadan oluşmaktadır (Şekil 2.7):

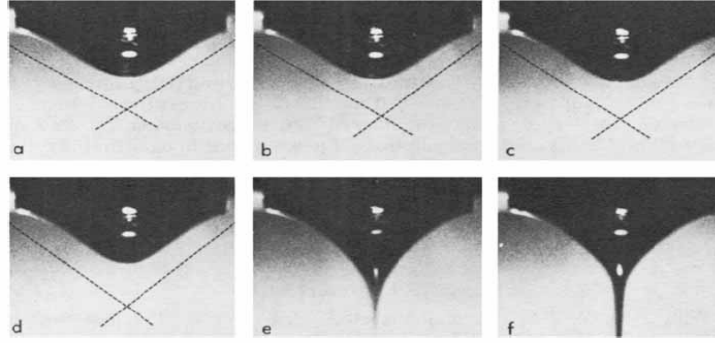
1. Yüksek voltaj kaynağı
2. Besleme ünitesi (Şırınga pompası, şırınga ve şırınga iğnesi)
3. Toplayıcı (İletken plaka, döner silindir/disk v.b.)



Şekil 2.7 Basit bir elektroğirme düzeneği (Ziabari vd. 2009)

Bu teknikte öncelikle polimer çözeltisi hazırlanır ve şırınganın içerisine yerleştirilir. Şırınganın ucunda küt uçlu iğne bulunmaktadır. Şırınga iğnesi ucu ile toplama paneli arasında 50 kV'a kadar değişen voltajlarda gerilim uygulanır (Lannutti vd. 2007). İğnenin ucunda duran polimer çözeltisi yüzey geriliminin uyguladığı kuvvetlerden

dolayı kritik bir voltaj değerine kadar damla biçimindedir. Uygulanan potansiyel fark bir eşik değerine ulaştığı anda, elektrostatik kuvvetler yüzey gerilimi kuvvetlerine eşitlenir. Böylece polimer damlası şekil değiştirerek Taylor konisi biçimini alır (Taylor 1969) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Polimer çözeltisi damlası artan voltaj etkisiyle; a.yarı küresel damladan, b,c. Taylor konisine geçişi, d. Taylor konisindeki şekli ve sonunda jet halinde çıkışı

Voltajdaki çok küçük bir artışla beraber Taylor konisi şeklinde olan polimer damlası jet şeklinde fişkırmaya başlar (Şekil 2.8.e). Şırınga iğnesi ucu ile toplama paneli arasında ilerleyen jet farklı yollar izler. Jet belli bir uzaklıkta kararlı bir şekilde hareket eder, eğer jette kararsızlık hali oluşursa bu polimer çözeltisinin özeliğinden ve sistem değişkenlerinden kaynaklanmaktadır. Klasik Rayleigh kararsızlığı, aksenel simetrik elektrik alan akımlanması ve Whipping kararsızlığı olmak üzere üç çeşit kararsızlık hali vardır. Jet bu kararsızlık hallerinden sadece birini gösterebileceği gibi üç kararsızlık halini de gösterebilir.

### 2.6.1 Elektroğirmeyi Etkileyen Parametreler

Elektroğirme yöntemiyle fiberlerin eldesi için parametrelerin belirlenmesinde polimer çözeltisi parametreleri ve işlem parametreleri etkilidir. Farklı morfolojilerde nanofiberler üretmek amacıyla bu parametrelerin değiştirilmesi olanağı vardır.

### 2.6.1.1 Polimer çözeltisi parametreleri

Fiber morfolojisini en çok etkileyen polimer çözeltisi parametreleridir. Fiber uzunluğu boyunca boncuk oluşumunda yüzey geriliminin etkisi vardır. Taylor konisi ucunda polimer jetin uzaması çözelti viskozitesi ve elektriksel özelliklerine bağlıdır. Bu özellikler fiber çaplarında son derece etkilidir (Sill ve Recum 2008). Polimer çözeltisi parametreleri;

- Molekül ağırlığı
  - Çözelti viskozitesi
  - Çözelti derişimi
  - Yüzey gerilimi
  - Çözelti iletkenliği
  - Çözücü dielektrik sabiti
  - Çözücünün uçuculuğu
- olarak sıralanabilir.

#### **Molekül ağırlığı, çözelti viskozitesi ve derişimi**

Polimerin molekül ağırlığı yani polimer zincirinin uzunluğu çözeltinin viskozitesini etkileyen faktörlerden biridir. Elektroğirme yöntemiyle fiberlerin elde edilebilmesi için polimerin yeterli molekül ağırlığına ve yeterli viskoziteye sahip olması gerekmektedir. Polimerin molekül ağırlığının artmasıyla polimer zincirlerinin birbirine dolanması arttırılmış olur ve sonuçta jetin kopması engellenir ve sürekli bir çözelti jeti muhafaza edilir. Bu durum elektroğirme yöntemiyle monomerik çözeltilerden fiberler elde edilemeyeceğini gösterir (Buchko vd. 1999).

Çözelti viskozitesini etkileyen bir diğer faktör ise çözelti derişimidir. Çözelti derişimi arttıkça viskozite artacağından molekül ağırlığının arttırılmasıyla oluşan durum derişim için de geçerlidir.

Her polimer için minimum viskoziteye yani minimum zincir dolanması gereklidir. Çok yüksek viskoziteye sahip çözeltiler şırınga ucuna doğru pompalamak zordur (Kameoka vd. 2003). Ayrıca viskozitenin arttırılması fiberlerin çapını da arttırır (Zhang vd. 2011). Düşük viskozitede ise çözücü moleküller daha fazla olduğu için daha az zincir

dolanması olacağından fiberler boyunca boncuk oluşması gözlenebilir. Bu nedenle polimer çözeltisinden uygun yapıda fiberler elde edebilmek için çözeltinin viskozitesi iyi ayarlanmalıdır.

### **Yüzey gerilimi**

Fiberler elde edilirken boncuk oluşumun gözlenmesinin nedenlerinden biri de yüzey gerilimidir. Yüklü çözeltinin kendi yüzey gerilimini aşmasıyla elektroğirme başlar. Toplama paneline doğru hareket eden polimer jeti yüzey geriliminden dolayı jet boyunca boncuk oluşumuna neden olabilir. Çözücü molekülleri yüksek derişimde çözelti içerisinde bulunduğunda bu moleküller kendi yüzey gerilimlerini azaltmak için bir araya gelir ve küresel şekilde boncuklar oluşturmaya başlar. Yüksek viskozite, çözücü-polimer molekülleri arasında daha fazla etkileşimin olduğu anlamına gelir ve çözelti yüklerin etkisiyle gerilir ve uzarken çözücü molekülleri bir araya gelmiş polimer zincirleri arasında dağılma eğiliminde olur bu da çözücü moleküllerinin yüzey gerilimi etkisiyle bir araya gelme olasılığını düşürür (Kazaroğlu 2009).

### **Cözelti iletkenliğı**

Çözelti iletkenliğı polimer jetin uzaması ve gerilmesinde etkilidir. İletkenlik artarsa, jet tarafından daha fazla yük taşınmış olur. Çözelti tam gerilmediğinde boncuk oluşumu gerçekleşir. Çözeltiye bir miktar tuz ya da polielektrolit eklendiğinde iletkenlik artacağı için polimer jetin uzaması artacaktır. Jetin uzamasıyla da daha küçük çaplı fiberler elde edilecektir (Zhong vd. 2002).

### **Cözücü dielektrik sabiti**

Düzgün morfolojide fiberler elde edebilmek için yüksek dielektrik sabitine sahip çözücüler kullanmak gerekir. Böylece jetin bükülme kararsızlığı artar yani jetin kat edeceği yol arttığı için fiberlerin çapı azalır (Hsu ve Shivakumar 2004, Son vd. 2004).

### **Cözücü uçuculuğı**

Çözücünün seçimi fiber oluşumu ve fiber gözenekliliğı üzerinde etkili bir parametredir. Polimer jetin şırınga ucundan toplayıcıya doğru hareketi sırasında yeterli çözücü buharlaşmasının gerçekleşmesi için elektroğirme işleminde uçucu çözücülerin kullanılması gerekmektedir. Bu sayede elde edilen fiberlerin kat ettikleri yol boyunca



çözücü buharlaşır ve nihai ürün olan fiberler elde edilir. Ayrıca çözücünün tam olarak buharlaşmaması toplayıcı üzerindeki fiberlerin birbirlerine yapışmasına neden olur.

### **2.6.1.2 İşlem parametreleri**

Uygulanan voltaj, çözelti akış hızı, şırınga ucunun çapı ve şırınga ucu-toplama paneli arasındaki uzaklık olan işlem parametreleri elektroğirme jetine uygulanan dış faktörlerdir. Fiber morfolojisi üzerindeki etkileri çözelti parametrelerine göre daha azdır.

#### **Uygulanan voltaj**

Elektroğirme jetinin oluşabilmesi için minimum voltaj gereklidir. Bu voltaj değerinde fiber üretiminde genellikle boncuklu yapılar oluşur. Boncuk oluşumuna engel olmak için voltaj değerini arttırmak gerekir. Böylece fiber çaplarında belli bir seviyeye kadar azalma olur (Zhao vd. 2004).

#### **Cözelti akış hızı**

Fiber morfolojisini ve çapını etkileyen bir parametredir. Yapılan çalışmalarda çözelti akışı şırıngayı terk eden fiber jetiyle yer değiştirecek hızda değilse şırınga ucundaki Taylor koninin şeklini koruyamadığı belirlenmiştir. Akış hızı artışıyla fiber çapının ve fiber üzerindeki gözeneklerin çaplarında bir artış olduğu gözlenmiştir (Rutledge vd. 2000).

#### **Şırınga ucu-toplama paneli arasındaki uzaklık**

Diğer parametrelere göre daha az etkili olsa da uzaklık arttıkça fiber çaplarında azalma saptanmıştır (Ayutsede vd. 2005).

#### **İğne çapı**

Fiber çapı ve morfolojisi üzerinde etkili olan bu parametre diğerlerine göre daha az öneme sahiptir. İğnenin çapında düşüş olursa fiber çaplarında da düşüş meydana gelmektedir.

## 2.7 Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM)

Endüstriyel araştırmalarda geniş bir kullanıma sahip olan yanıt yüzey yöntemi (Response Surface Method, RSM) bilimsel ve mühendislik prosesler için ilgili problemlerin çözümünde araştırmacılar tarafından uygulanan matematiksel ve istatistiksel bir yöntemdir. Çeşitli değişkenlerden etkilenen süreçlerde en uygun koşulların belirlenmesinde yanıt yüzey yöntemi (RSM) başarılı bir şekilde uygulanır. Bu yöntemde deneysel bağımsız faktörler ve bir ya da birden çok seçilmiş kritere göre ölçülmüş yanıtlar (bağımlı değişkenler) vardır; 1951 yılında Box ve Wilson tarafından merkezi bileşik tasarımı (Central Composite Design) geliştirilmiştir. Bu yöntemde temel mantık, optimum yanıt almak için özel tasarlanmış deney gruplarının ortaya çıkarılmasıdır. Yöntemin uygulanması için öncelikle bağımsız değişkenler ve bu değişkenlerin hangi aralıklar arasında değişecekleri belirlenir (Montgomery 1997). Bağımsız değişkenlerin etkisi sonucunda incelenecek olan bağımlı değişken seçilir. Yazılım tarafından oluşturulan deney programı uygulanır ve her deneyin yanıt değeri ölçülür. Elde edilen veriler ile sistemin modellenmesi yapılır. Matematiksel fonksiyon optimum parametreleri içeren yanıt fonksiyonu Eşitlik 2.1’de verilmiştir.

$$y=f(x_1,x_2,\dots,x_k)+\varepsilon \quad (2.1)$$

Eşitlik 2.1’de  $x_1, x_2, \dots, x_k$  bağımsız değişkenleri,  $\varepsilon$  ise gürültüyü ya da hatayı ifade etmektedir. Sistemi tanımlayan bağımsız değişkenlerin yanıtı doğrusal olduğu zaman fonksiyon birinci dereceden verilir.

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_kx_k + \varepsilon \quad (2.2)$$

Sistemde bir kavislenme yani doğrusallıktan uzaklaşma var ise yüksek dereceli polinomlar kullanılmaktadır.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2.3)$$

Eşitliklerde  $\beta_0$  regresyon eşitliğinin bağımsız terimini,  $\beta_i$  doğrusal terimi,  $\beta_{ii}$  ikinci derece terimi,  $\beta_{ij}$  iç etkileşim terimini ve  $\varepsilon$  ise gürültüyü ya da hatayı ifade etmektedir. Deneysel tasarım yönteminde boyutsuz koordinat sisteminde çalışılır ve bağımsız değişkenlerin kodlanmış şekli Eşitlik 2.4'ki gibi ifade edilir.

$$x_i = (X_i - X_i^*) / \Delta X_i \quad (2.4)$$

Eşitlikte;  $x_i$  bağımsız değişkenin kodlanmış değerini,  $X_i$  bağımsız değişkenin gerçek değerini,  $X_i^*$  bağımsız değişkenin merkez noktadaki gerçek değerini ve  $\Delta X_i$  basamak değişim değerini göstermektedir (Montgomery ve Runger 2007).

Design Expert-6 yazılım programında merkezi bileşik tasarımında (CCD)  $k$  bağımsız değişken sayısına göre alt ve üst uç değerler ( $\alpha$ ) belirlenir (Eşitlik 2.5). Kodlanmış değerlere göre en yüksek seviye +1, en düşük seviye -1 ve merkez nokta 0 ile gösterilmektedir.

$$\alpha = (2^k)^{0.25} \quad (2.5)$$

Bazı  $k$  değerlerine göre hesaplanmış uç değerler ( $\alpha$ ), merkez nokta (tekrar deneyleri) ve toplam deney sayısı çizelge 2.1'de verilmiştir.

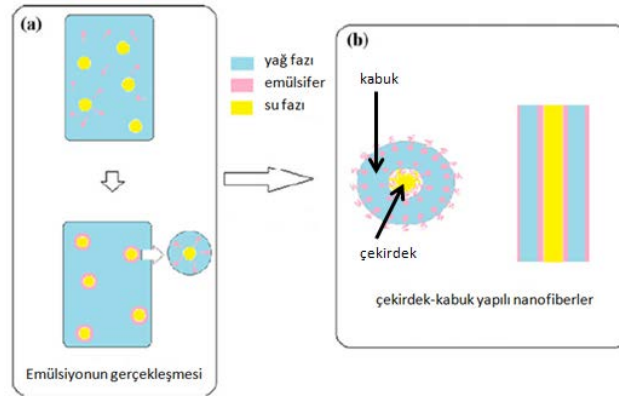
Çizelge 2.1 Farklı değerlerdeki  $k$  için bazı değerler

<b>k</b>	2	3	4	5
<b><math>\alpha</math></b>	1.41	1.68	2	2.37
<b>Merkez Nokta</b>	5	6	7	10
<b>Toplam Deney Sayısı</b>	13	20	31	52

## 2.8 Süreli Yayın Araştırması

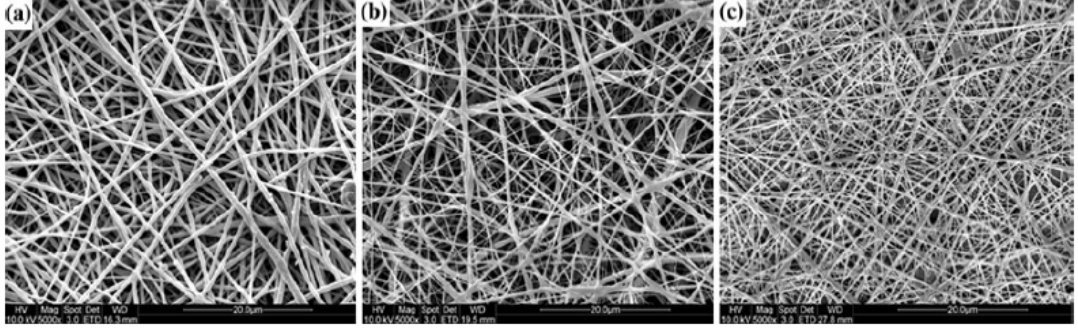
Bu bölümde elektroğirme yöntemi kullanılarak yapılan doku mühendisliği çalışmalarına, yine bu yöntemle nanofiber üretiminde yanıt yüzey yönteminin uygulandığı çalışmalara, antimikrobiyal ve pH duyarlılığıyla ilgili çalışmalara kısaca değinilmiştir.

Tian ve arkadaşlarının 2011’de yaptığı çalışmada endotelial büyüme faktörü kapsüllü poli(L-laktik asit-ko-e-kaprolakton) nanofiberler elektroğirme yöntemiyle oluşturulmuş ve kardiyak doku mühendisliği alanında kullanılmıştır. Bu çalışmada öncelikle çözelti karışımı emülsiyon şeklinde hazırlandıktan sonra elektroğirme yöntemiyle çekirdek-kabuk yapıda nanofiberler elde edilmiştir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Çekirdek-kabuk yapıli nanofiberler üretmek için elektroğirme sürecinin şematik gösterimi

Şekil 2.9’da poli(L-laktik asit-ko-e-kaprolakton) polimerinden oluşan çekirdek kısmıdır. Kabuk kısmında ise vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), bovine serum albumin (BSA) ve dekstran (DEX) kullanılmıştır.



Şekil 2.10 Elektroğirme yöntemiyle oluşan nanofiberlerin SEM görüntüleri

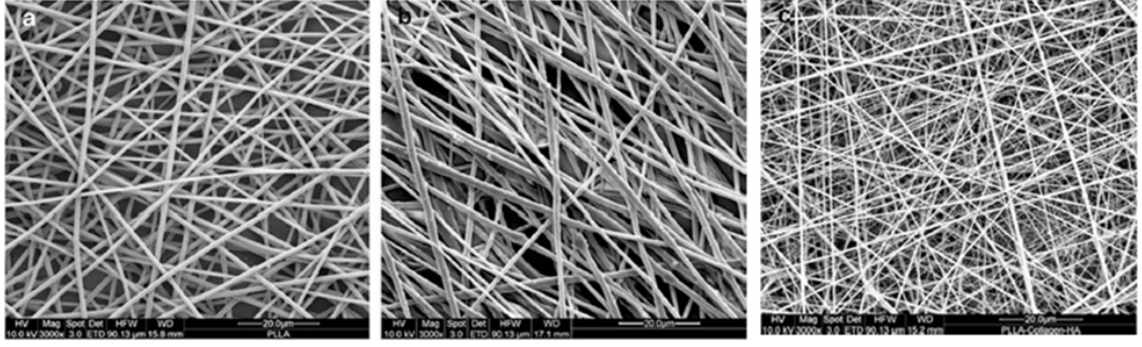
a.PLCL, b.PLCL-VEGF-BSA, c.PLCL-VEGF-DEX

Şekil 2.10'da PLCL fiberler  $572\pm 92$  nm, PLCL-VEGF-BSA fiberler  $460\pm 63$  nm ve PLCL-VEGF-DEX fiberler  $412\pm 61$  nm bulmuşlardır. PLCL-VEGF-DEX yapısında diğer yapılara göre daha küçük çaplı fiberler oluşturmasından dolayı kalp dokusunda bu yapının kullanılması tercih edilmiştir.

Tıgılı ve arkadaşlarının 2011 yılında yayınladıkları çalışmada, PCL-jelatin bazlı deri doku defektlerinde kullanılabilecek uygun bir yara örtüsü üretilmiş ve deri doku rejenerasyonu için epidermal büyüme faktörün (EGF) etkileri incelenmiştir.

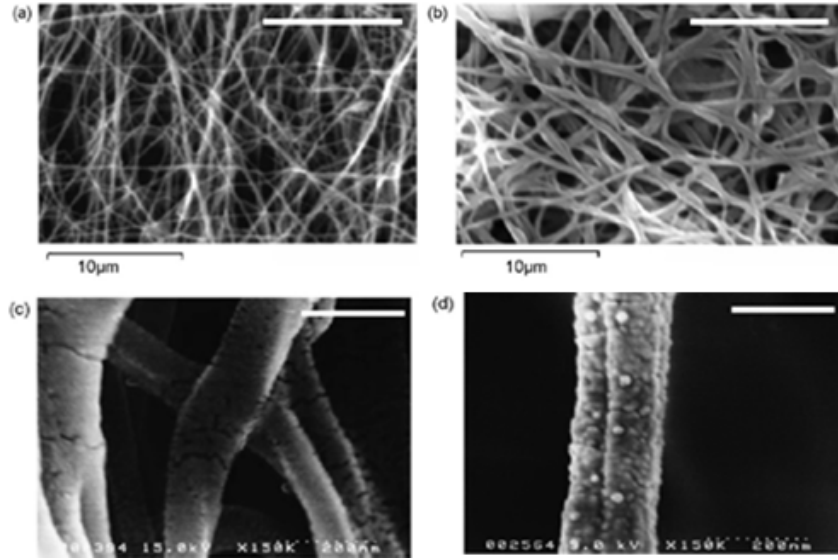
Zhang ve arkadaşlarının 2011 yılında yayınladıkları çalışmada, PHEMA nanofiber matrislerin üretimi için optimum koşullar belirlenmiş ve hidroksil gruplarınca zengin olan PHEMA'nın düşük yapışkanlık (low-fouling) özeliği olan bir malzeme olduğu ve dolayısıyla düşük protein adsorplama ve hücre yapışma özeliğine sahip olduğu belirtilmiştir.

Prabhakaran ve arkadaşlarının 2009'da yapmış oldukları çalışmada ise kemik doku mühendisliği için elektroğirmeyle nanofiber iskeleler sentezlenmiştir. Bu çalışmada şekil 2.11'de verilen taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinde en küçük fiber çapı poli-L-laktik asit (PLLA) /kollojen (Coll) /hidroksiapatit'e (HA) biyokompozitine aittir ve fiber çapı yaklaşık 310 nm bulunmuştur. Hazırlanan biyokompozit nanofiber iskele kemik rejenerasyonunu arttırmak, osteoblastların çoğalması ve mineralizasyonu için potansiyel substrat olabileceği belirlenmiştir.



Şekil 2.11 Nanofiberlerin SEM görüntüleri  
a. PLLA, b. PLLA/HA, c. PLLA/coll/HA

Chen ve arkadaşlarının 2008’de yaptığı çalışmada elektroğirmeyeyle oluşan kollajen/kitosan kompozit nanofiber membranlar yara örtüsünde kullanılmak üzere sentezlenmiştir. Bu kompozit nanofiber membranların fiber çapı yaklaşık 134 nm’dir; ancak çapraz bağlayıcı eklendiğinde fiber çapı artarak yaklaşık 398 nm bulunmuştur (Şekil 2.12). Çapraz bağlayıcının eklenmesinin nedeni membranı doğal deri yapısına benzetmek içindir; çünkü doğal yapı yaklaşık 400 nm’dir.



Şekil 2.12 Kollajen/kitosan kompozit nanofiber membranların SEM ve FESEM görüntüleri (a ve c ) orijinal, (b ve d) çapraz bağlanma

Yördem ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada öncelikle poliakrilonitril polimeri sentezlemiş ve elde edilen polimerden elektroğirme yöntemi uygulanarak nano ölçekte fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. RSM yönteminde çözelti derişimi, voltaj

ve toplayıcı uzaklığı parametreleri değişken olarak seçilmiş ve fiber çapına her parametrenin etkisi değerlendirilmiştir. Yanıt yüzey tahminleri fiberlerin çapları için parametre etkileşimleri ortaya çıkmış, ortalama çap ve değişim katsayısı arasında negatif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir.

Gu ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmada poliakrilonitril (PAN), N,N-dimetil formamid (DMF) çözeltisinden elektroğirme yöntemi kullanılarak çok ince yapıda nanofiberler elde edilmiştir. Farklı çözelti derişimleri ve değişik voltaj değerlerinde sentezlenen fiberlerin morfolojisi ve çap dağılımı taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi yapılarak incelenmiştir. Fiber çaplarının 200 ile 1200 nm arasında olduğu belirlenmiştir. Elektroğirme parametreleri ile ortalama fiber çapı arasında kantitatif bir ilişki olduğu RSM yöntemi uygulanarak anlaşılmıştır. Ayrıca bu yöntemde fiberlerin çap dağılımında çözelti derişiminin önemli bir rolü olduğu ,uygulanan voltajın ise fiber çapında önemli derece bir etkisi olmadığı belirlenmiştir.

Sukigara ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışmada "Bombyx mori" isimli ipek böceğinden elde ettiği ipekten elektroğirme yöntemiyle nano boyutunda fiberler elde etmiştir. RSM yöntemiyle elektroğirme parametreleri optimize edilmiş ve model oluşturulmuştur. Farklı ipek derişimleri, voltaj ve eğirme uzaklıklarında fiber çapı kontrol edilmiştir. RSM yöntemiyle 2. dereceden polinomial fonksiyon kullanılarak fiber çapları ve elektroğirme parametre değerleri arasında korelasyon yapılmıştır.

Sohrabi ve arkadaşlarının 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada çekirdek-kabuk yapıda ampisilin yüklü poli(metil metakrilat)-naylon6 nanofiberler eşeksenli elektroğirmeyle elde edilmiş ve *Listeria innocua* gram pozitif bakterisine karşı fiberlerin antimikrobiyal özellikte olduğunu saptamışlardır.

Liu ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada ampisilin-PCL nanofiber matrislerden salınan ampisilin ile nanofibröz matrisin antimikrobiyal özellik kazandığını belirtmişlerdir. Bununla beraber, hızlı bir patmala etkisi ile %95 kümülatif salım yüzdesi yaklaşık 10 saatte tamamlanmıştır.

Basan ve arkadaşlarının 2002 yılında yayımladıkları bir çalışmada, PHEMA hidrojeller sentezlenmiş ve anti-enflamatuar ajan olan diklofenak sodyumun mide ve bağırsakta salım kinetikleri belirlenmiştir. Çalışmada, PHEMA-akrilik asit kopolimerinin pH=7.5'te (bağırsak pH'ı) kontrollü olarak diklofenak sodyum salımını %100'e varan kümülatif salım verimliliği ile gerçekleştirdiği saptanmıştır.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Sunulan çalışmada; kontrollü antibiyotik salımı ile antimikrobiyal etkiye sahip çift tabakalı yara örtü malzemesinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Çift tabakalı yara örtüsünün alt tabakası yara iyileşme sürecinde etkinliği kanıtlanan jelatin ve doku yenileyici yapıda olduğu PCL malzemelerinden oluşmaktadır. Üst tabaka ise biyouyumlu bir polimer olan PHEMA ve pH duyarlı PAA polimeri içermektedir.

Bu bölümde tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalar ve uygulanan yöntemler anlatılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında nanofiber yapıda matrislerin hazırlanmasında en uygun elektroegirme parametrelerinin belirlenmesi için yapılan deneyler açıklanmıştır. Daha sonra üretilen membranların karakterizasyonuna yönelik çalışmalar anlatılmıştır. Son bölümde ise membranların antimikrobiyal etkinliğini kanıtlamak için mikroorganizma çalışmaları ve in-vitro salım çalışmaları anlatılmıştır.

#### 3.1 Malzemeler

Deneysel çalışmada poli-2-hidroksietil metakrilat'ın (PHEMA) serbest radikalik polimerizasyonu için 2-hidroksietil metakrilat (HEMA, Aldrich, Almanya) monomeri, redoks başlatıcıları olarak potasyum persülfat (Sigma-Aldrich, Almanya) ve sodyum metabisülfid (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. Başlatıcıların çözünmesinde çözücü olarak %99.8 saflıkta mutlak etanol (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. Poliakrilik asitin (PAA) üretimi için %99 saflıkta akrilik asit (AA, Aldrich, Almanya), başlatıcı olarak azobisisobütironitril (AIBN, Fluka) ve çözücü olarak ise N,N-Dimetilformamid (DMF, Merck, Almanya) kullanılmıştır. PAA'daki safsızlıklar dietil eter (Merck, Almanya) kullanılarak uzaklaştırılmıştır.

Alt tabakanın hazırlanmasında ise biri sentetik diğeri doğal polimer olmak üzere iki çeşit polimer kullanılmıştır. Doğal polimer olarak domuz derisi kökenli jelatin Tip A (300 bloom, Sigma, Almanya), sentetik polimer olarak polikaprolakton (PCL, Mn=80,000, Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. PCL/jelatin karışımı için çözücü olarak hekzafloroizopropanol (HFIP, Fluka) kullanılmıştır.

Antibiyotik yüklü membranların üretimi için toz halde bulunan ampisilin (Sigma, Almanya), üretilen membranların antimikrobiyal etkinliğin belirlenmesiyle ilgili deneylerde sıvı besi ortamı için Tryptic Soy Broth (No.105459, Merck, Almanya) , katı besi ortamı için Tryptic Soy Agar (No.105458, Merck, Almanya) , *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection No.6538) ve *Escherichia coli* (American Type Culture Collection No.25922) mikroorganizmaları kullanılmıştır. Salım çalışmalarında kullanılan sodyum azid'i, fosfat tampon çözeltileri (PBS) hazırlamada kullanılan tabletleri ve tampon çözeltilerinin pH değerlerinin ayarlanmasında 1M'lık çözeltileri hazırlanan sodyum hidroksit (NaOH) ve %37'lik hidroklorik asit (HCL) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından alınmıştır.

### **3.2 2-Hidroksietil metakrilat'ın (HEMA) Polimerizasyonu**

PHEMA, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerinin serbest radikal polimerizasyonu tekniği ile hazırlanmıştır. Polimerizasyon, Zhang ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmadaki gibi gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmada başlatıcı olarak potasyum persülfat ve sodyum metabisülfid kullanılmıştır. PHEMA'nın polimerizasyonu için öncelikle %66.3'lük (v/v) etanol çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiliye 0.0058 gram potasyum persülfat, 0.0058 gram sodyum metabisülfid eklenmiş ve çözelti iyice karıştırılarak başlatıcıların çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra çözeltiliye 1118 mikrolitre HEMA monomeri eklenmiş ve elde edilen çözelti yaklaşık iki dakika vortekslenmiştir. Son olarak çözeltiden azot gazı geçirilerek tepkime ortamının inertleştirilmesi sağlanmış ve hazırlanan çözelti 25°C sabit sıcaklıkta olan inkübatörün içerisinde 24 saat bekletilerek polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. PHEMA'nın proton-nükleer manyetik rezonans (<sup>1</sup>H-NMR, Bruker, Almanya) ve fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR, Bruker, Almanya) analizleri yapılmıştır.

### **3.3 Poli (HEMA-ko-AA) Kopolimerin Hazırlanması**

Kopolimerin hazırlanmasında öncelikle potasyum persülfat ve sodyum metabisülfid başlatıcılarının her birinden 0.0174 gram alınarak %66.3'lük (v/v) etanol çözeltisine eklenmiş ve başlatıcıların çözünmesi tamamlandıktan sonra 1118 mikrolitre HEMA monomeri çözeltiliye eklenmiştir. Daha sonra akrilik asit (AA) monomeri, AA/HEMA

oranı (v/v) 0.2, 0.3 ve 0.4 olacak şekilde çözeltiliye eklenerek 25°C'de, 24 saat süre sonunda polimerizasyon gerçekleştirilmiş ve FTIR analizi yapılmıştır.

### **3.4 PHEMA-PAA Polimer Karışımının Hazırlanması**

Polimer karışımı için öncelikle akrilik asit (AA) monomerinin polimerizasyonu ile poliakrilik asit (PAA) elde etmek için deneyler yapılmıştır. Süreli yayınlar incelenerek PAA sentezi için farklı başlatıcılar ve çözücüler seçilmiş ve çeşitli yöntemler denenmiştir (Moulay ve Mehdsoui 2004, Rivas vd. 2005); ancak elde edilen PAA'ler tüp içerisinde yapışkan bir şekilde olmasından dolayı tüpten alınmasında ve çözünmesinde problem yaşanmıştır. En uygun PAA sentez koşullarının belirlenmesinde Rivas ve arkadaşlarının 1997 yılında yapmış olduğu çalışma referans alınarak PAA sentezlenmiştir. Bunun için 0.02 mol AA, 12 ml'lik N,N-dimetilformamid (DMF) içerisinde çözüldükten sonra AA miktarının molce % 0.1'i kadar azobisisobütironitril (AIBN) başlatıcısı eklenmiş ve 60°C'de 6 saat sonunda serbest radikal polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yapı polimer çözeltisi şeklindedir. Bir tüp içerisinde bulunan polimer çözeltisine dietil eter eklenerek çözeltideki PAA'nın çöktürülmesi sağlanmıştır (Krupers vd. 1996). Dietil eter uzaklaştırıldıktan sonra PAA jel şeklinde elde edilmiş ve <sup>1</sup>H-NMR analizi gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.2'de anlatıldığı gibi PHEMA polimeri sentezlemiş ve hacimce oranı (v/v) PAA/PHEMA=1/3 olacak şekilde her bir polimer aynı tüp içerisine alınarak bir gün süreyle karıştırılmış ve homojen bir karışım yani polimer çözeltisi elde edilmiştir. Karışım için <sup>1</sup>H-NMR analizi yapılmıştır.

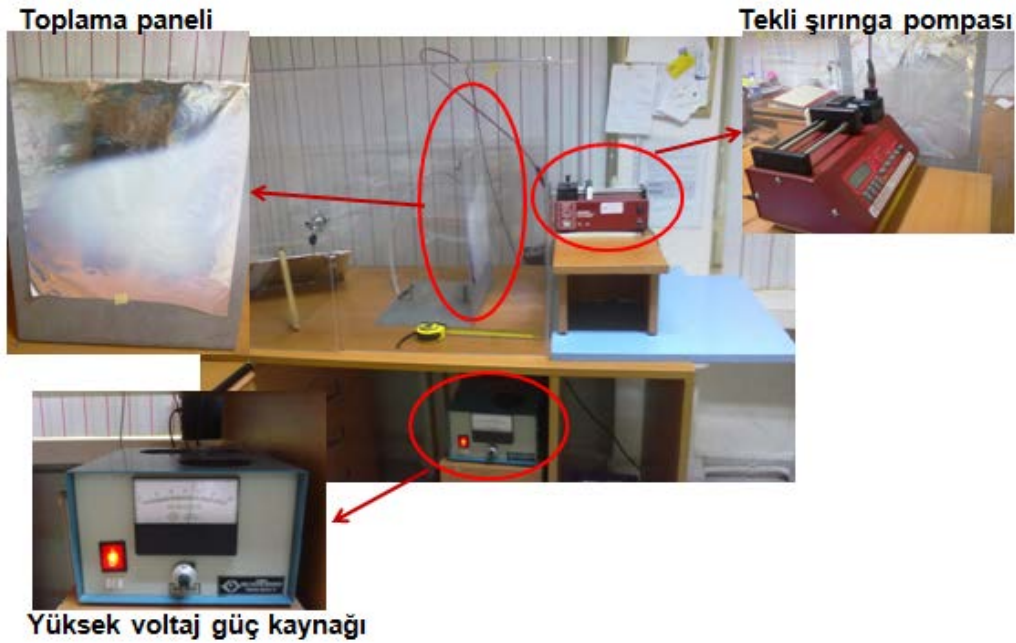
### **3.5 Elektroçirime Yöntemi ile Nanofiber Membranların Üretimi**

Sunulan tez çalışmasında deri doku kayıpları tedavileri için travma yaratmadan yaradan rahatça çıkarılabilen, değiştirilmeyecekse yara iyileşme süreci içerisinde biyobozunabilen yapıya ve uzun süreli kullanımlar için antimikrobiyal özeliğe sahip ideal bir yara örtü malzemesi üretimi hedeflenmiştir. Bunun için ortalama fiber çapı nano ölçekte olan, boncuk oluşumu içermeyen membranlar üretmek amacıyla elektroçirime yöntemi kullanılmış ve işlem parametreleri değiştirilerek en iyi koşulda membranların üretimi gerçekleştirilmiştir. Farklı polimerlerden membranlar hazırlanmıştır. Bunlar; PHEMA, PHEMA-PAA, farklı miktarlarda ampicilin içeren

PHEMA-PAA, PCL-jelatin ve çift tabakalı yara örtüsü olmak üzere 5 farklı özellikte hazırlanmıştır. Üretilen tüm membranlar +4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Elektroegirme işleminde bütün membranlar üretilirken şekil 3.1’deki düzenek kullanılmıştır. Bu düzenek şırınga pompası (New Era Pump Systems, Model No:NE-300), hareketsiz toplama paneli (üzeri alüminyum folyo ile kaplanmış, topraklanmış demir bir metal plaka) ve yüksek voltaj güç kaynağından (Gamma High-Voltage Research,FL) oluşmaktadır. Ayrıca tüm membranların üretiminde Beybi-Türkiye marka plastik şırınga kullanılmıştır.

Elektroegirme işlemi farklı polimer çözeltilerine uygulanarak farklı akış hızları, farklı uzaklıklar (toplama paneli ile şırınga iğnesi ucu arasındaki uzaklık) ve farklı voltaj değerleri test edilerek en iyi koşulda membran üretimi belirlenmiştir. Elde edilen nanofiber yapıdaki matrislerin optik mikroskop (Olympus CKX41, Japonya) ve SEM (Quanta 400F Field Emission, USA) görüntülerine bakılarak fiber morfolojisine yani boncuk oluşumunun olup olmamasına ve fiberlerin homojen olmasına dikkat edilerek optimum üretim koşulları belirlenmiştir. Ortalama fiber çapı SEM görüntülerinden JMicroVision 1.2.7 programı kullanılarak ölçülmüştür.



Şekil 3.1 Nanofiber membranların üretildiği elektroegirme düzeneği

### 3.5.1 PHEMA nanofiber membranların üretim koşullarının belirlenmesi

HEMA monomerinin polimerizasyonu sonucu elde edilen PHEMA polimer çözeltisi ucunda 0.9 mm çapında küt uçlu metal şırınga iğnesi bulunan, 2.5 mL hacmindeki plastik şırıngaya yüklenmiştir. Şekil 3.1’de verilen elektroegirme düzeneği kullanılarak farklı koşullarda fiber üretimi gerçekleştirilmiştir. Fiberlerin toplanması amacıyla, boyutları 200x300 mm olan, düz bir platform şeklindeki hareketsiz toplayıcının yüzeyi alüminyum levha ile kaplanmıştır. Deneysel çalışmada PHEMA nanofiberler üzerine polimer çözeltisinin sıcaklığı ( +4°C,+25°C), etanol varlığı (Etanol/PHEMA; v/v; 0/2, 1/1, 2/1, 3/1 ), akış hızı (3.5, 3.8, 7,10, 20, 40, 80 µL/dk) ve voltaj (10-25 kV arasındaki değerler) etkisi incelenmiş ve PHEMA matrislerinin üretimi için +4°C’deki stok PHEMA çözeltisi kullanılarak en iyi fiber üretimi Etanol/PHEMA (v/v) : 2/1 oranında, 10 µL/dk akış hızında, 15 cm uzaklıkta (şırınga iğnesi ucu-toplama paneli) ve 10 kV voltaj değerinde bulunmuştur.

### 3.5.2 PHEMA-PAA nanofiber membranların üretim koşullarının belirlenmesi

pH duyarlı membranlar elde etmek amacıyla akrilik asit (AA) kullanılmıştır. Öncelikle bu özellikteki membranları üretmek amacıyla Bölüm 3.3’te anlatıldığı gibi HEMA-AA kopolimeri sentezlenmiştir. Elde edilen polimer çözeltisinden nanofiber matrisler üretmek için elektroegirme basamağı tamamlanmıştır; ancak bazı koşullarda fiberlerin oluşmadığı, oluşan koşullarda ise fiberlerde boncuklu yapı gözlenmiştir. Daha sonra farklı polimerizasyon deneyleri yapılmış; ancak bu koşullarda elde edilen kopolimerlerin çözünmesinde problem yaşanmış ve kopolimer sentezinden vazgeçilerek PHEMA-PAA polimer karışımının hazırlanması uygun bulunmuştur. Bölüm 3.4’teki gibi hazırlanan polimer karışımı +4°C’de yaklaşık 1 saat bekletildikten sonra 2.5 mL hacminde ve ucunda 0.9 mm küt uçlu metal iğneli plastik şırıngaya beslenerek şekil 3.1’deki düzenek ile PHEMA-PAA nanofiber membranların üretimi için şırınga iğnesi ucu-toplama paneli arasındaki uzaklık 15 cm olarak sabit tutularak farklı voltaj değerleri (15 kV, 18 kV, 20 kV ve 25 kV) ve farklı akış hızları (3.8, 5, 7.5 ve 10 µL/dk) uygulanmıştır. En uygun koşul 5 µL/dk, 15 cm ve 18 kV olarak belirlenmiştir. Üretilen membranın görüntüsü şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2 PHEMA-PAA nanofiber membran

### 3.5.3 Çift tabakalı nanofiber yapıda yara örtüsü üretimi

Çift tabakalı membranların alt tabakası jelatin bazlı biyobozunur malzemedir, üst tabakası ise PHEMA bazlı malzemedir. Çift tabakalı membranın önce alt tabakası hazırlanmıştır. Bunun için HFIP çözücüsü kullanılarak % 5.4'lük PCL (w/v) çözeltisi ve % 5.4'lük jelatin (w/v) çözeltisi hazırlanmış ve bu iki çözelti hacimce 50:50 oranında oda sıcaklığında 1 gün süreyle karıştırılarak PCL-jelatin çözeltisi elde edilmiştir (Tıǧlı vd. 2011). Elektroegirme işleminde, polimer çözeltisi 5 mL'lik hacimde ve ucunda dış çapı 0.9 mm olan metal iğneli plastik şırıngaya beslenmiştir. PCL-jelatin membranların üretiminde şırınga pompasında akış hızı 1.8 mL/sa, şırınga iğnesi ucu-toplama paneli uzaklığı 15 cm ve voltaj 18 kV olacak şekilde ayarlanarak gerçekleştirilmiştir. Parametreler, Tıǧlı ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış olduğu çalışma referans alınarak belirlenmiştir. Toplama paneli Reynolds markalı alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Böylece PCL-jelatin nanofiber membranlar alüminyum folyodan rahatça çıkarılmıştır. Elde edilen membranlar %70'lik (v/v) etanol çözeltisinde ıslatıldıktan sonra liyafilizatörde (Christ, Germany) vakum altında 1 gece bekletilmiş ve böylece alt tabaka oluşturulmuştur.

Yara örtüsü amaçlı kullanılacak membranların üst tabakası hazırlanırken olası bir enfeksiyon sırasında (pH=6.5-8.5) ampisilin (AMP) kontrollü olarak salımı için hazırlanan homojen polimer karışımına, karışım ağırlının (w/w) % 0.1, % 0.3 ve % 0.5'i kadar toz halde bulunan ampisilin (antibiyotik) eklenmiş ve karışım yaklaşık 1 saat süreyle magnetik karıştırıcıda karıştırılmış ve tekrar soğuması için buzdolabında

+4°C’de bekletilmiştir. Yüklenecek ampisilin miktarı belirlenirken süreli yayınlardan faydalanılarak polimer karışımı ağırlığının % 5’i (Sohrabi vd. 2013) kadar ampisilin eklenmiş fakat karışım içerisinde çökme meydana gelince eklenen miktarlar % 2 ve % 1’ e düşürülmüştür fakat bu seferde başlangıçta % 2 ve % 1 AMP içeren karışım içerisinde AMP çözünmesine rağmen, polimer çözeltisi buzdolabına soğuması için koyulduğunda çözelti içerisinde yine AMP çökmesi meydana gelince miktarlar iyice düşürülmüş ve % 0.1, % 0.3 ve % 0.5 olarak belirlenmiştir. Polimer çözeltileri ayrı ayrı 0.9 mm küt uçlu metal iğneli, 2.5 mL’lik plastik şırıngalara yüklenerek PCL-jelatin membranların üzerine eğirilmiştir. Farklı miktarlarda ampisilin içeren ve içermeyen çift tabakalı membranların üretiminde en uygun elektroğirme parametrelerini bulmak için etanollü ve etanolsüz polimer çözeltileri kullanarak farklı akış hızlarında (5, 6.5, 7, 10 µL/dk), farklı uzaklıklarda (15 cm ve 20 cm) ve farklı voltaj değerlerinde (18 kV ve 21 kV) deneyler yapılmıştır. En uygun elektroğirme parametreleri tüm membranlar için Etanol/PHEMA-PAA polimer karışımı (v/v) 2/1 oranında, 10µL/dk akış hızında, 20 cm uzaklıkta ve 21 kV voltaj değeri olarak belirlenmiştir.

### **3.6 PHEMA Nanofiber Membranların Üretiminde Yanıt Yüzey Yönteminin (RSM) Uygulanması**

Tez kapsamında yapılmış olan deneysel çalışmada üretilen poli-2-hidroksietil metakrilat (PHEMA) nanofiberlerin çaplarına elektroğirme parametrelerinin etkisini incelemek için RSM uygulanmıştır. Bölüm 3.5.1’de verilen homojen yapının elde edildiği parametre değerlerinden 10 µL/dk akış hızı ve 10 kV voltaj değeri merkez noktadaki akış hızı ve voltaj değerine eşit olacak şekilde, Etanol/PHEMA oranı ise merkez noktada 1.50 olacak şekilde Design Expert-6 yazılım programına alt sınır-üst sınır değerleri ve yanıtın (fiber çapı) minimum olması girilmiştir. Yöntemde bağımsız değişkenleri akış hızı, voltaj ve Etanol/PHEMA oranı oluşturmuştur. Yanıt (bağımlı değişken) fiber çapıdır. Bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Bağımsız değişkenlerin gerçek ve kodlanmış değerleri

Bağımsız Değişkenler		Kodlanmış		Gerçek	
Kodlanmış	Gerçek	Alt sınır	Üst sınır	Alt sınır	Üst sınır
$x_1$	Akış hızı ( $\mu\text{L}/\text{dk}$ )	-1	1	7	13
$x_2$	Voltaj (kV)	-1	1	8	12
$x_3$	Etanol/PHEMA oranı	-1	1	1	2

Design Expert-6 yazılımı kullanılarak üç bağımsız değişken için  $2^3$  faktöriyel merkezi bileşen tasarımı uygulanmıştır, yazılım tarafından önerilen deney programı çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 RSM deney programı

Deney Numarası	Akış Hızı ( $\mu\text{L}/\text{dk}$ )	Voltaj (kV)	Etanol/PHEMA oranı (v/v)	Fiber Çapı (nm)
1	13	12	2	
2	4.95	10	1.5	
3	10	10	1.5	
4	7	12	1	
5	10	10	1.5	
6	10	10	1.5	
7	13	8	1	
8	13	8	2	
9	10	10	0.66	
10	10	13.36	1.5	
11	10	10	1.5	
12	10	10	2.34	
13	10	10	1.5	
14	10	10	1.5	
15	13	12	1	
16	10	6.64	1.5	
17	7	8	2	
18	15	10	1.5	
19	7	8	1	
20	7	12	2	



## **3.7 Nanofiber Membranların Karakterizasyonu**

### **3.7.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi**

Üretilen tüm membranların ortalama fiber çapı-çap dağılımının ve membran morfolojilerinin belirlenmesi için SEM (Quanta 400F Field Emission, USA) analizi yapılmıştır. Matrisler SEM analizi öncesinde vakum altında altın-paladyum ile kaplanmıştır. Tüm membranların ortalama fiber çapı ve çap dağılımı için JMicroVision 1.2.7 programı kullanılarak SEM görüntülerinden ölçümler yapılmıştır. Ortalama fiber çapı SEM görüntülerinin farklı bölgeleri üzerinden en az 100 adet fiberin çapları ölçülerek hesaplanmıştır.

### **3.7.2 FTIR-ATR analizi**

Ampisilin yüklü ve boş haldeki çift tabakalı yara örtüsünün yüzey kimyasal yapılarının belirlenmesi için Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) spektrofotometresi (Bruker IFS 66/S, Almanya) kullanılmıştır. Ayrıca alt ve üst tabakanında ayrı ayrı FTIR-ATR analizi yapılmıştır. Bruker Opus 7.0 yazılım programı kullanılarak spektrumlar  $400-4000\text{ cm}^{-1}$  dalga frekansı aralığında kaydedilmiştir.

### **3.7.3 Şişme deneyleri**

Boş membran ve farklı miktarlarda ampisilin içeren membranların şişme davranışının belirlenmesi amacıyla şişme deneyleri yapılmıştır. Çalışmalar her bir membranın 3'er örneği ile farklı tampon çözeltilerinde (pH:6.5, pH:7.0, pH:7.4, pH:8.0, pH:8.5),  $37^{\circ}\text{C}$ 'de ve 30 rpm çalkalamalı koşullarda gerçekleştirilmiş ve membranlar maksimum su alımında yani ağırlıkları sabitlenince denge şişme ağırlıklarına ulaşmışlardır. Başlangıç anındaki (0. dk) kuru ağırlığı tartılan membranların, 5., 15., 30., 45., 60. dk sonunda farklı pH değerlerindeki PBS çözeltilerinin içerisinde çıkarılan membranlar havlu kağıt ile hafifçe nemi alınarak ıslak tartımları gerçekleştirilmiştir. Eşitlik 3.1 kullanılarak membranların % su içeriği hesaplanmıştır.

$$\text{Membranların \% su içeriği} = \frac{\text{yaş ağırlık} - \text{kuru ağırlık}}{\text{kuru ağırlık}} \times 100 \quad (3.1)$$

### 3.7.4 Mekanik dayanım testi

Mekanik özelliklerin tayininde kullanılan en yaygın test “çekme testi” (tensile test) dir. Nanofiber matrislerin gerilime karşı gösterdikleri direnç özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla; 100 N’luk yükleme hücresi donanımlı, Zwick malzeme test cihazı (Zwick Roell Z250, Almanya) kullanılarak örnekler analiz edilmiştir. Boş membranlarda 3 adet, AMP içeren membranlardan ise 4 adet kullanılmıştır. Membranların ortalama kalınlıkları yaklaşık boş olanlarda 163 µm, AMP içerenlerde yaklaşık 147 µm olup, 4 mm genişlikte ve 75 mm uzunluktaki boyutlarda kesilerek hazırlanmıştır. Piston başının örnekleri çekme hızı, dakikada 10 mm olacak şekilde ayarlanmış ve analiz oda koşullarında gerçekleştirilmiştir. Mekanik dayanım testi sonunda, boş ve ampisilin yüklü nanofiber matrislerin elastik modülleri, çekme mukavemeti ve çekme mukavemeti uzaması değerleri belirlenmiştir.

### 3.7.5 Biyobozunurluk çalışmaları

Biyobozunurluk çalışmaları boş ve farklı miktarlarda ampisilin yüklenmiş olan çift tabakalı membranlar ile 37°C’de, %0.1 (w/v) sodyum azid içeren 10 ml’lik PBS ortamında (pH=7.4) gerçekleştirilmiştir. Belirlenen sürelerde (7. gün, 14. gün) ortamdan uzaklaştırılan nanofiber membranlar damıtık su ile yapılan yıkamanın ardından liyofilizatörde (Christ, Germany) vakum altında kurutularak, SEM ile incelemeler yapılmıştır. Membranların ağırlık kaybı için başlangıç kuru ağırlığı ve bozunma sonrası kuru ağırlıkları ölçülerek Eşitlik 3.2 kullanılmış ve % ağırlık kaybı hesaplanmıştır.

$$\% \text{Ağırlık kaybı} = \frac{\text{başlangıç kuru ağırlığı} - \text{bozunma sonrası kuru ağırlık}}{\text{başlangıç kuru ağırlığı}} \times 100 \quad (3.2)$$

### 3.8. Çift Tabakalı Yara Örtüsünün Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal çalışma için öncelikle sıvı ve katı besi ortamları hazırlanmıştır. Katı besi ortamı hazırlanırken Tryptic Soy Agar adlı katı besi ortamından 8 gram ölçülerek erlende bulunan 200 ml saf su içerisine eklenip, karışım hafifçe çalkalanmıştır. Erlenin ağzı alüminyum folyo ile sıkıca sarılıp, otoklava koyularak sterilizasyonu sağlanmıştır. Otoklav cihazının sıcaklık göstergesi 75°C'nin altına düştüğünde karışım otoklavdan çıkarılmıştır. Otoklavdan alınır alınmaz hızlı bir şekilde 85 mm çapındaki steril petrilerin içerisine steril pipet ile 11.5 ml koyularak petrinin tabanına homojen bir şekilde yayılması sağlanmıştır. Petrilerde bulunan katı besi ortamları bir gece + 4°C'de buzdolabında bekletilmiştir.

Sıvı besi ortamı hazırlanırken Tryptic Soy Broth adlı sıvı besi ortamından 3 gram ölçülerek erlende bulunan 100 ml saf su içerisine eklenip, karışım hafifçe çalkalanmıştır. Erlenin ağzı tıpa ile sıkıca kapatılıp, alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra otoklava koyularak sterilizasyonu sağlanmıştır. Otoklav cihazının sıcaklık göstergesi 75°C'nin altına düştüğünde otoklavdan çıkarılıp sıvı besi ortamlarının soğumaya bırakılarak 25°C'ye gelmesi sağlanmıştır.

Mikroorganizmaların çoğaltılması için 25°C'deki erlenin içinde bulunan sıvı besi ortamlarına öze yardımıyla mikroorganizmalar eklendikten sonra çoğaltılması için 24 saat süreyle 37°C'deki etüvün içerisinde bekletilmiştir. Etüvden çıkarılan mikroorganizmaları içeren sıvı besi ortamından 300 mikrolitre çekilip katı besi ortamına damla damla eklenerek, petrinin içerisinde yayılması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan kapakları kapalı petriler 24 saat süreyle 37°C'de etüvde bekletilmiştir; böylelikle mikroorganizmaların çoğaltılması sağlanmıştır. 24 saat sonunda çoğaltılmış olan mikroorganizmalar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

Üretilen membranların antimikrobiyal etkinliğinin belirlenirken hazırlanan katı besi ortamları petrilerde homojen bir şekilde yayılması sağlandıktan hemen sonra bir önceki paragrafta anlatıldığı gibi mikroorganizmaların çoğaltıldığı sıvı besi ortamından bu kez 500 mikrolitre otomatik pipetle çekilerek, katı besi ortamına damla damla eklenip özeyle damlalar zigzaglar şeklinde dağıtılmıştır. 10 mm çaplı daire şeklindeki

antibiyotik içeren ve içermeyen membranlar UV ışığı altında üst ve alt yüzeyleri ayrı ayrı 20 dakika bekletilerek steril olmaları sağlanmıştır. Sterillenmiş membranlar 85 mm çapındaki petrilerin tam ortasına yerleştirilerek, kapakları kapatıldıktan sonra 37°C’de bir gün bekletilmiştir. Her bir örnekten paralel olarak 3’er deney yapılmıştır. Petrilerdeki bakteri derişimi yaklaşık  $10^5$  CFU/ml’dir. 24 saat sonra petrilerdeki membranların etrafında bakterilerin yok olduğu dairesel bölgelerin çapları (**D**) ölçülmüştür. Mikroorganizma olarak gram pozitif olan *Staphylococcus aureus*, gram negatif olan *Escherichia coli* kullanılmıştır. Böylece ampisilin yüklü membranların hangi bakteri türüne karşı daha duyarlı olduğu belirlenmiştir.

### 3.9 Çift Tabakalı Yara Örtüsünden Ampisilin Salımının İzlenmesi

Çift tabakalı nanofiber membranların *in-vitro* salım çalışmaları % 0.1 (w/v) sodyum azid içeren farklı tampon çözeltileri ortamında, 37°C’de ve 30 rpm çalkalamalı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Farklı pH değerlerinde fosfat tampon çözeltiler (PBS) hazırlanmak için öncelikle 1 M’lık NaOH ve HCl çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler kullanılarak, pH:5, pH:6.5, pH:7.0, pH:7.4, pH:8.0, pH:8.5 olan tampon çözeltileri elde edilmiştir. Çift tabakalı membranlar 10 mm çapında dairesel şekilde kesildikten sonra farklı pH değerlerindeki 10 ml’lik PBS çözeltilerinin bulunduğu tüplerin içerisine koyulmuştur. Salım deneyleri 21 gün sürmüştür. Salım ortamlarından 2., 24., 72., 120., 168., 240., 336., 504. saatlerde 3 ml’si kuvars küvete alınarak UV-görünür bölge spektrofotometresi (Scinco, S-3100, Kore) ile nicel ölçümler yapılmıştır. Kalan çözeltiliyede 3 ml taze PBS çözeltisi eklenmiştir. Öncelikle bu ölçümlerin hangi dalga boyunda yapılacağı belirlenmiştir. Bunun için bir miktar ampisilin 10 ml’lik PBS ortamında (pH:7.4) çözüldükten sonra kuvars küvete 3 ml’si alınarak UV-görünür bölge spektrofotometresi ile tarama yapılmıştır. Bu tarama sonucunda yaklaşık 220 nm ve 250 nm dalgaboyunda pikler elde edilmiştir (EK 1 Şekil 1). Salım ortamlarından alınan bazı örneklerle deneme yapılarak 220 nm, 240 nm ve 250 nm için absorbands değerleri okunmuş ve bu değerlere bakıldığında en uygun okumalar 250 nm için bulunmuştur. Bu nedenle salım ortamlarından alınan tüm örneklerin absorbands değerleri 250 nm dalga boyunda okunmuştur.

Kalibrasyon doğrusunu çizebilmek için 10 mg AMP, 1 ml PBS’de (pH: 7.4) ozdükten sonra çözeltilen 10 µL çekilerek 10 ml’lik PBS içerisine eklenmiş ve bu çözeltilen 5 ml alınarak, 3 ml’si kuvars küvete boşaltılıp absorbans okuması yapılmıştır. Geriye kalan 5 ml’lik çözeltinin üzerine 5 ml taze PBS özeltisi eklenmiş ve çözelti hacmi 10 ml’ye tamamlanmıştır. Yukarıda anlatılan işlem 3 kez tekrar edilerek çözeltilerin seyreltilmesi sağlanmış ve absorbans okumaları yapılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir (EK 1 Şekil 2). Gerekli hesaplamalarda bu grafiğ kullanılmıştır.

Farklı pH’lardaki tampon çözeltilerde kullanılmak üzere her bir membran çeşidi için ikişer örnek kullanılmıştır. Belirlenen sürelerde salım ortamlarından alınan örneklerin absorbans değerleri 250 nm’de okunmuştur. Sonuçlar değerlendirilerek kümülatif salım miktarları belirlenmiştir.

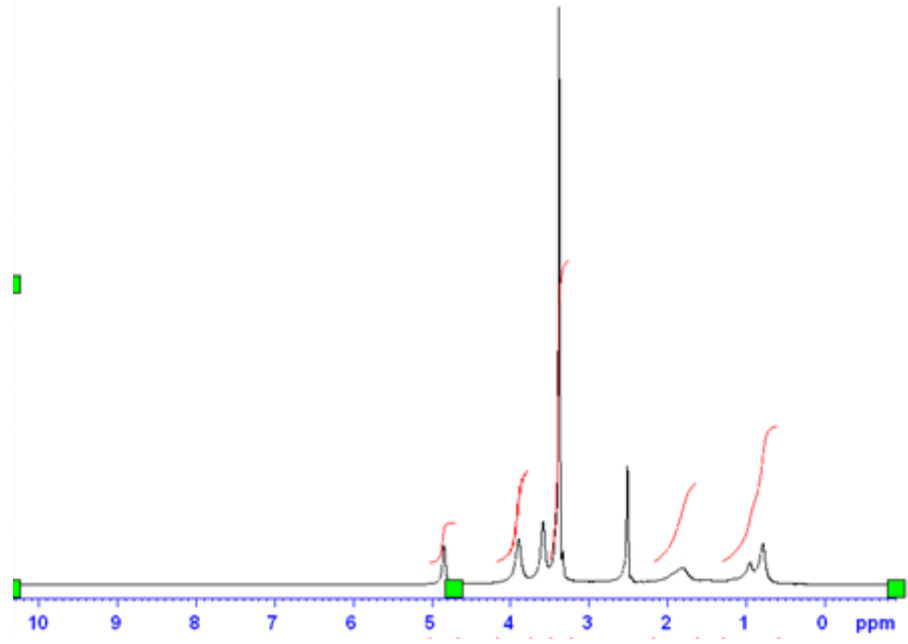
#### **4. BULGULAR ve TARTIŞMA**

Bu bölümde, deri doku mühendisliği uygulamalarında yara örtüsü olarak tasarlanmış çift tabakalı membranların üretimi için gerçekleştirilen deneysel çalışmaların sonuçları ve sonuçlar üzerinde yapılan tartışmalara yer verilmiştir.

Deneysel sonuçlarda öncelikle sentezlenen polimer örnekler için yapılan analiz sonuçları, daha sonra nanofiber membranların üretimi için gerçekleştirilen deneyler, yanıt yüzey yöntemi kullanılarak (RSM) yapılan optimizasyon çalışmaları, nanofiber membranların karakterizasyonu, yara örtüsünün antimikrobiyal etkinliğiyle ilgili sonuçlar, en son ise; in-vitro salım deneylerin sonuçları sunulmuştur.

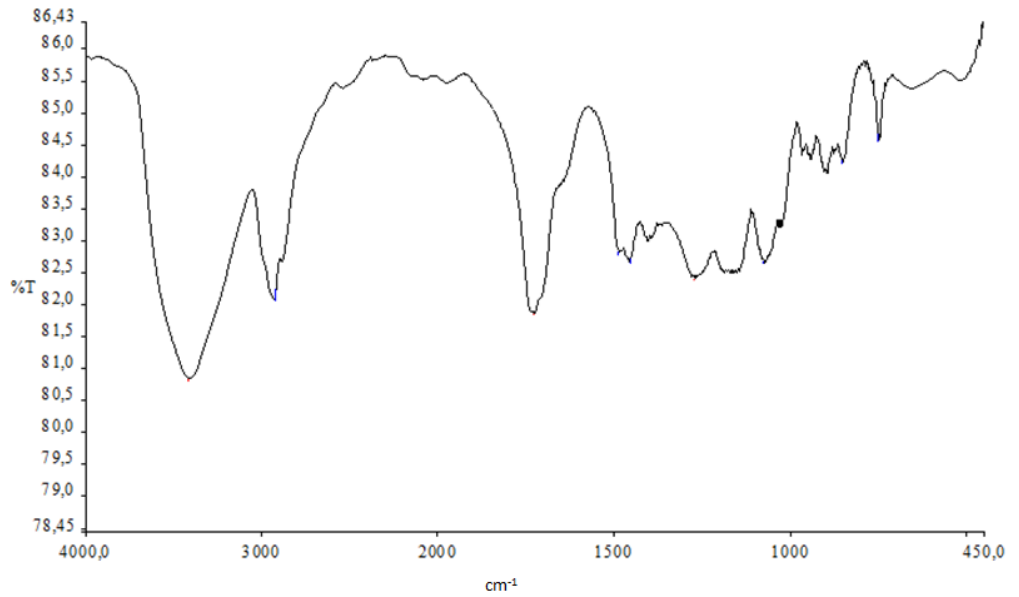
##### **4.1 Sentezlenen Polimer Örneklerinin <sup>1</sup>H-NMR ve FTIR Analizleri**

Biyoyumlu bir polimer olan PHEMA sahip olduğu özelliklerinden dolayı doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılmaktadır. Sunulan tez kapsamında elektroğirme tekniği kullanılarak PHEMA nanofiber matrislerin hazırlanabilmesi için PHEMA polimeri, HEMA monomerinin serbest radikalik polimerizasyonla oda sıcaklığında 24 saat süre sonunda sentezlenmiştir (Zhang vd. 2011). Sentezlenen PHEMA'nın proton-nükleer manyetik rezonans (<sup>1</sup>H-NMR) ve fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1 Sentezlenen PHEMA'nın  $^1\text{H-NMR}$  görüntüsü

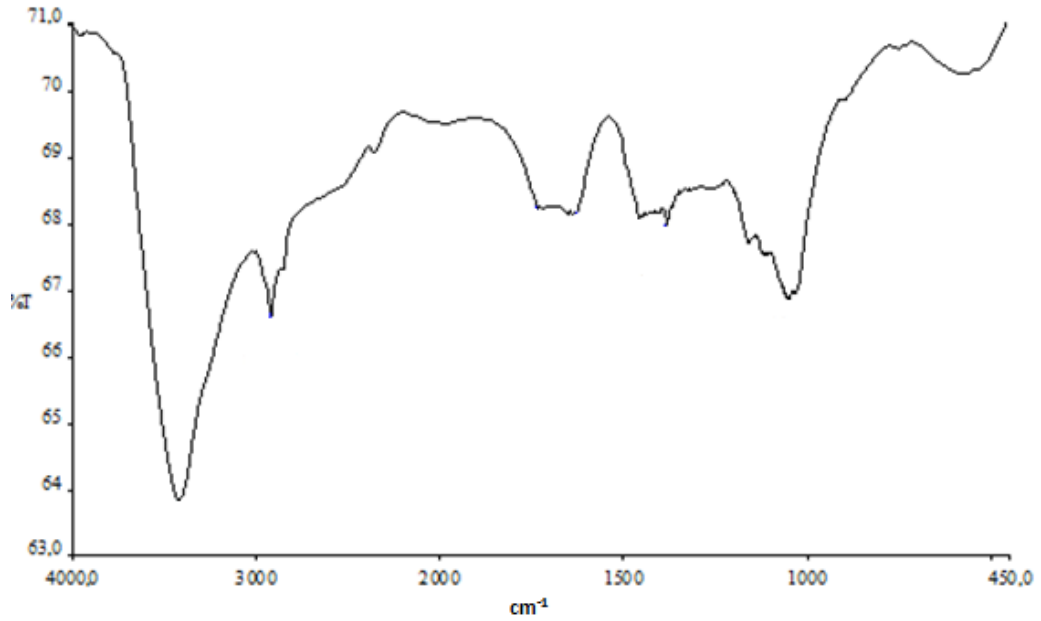
Şekil 4.1 incelendiğinde PHEMA'dan gelen hidroksil grubundaki proton 4.9 ppm, metilendeki protonlar ise 1.8, 3.6 ve 3.9 ppm, metil grubundaki protonlar ise 0.8 ppm'de karakteristik pikler çıkmıştır. Çözücü olarak dötero dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılmış ve içerisindeki metil grubuna ait protonlar 2.6 ppm'de, suyun içerisindeki protonlar ise 3.4 ppm'de gözükmektedir.



Şekil 4.2 Sentezlenen PHEMA'nın FTIR görüntüsü

Şekil 4.2 incelendiğinde PHEMA'ya ait karakteristik pikler eğride  $3419\text{ cm}^{-1}$ ,  $1727\text{ cm}^{-1}$ ,  $1638\text{ cm}^{-1}$  ve  $1161\text{ cm}^{-1}$ 'dir (Zhang 2011). Bu pikler sırasıyla PHEMA'nın yapısındaki  $-\text{OH}$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{C}=\text{C}$ ,  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  gruplarına ilişkindir. Her iki analizde PHEMA'nın başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.

Son yıllarda doku mühendisliği alanında pH ve sıcaklık duyarlı akıllı polimerler ön plana çıkmaktadır. Yapılan deneysel çalışmada pH duyarlı nanofiber membranlar üretmek amacıyla membranın yapısına akrilik asitin olması düşünülmüş ve bu nedenle öncelikle HEMA-AA'nın kopolimer sentezi yapılmıştır. Sentezlenen kopolimerin FTIR analizi (Şekil 4.3) yapılarak yapıda HEMA ve AA'nın bulunduğu belirlenmiştir. Şekil 4.3'de PHEMA'ya ait pikler şekil 4.2'deki gibi çıkmıştır. Kopolimerde AA varlığı AA'nın karakteristik piki olan karbonyl grubuna ( $\text{C}=\text{O}$ ) ait  $1690\text{ cm}^{-1}$  dalgaboyundaki piktir (Cárdenas vd. 2000). Kopolimerin başarılı bir şekilde sentezlenmesine karşın kopolimerden elde edilen fiberler çok sayıda boncuk içermesinden dolayı HEMA ve AA'dan homojen bir polimer karışımı hazırlanmıştır.

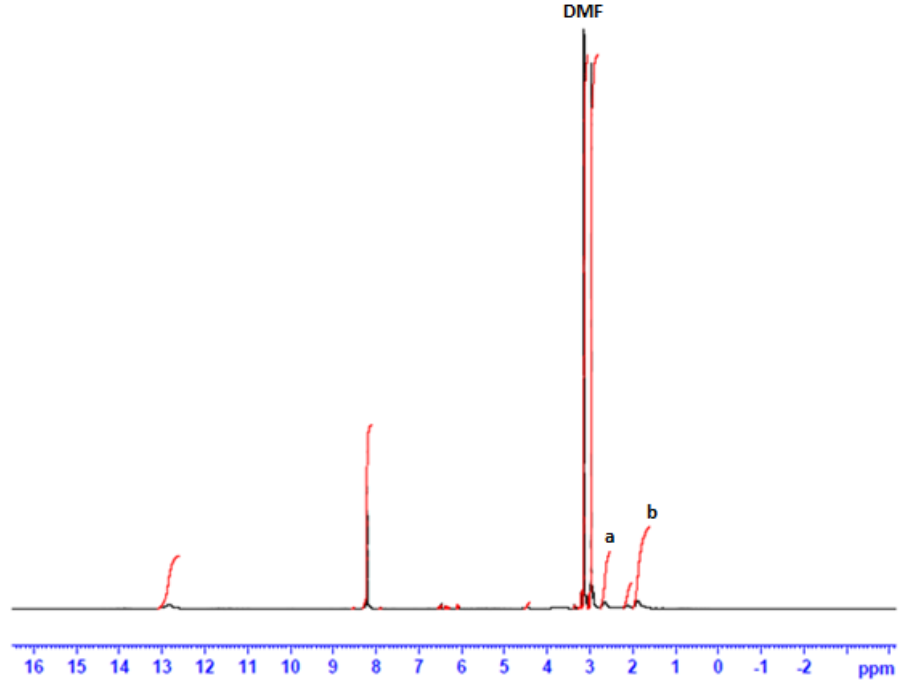


Şekil 4.3 Sentezlenen Poli(HEMA-ko-AA) FTIR görüntüsü

Polimer karışımının hazırlanmasında öncelikle PAA serbest radikalik polimerizasyon ile sentezlenmiştir. (Rivas vd. 1997). Sentezlenen PAA'nın şekil 4.4'de  $^1\text{H-NMR}$

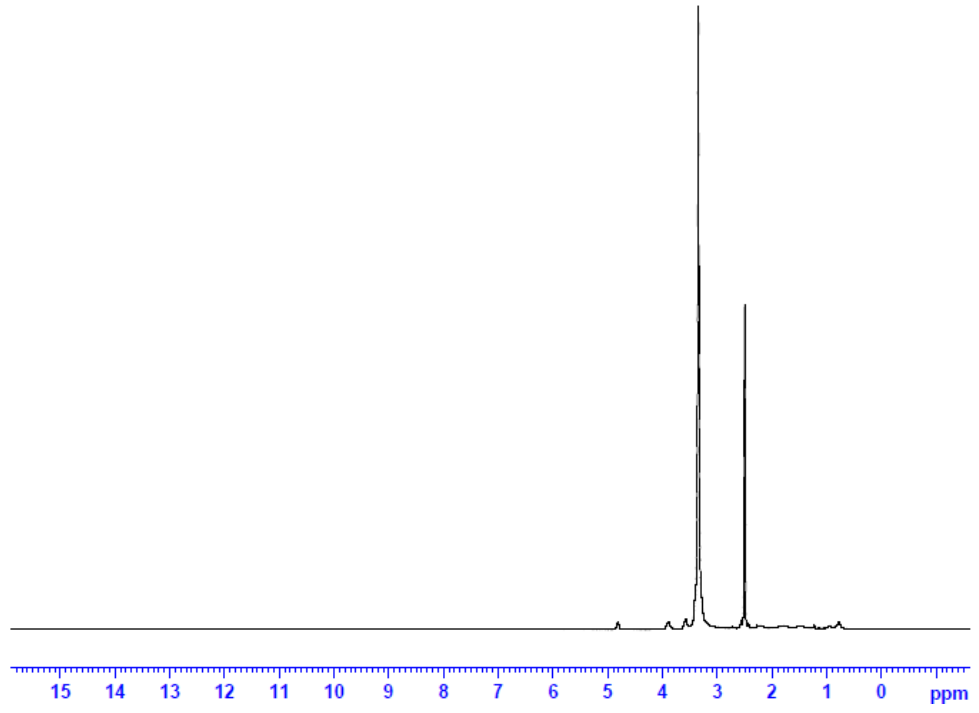


analizi verilmiştir. Şekil 4.4’de PAA’deki metilen grubuna ait protonlar a ve b şeklinde simgelenen spektrumlardır. DMF olarak simgelenen spektrum ise çözücü olarak kullanılan dötero dimetil formamide aittir. 4 ppm ile 14 ppm arasındaki pikler safsızlıklardan kaynaklanmaktadır.

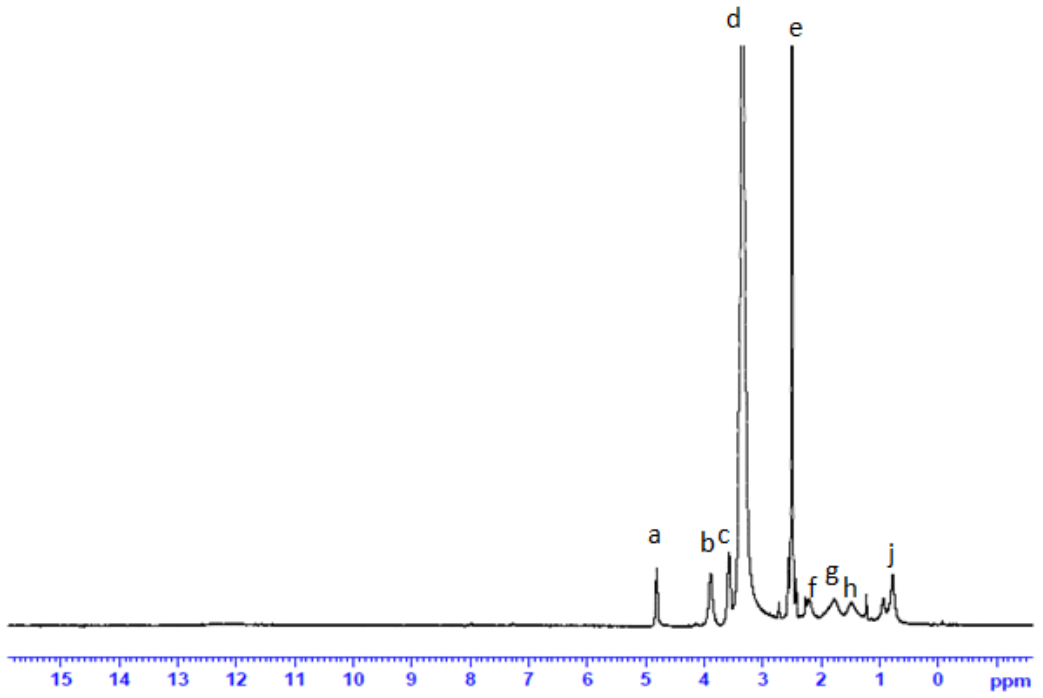


Şekil 4.4 Sentezlenen PAA’nın  $^1\text{H-NMR}$  görüntüsü

PAA’yı sentezledikten sonra sentezlenen PHEMA ile 1/3 oranında (PAA/PHEMA, v/v) karıştırılarak polimer karışımı elde edilmiş ve  $^1\text{H-NMR}$  analizi yapılmıştır. Şekil 4.1 ve şekil 4.4’deki PHEMA ve PAA ait olan pikler şekil 4.5’de de çıkmıştır. Piklerin daha iyi görülebilmesi için spektrumlar büyütülerek şekil 4.6 elde edilmiştir.



Şekil 4.5 Sentezlenen PHEMA-PAA polimer karışımının  $^1\text{H-NMR}$  görüntüsü



Şekil 4.6 Sentezlenen PHEMA-PAA polimer karışımının  $^1\text{H-NMR}$  görüntüsü büyütülmüş spektrumlar

Şekil 4.6’da verilen  $^1\text{H-NMR}$  analizine göre homojen karışımın yapısında PHEMA ve PAA olduğu belirlenmiştir. PHEMA’nın yapısında bulunan gruplara ait protonlar -OH:a,  $-\text{CH}_2$ :b,c,g,  $-\text{CH}_3$ :j olacak şekilde, PAA’nın yapısında bulunan metilen grubundan( $-\text{CH}_2$ ) gelen protonlar ise f ve h ile simgelenmiştir. Çözücü olarak dötero DMSO kullanılmıştır içerisindeki metil grubundan gelen protonlar e piki olarak gösterilmiştir. Sudan gelen protonlara ait pik ise d’dir.

#### **4.2 Nanofiber Membranların Üretimi**

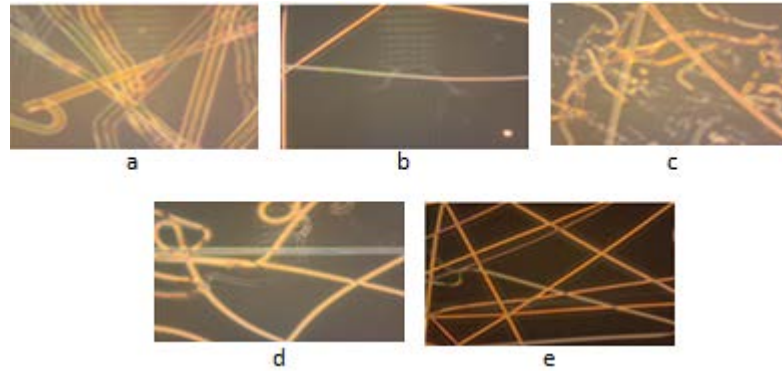
Son yıllarda ilaç salım ve doku mühendisliği uygulamaları için elektroğirme yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem ile nanometre boyutunda fiber üretimi gerçekleştirilmektedir. Elektroğirme yöntemiyle mikro ve nano boyutta yüksek gözenekli, doğal hücre dışı matrisi(extracellular matrix, ECM) taklit edebilecek iskelelerin hazırlanmasını sağlamaktadır. Elektroğirilmiş iskeleler geniş yüzey alanı/hacim oranına sahip olmaları nedeniyle hücre ekimi, ilaç yüklemesi ve kütle transferi gibi özellikleri arttırılabilir. Biyobozunur, biyobozunmaz ve doğal pek çok madde elektroğirilebilir (Sill ve Recum 2008).

Örgülü-örgüsüz tek, iki ve üç boyutlu doku iskeleleri bu yöntemle hazırlanabilmektedir. Bu iskelelerin hazırlanmasında kullanılan polimer çözeltisinin derişimi, viskozitesi ve elektroğirme parametreleri olan akış hızı,voltaj ve toplayıcı uzaklığının fiber yapısını önemli derecede etkilediği yapılan araştırmalarla belirlenmiştir (Sill ve Recum 2008, Zhang vd. 2011).

Tez çalışmasında hem PHEMA nanofiber membranların eldesinde hem de çift tabakalı yara örtüsünün üretiminde akış hızı ve voltaja göre polimer derişiminin fiber çapını önemli derecede etkilediği belirlenmiştir. Tüm membranların üretiminde şekil 3.1’deki düzenek kullanılmıştır.

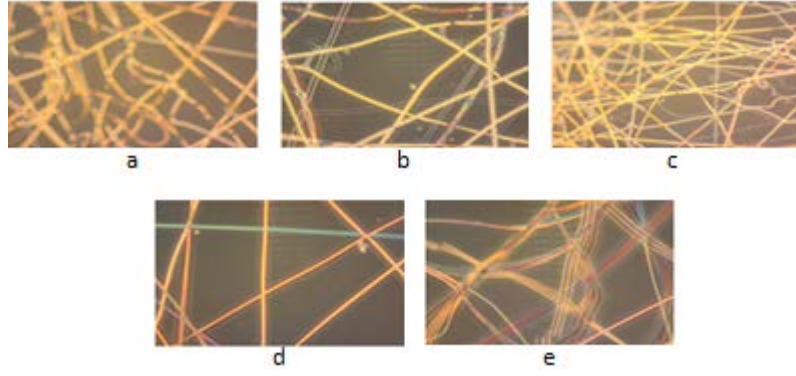
#### 4.2.1 PHEMA nanofiber membranların üretimi

Bölüm 3.2’de anlatıldığı gibi hazırlanan PHEMA polimer çözeltisi kullanılarak elektroğirme işlemleri gerçekleştirilmiştir. PHEMA nanofiber membranların üretiminde polimer çözeltisinin sıcaklığı, derişimi, akış hızı ve voltajın fiberler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Öncelikle polimer çözeltisi sıcaklığının fiber oluşumunda etkisine bakılmıştır. Her bir parametre için ayrı ayrı deneyler yapılmış ve optik mikroskop görüntüleri alınmıştır. 25°C’de sabit sıcaklıkta polimerizasyonun gerçekleşmesinden sonra elde edilen PHEMA polimer çözeltisinin hacimce yarısı alınarak şırıngaya beslenmiş ve oda sıcaklığında elektroğirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında (25°C) olan polimer çözeltisinden elde edilen yapıların optik mikroskop görüntüleri şekil 4.7 ve şekil 4.8’de verilmiştir. Görüntüler incelediğinde bazı koşullarda fiberlerin oluşmadığı ve oluşan fiberlerde ise homojen olmayan yapı ve sarmalanmadan dolayı polimer çözeltisinin kalan diğer yarısı buzdolabında +4°C’ye gelene kadar bekletilerek polimer çözeltisinin daha viskoz olması sağlanmıştır. Soğuyan çözelti eğirmek üzere şırıngaya beslenmiştir. Elde edilen fiberlerin optik mikroskop görüntüleri şekil 4.9 ve şekil 4.10’da verilmiştir. Görüntüler incelediğinde fiberlerde kopma ve boncuk olmadığı gözlenmiştir. Yeterli viskoziteye sahip çözeltilerde sürekli bir çözelti jeti oluşması boncuk oluşmasını engeller (Buchko vd. 1999). Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda PHEMA polimeri sentezlendikten sonra eğirmek üzere +4°C’ye gelene kadar buzdolabında bekletilmiştir.



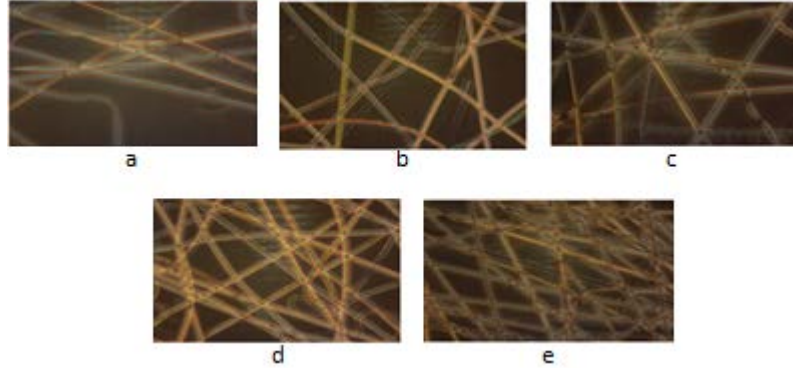
Şekil 4.7 25°C olan PHEMA’den elde edilen fiberlerin optik mikroskop görüntüleri 3.8µL/dk, 15 cm

a. 24 kV, b. 20kV, c. 18 kV, d. 15 kV, e. 10 kV



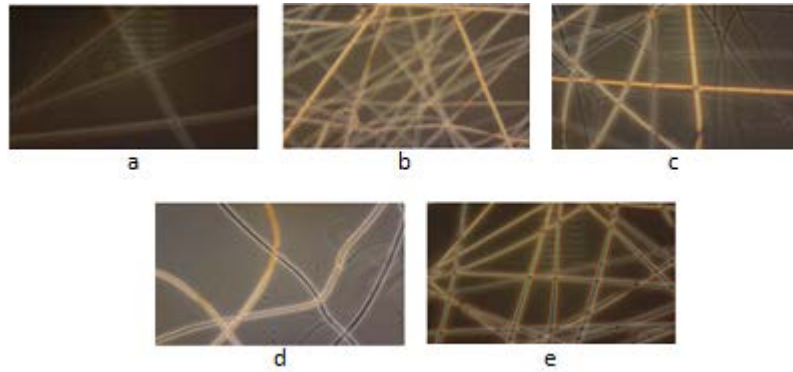
Şekil 4.8 25°C olan PHEMA'dan elde edilen fiberlerin optik mikroskop görüntüleri  
10  $\mu$ L/dk, 15 cm

a. 24 kV, b. 20kV, c. 18 kV, d. 15 kV, e. 10 kV



Şekil 4.9 +4°C olan PHEMA'dan elde edilen fiberlerin optik mikroskop görüntüleri  
3.8  $\mu$ L/dk, 15 cm

a. 24 kV, b. 20kV, c. 18 kV, d. 15 kV, e. 10 kV



Şekil 4.10 +4°C olan PHEMA'dan elde edilen fiberlerin optik mikroskop görüntüleri  
10  $\mu$ L/dk, 15 cm

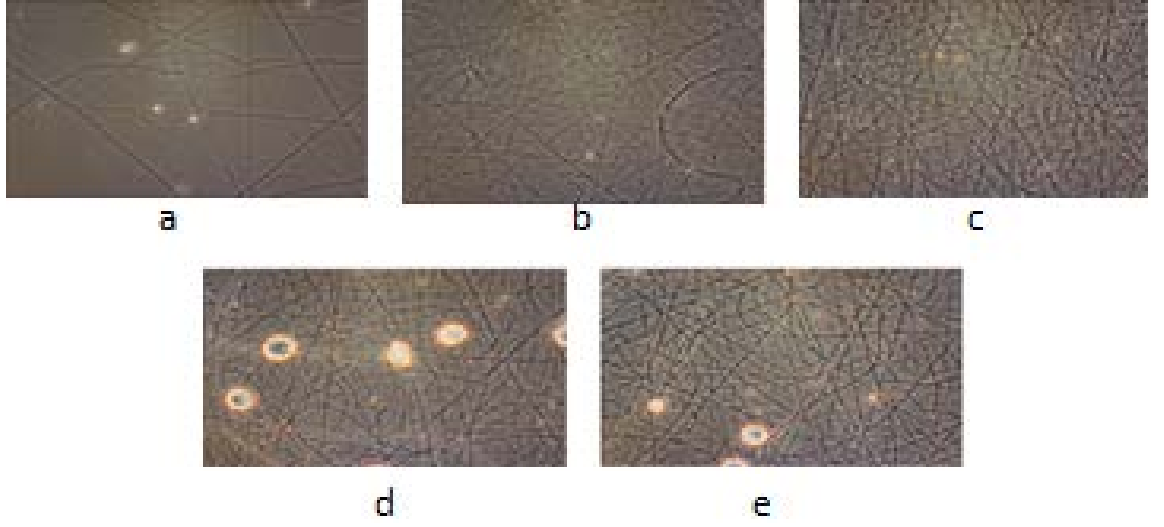
a. 24 kV, b. 20kV, c. 18 kV, d. 15 kV, e. 10 kV

Sunulan çalışmada PHEMA'dan fiber üretiminde Zhang ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış olduğu çalışma referans alınmıştır. Bu çalışmada fiber üretimi için en uygun elektroğirme parametreleri, akış hızı için 3.8µl/dk, voltaj için 18 kV, şırınga iğnesi ucu ile toplama paneli arasındaki uzaklık 15 cm ve Etanol/PHEMA (v/v) oranı için 2.67/1.33 olarak belirlemişlerdir. Yapılan deneylerde bu parametreler göz önünde bulundurularak farklı parametreler denenmiştir (Çizelge 4.1). Şırınga iğnesi ucu ile toplama paneli arasındaki uzaklık 15 cm sabit değerde tutulmuş ve çizelge 4.1'de verilen parametreler kullanılarak elektroğirme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Her bir parametre için ayrı ayrı deneyler yapılarak optik mikroskop görüntüleri alınmıştır. Elde edilen fiberlerin önce optik mikroskop görüntülerine bakılmış fiber görüntülerinde boncuk oluşumuna, fiberlerin yapısının homojen halde olmasına ve sarmalanmalara dikkat edilerek parametreler değiştirilmiştir. Daha sonra seçilen en iyi görüntüler için SEM örnekleri hazırlanmıştır.

Çizelge 4.1 PHEMA nanofiberlerin üretiminde kullanılan elektroğirme parametreleri

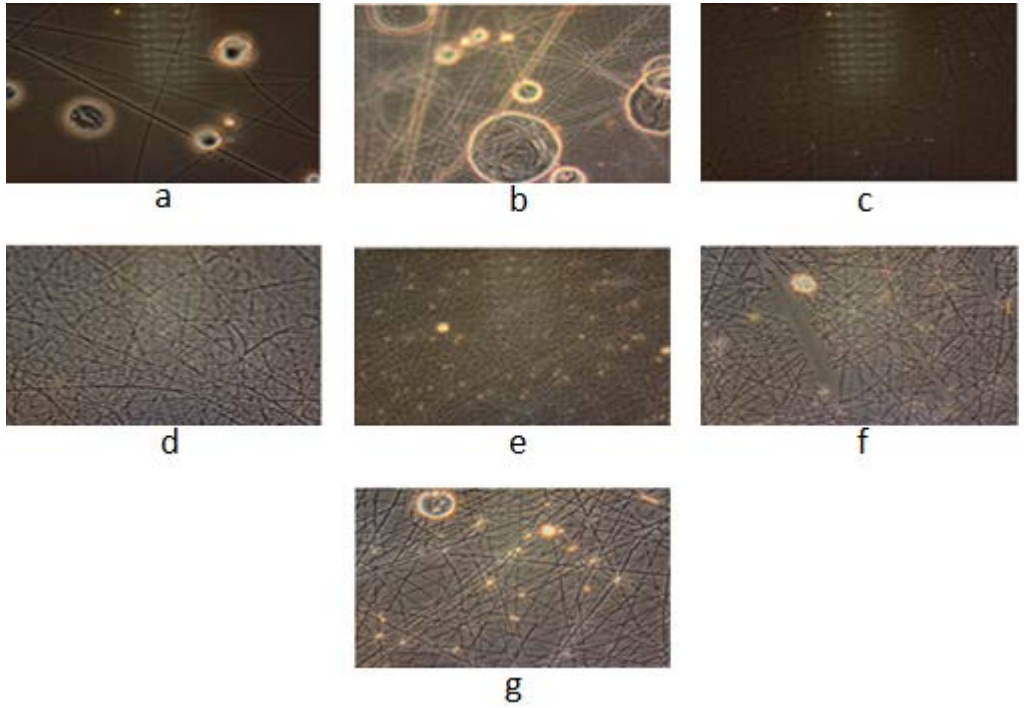
<b>Akış hızı (µl/dk)</b>	3.5-3.8-7-10-20-40-80
<b>Voltaj (kV)</b>	10-15-18-20
<b>Etanol/PHEMA (v/v)</b>	2/1
<b>Şırınga iğnesi ucu-toplama paneli arasındaki uzaklık 15 cm</b>	

Şekil 4.11, 4.12, 4.13, 4.14 incelendiğinde 20, 18, 15 ve 10 kV değerlerinde boncuk olmayan, fiberlerin en iyi yapıda olduğu akış hızı 10 µL/dk'dır. Ayrıca tüm akış hızlarında boncuk içermeyen tek voltajın ise 10 kV olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14). Literatürde ise en uygun akış hızı 3.8 µL/dk ve en uygun voltaj ise 18 kV seçilmiştir (Zhang vd. 2011). Tez kapsamında yapılan çalışmada literatürdeki bu parametreler denenerek şekil 4.12 (b) görüntüsü elde edilmiş ve bu görüntüde büyük ve çok sayıda boncukların oluşumuna rastlanmıştır.



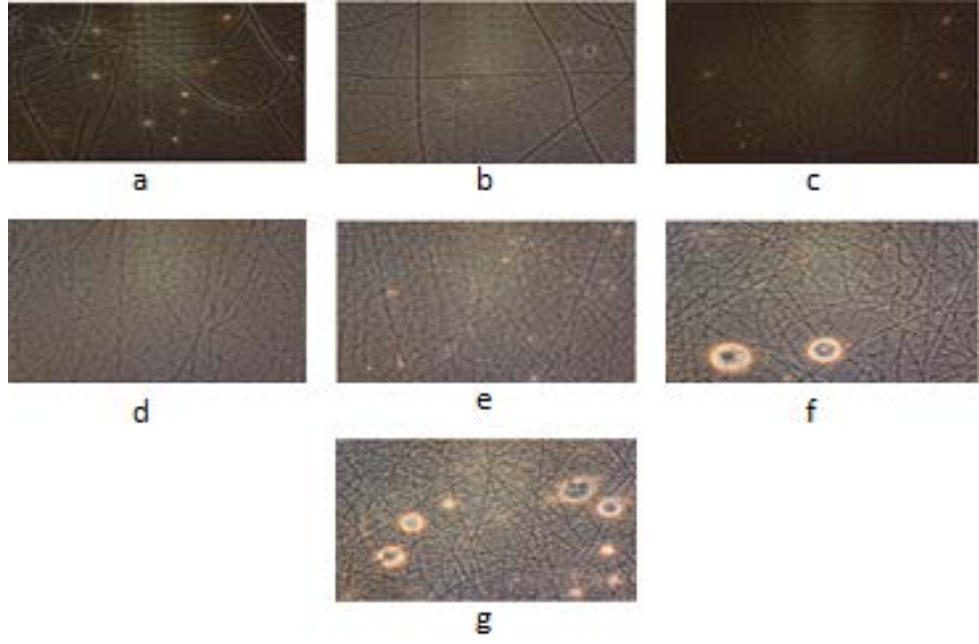
Şekil 4.11 PHEMA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, Etanol/PHEMA (v/v) : 2/1, 20 kV

a. 3.8 $\mu$ L/dk, b. 10 $\mu$ L/dk, c. 20 $\mu$ L/dk, d. 40  $\mu$ L/dk, e. 80  $\mu$ L/dk



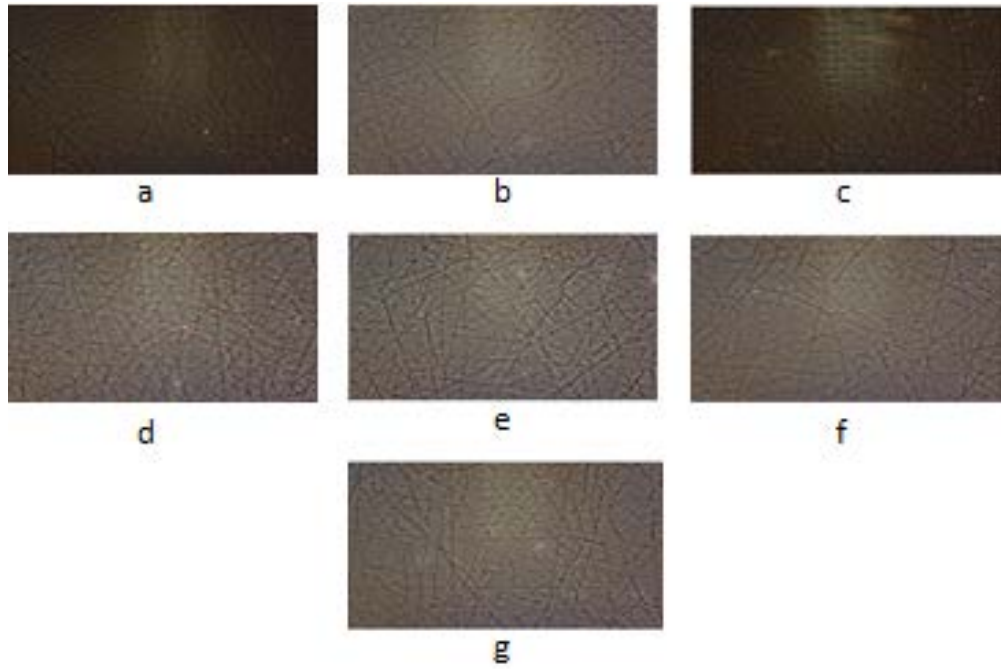
Şekil 4.12 PHEMA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, Etanol/PHEMA (v/v) : 2/1, 18 kV

a.3.5 $\mu$ L/dk, b. 3.8 $\mu$ L/dk, c. 7 $\mu$ L/dk, d. 10  $\mu$ L/dk, e. 20  $\mu$ L/dk, f. 40  $\mu$ L/dk, g. 80 $\mu$ L/dk



Şekil 4.13 PHEMA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, Etanol/PHEMA (v/v) : 2/1, 15 kV

a. 3.5μL/dk, b. 3.8μL/dk, c. 7μL/dk, d. 10 μL/dk, e. 20 μL/dk, f. 40 μL/dk, g. 80μL/dk



Şekil 4.14 PHEMA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, Etanol/PHEMA (v/v) : 2/1, 10 kV

a. 3.5μL/dk, b. 3.8μL/dk, c. 7μL/dk, d. 10 μL/dk, e. 20 μL/dk, f. 40 μL/dk, g. 80μL/dk



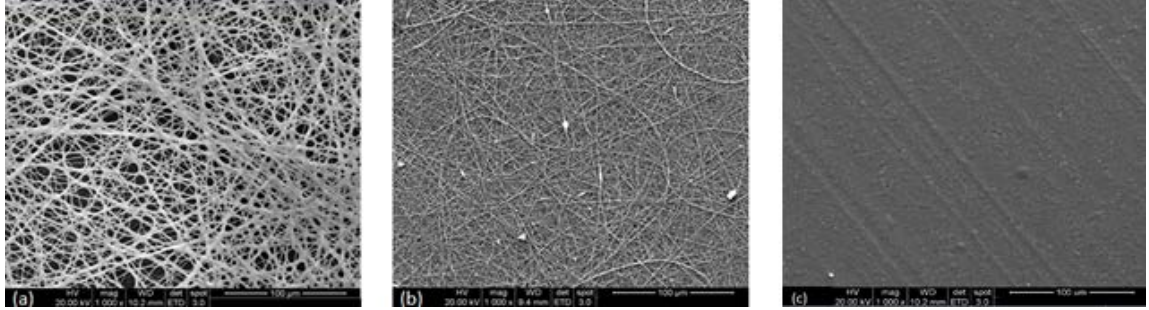
Polimer çözeltisinin derişimi elektroğirmeyi etkileyen parametreler arasındadır (Sill ve Recum 2008). %66.3'lük etanol çözeltisi PHEMA polimer çözeltisine eklendiğinde çözelti daha seyreltik olacağı için viskozite azalır. Belli bir değere kadar viskozite azaldıkça, fiber çapı azalır (Zhang vd. 2011). Bu nedenle farklı polimer derişimlerinde deneyler yapılmıştır (Çizelge 4.2). Literatürde en uygun akışın 3.8  $\mu\text{L}/\text{dk}$  olmasından dolayı bu akış hızı için farklı polimer derişimlerinde 10 kV voltaj değerinde elektroğirme deneyleri yapılmış ve matrislerin SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.15'da verilen SEM görüntülerinde polimer çözeltisine etanol eklenmediğinde ortalama fiber çapının  $2481.3 \pm 470.6$  nm olarak hesaplanmıştır. Etanol/PHEMA (v/v) oranı :1/1 iken ortalama fiber çapı  $484.9 \pm 150.1$  nm bulunmuştur. Bu oran 3/1 olduğunda ise fiberlerin oluşmamiş olması da literatürle uyumludur (Zhang vd. 2011). SEM analizlerine göre polimer çözeltisine eklenen etanol miktarının fiber çapları üzerinde etkili bir parametre olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.2 Etanolün ve PHEMA'nın şırıngaya besleme oranları ve PHEMA fiberlerin ortalama fiber çapları

Etanol, ml	PHEMA, ml	Fiber Çapları, nm	SEM görüntüleri
0	2	$2481.3 \pm 470.6$	Şekil 4.15.a
1	1	$484.9 \pm 150.1$	Şekil 4.15.b
2	1	$98.6 \pm 15.6$	Şekil 4.16
3	1	fiber oluşumu gözlenmedi	Şekil 4.15.c

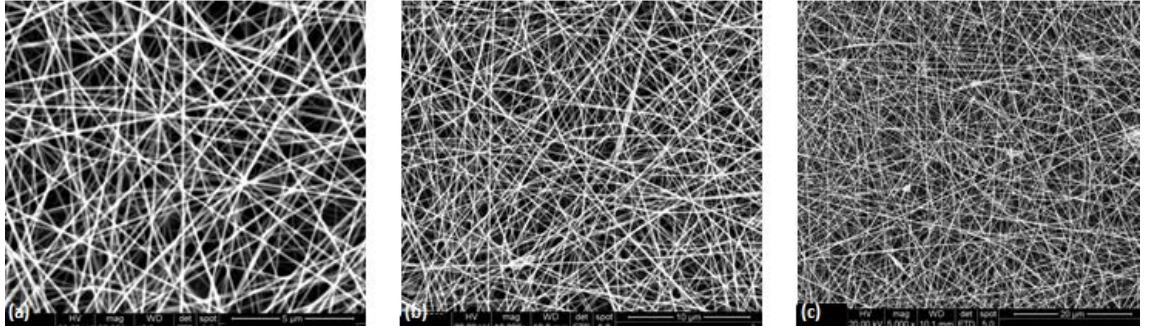
Etanol/PHEMA (v/v) oranı: 2/1 iken optik mikroskop görüntülerine bakıldıktan sonra 10  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızı ve 10 kV voltaj için nanofiber matrislerin SEM analizleri yapılmış (Şekil 4.16) ve ortalama fiber çapı  $98.6 \pm 15.6$  nm olarak bulunmuştur. Literatürle (Zhang vd. 2011) karşılaştırıldığında fiber çapları daha küçük çıkmıştır. PHEMA nanofiber yapıdaki membranların üretimi için yapılan elektroğirme deneyleri sonucunda en uygun koşul literatürden farklı olarak Etanol/PHEMA (v/v) : 2/1

oranında, 10 µL/dk akış hızında, 15 cm uzaklıkta (şırınga iğnesi ucu-toplama paneli) ve 10 kV voltaj değerinde bulunmuştur.



Şekil 4.15 PHEMA nanofiber membranların SEM görüntüsü, 3.8µL/dk, 15 cm, 10 kV

Etanol/PHEMA (v/v): a. saf PHEMA çözeltisi, b. 1/1, c. 1/3 (Büyültme oranı: 1000X)



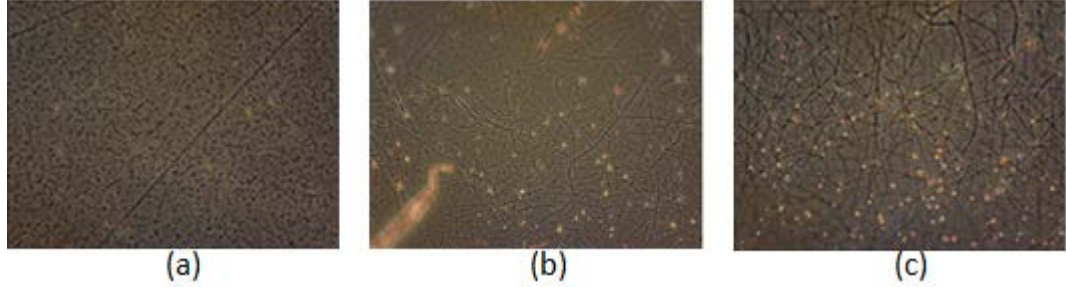
Şekil 4.16 PHEMA nanofiber membranların SEM görüntüsü, 10µL/dk, 15 cm, 10 kV

Etanol/PHEMA (v/v):2/1, büyültme oranları: a.  $2 \times 10^4$ , b.  $1 \times 10^4$ , c.  $5 \times 10^3$

#### 4.2.2 Poli (HEMA-ko-AA) nanofiber membranların üretimi

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi farklı oranlarda monomerler içerecek şekilde sentezlenen kopolimer çözeltileri şırıngalara beslenerek elektroçirime deneyleri yapılmıştır. Elde edilen yapıların optik mikroskop görüntülerine bakıldığında AA/HEMA (v/v) oranı 0.2 iken fiberlerin oluşmadığı, bu oran 0.3 ve 0.4 olduğunda ise elde edilen fiberlerde kopmalar olduğu ve çok sayıda boncuk içerdiği belirlenmiştir (Şekil 4.17). Bu nedenle kopolimer sentezinde süreli yayınlara bakılarak (Krupers vd. 1996, Ende ve Peppas 1996, Zecheru vd. 2007) farklı yöntemler denenmiş; ancak bu kezde elde edilen

yapışkan yapıda olan kopolimerin çözünmesinde problem yaşanmıştır. Tüm bu nedenlerden dolayı polimer karışımının hazırlanmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.17 Poli(HEMA-ko-AA) fiberlerin optik mikroskop görüntüleri, 10  $\mu$ L/dk, 15 cm, 18 kV

Monomer oranları (AA/HEMA, (v/v)): a. 0.2, b. 0.3, c. 0.4

#### 4.2.3 PHEMA-PAA nanofiber membranların üretimi

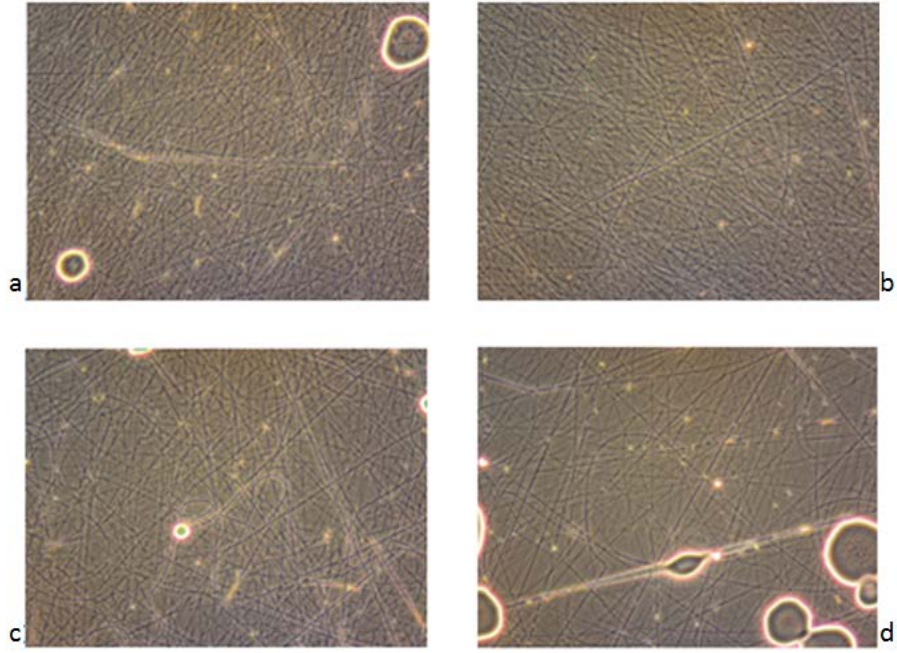
pH duyarlı membranlar üretmek amacıyla polimer karışımı hazırlanırken poliakrilik asit (PAA) kullanılmıştır. Polimer karışımı bölüm 3.4'te anlatıldığı gibi hazırlanarak şırıngaya beslenmiş ve yüksek voltaj sayesinde jet oluşmaya başlayarak fiberler toplama paneline toplanmıştır. Şırınga iğnesi ucu-toplama paneli arasındaki uzaklık 15 cm değerinde sabit tutularak çizelge 4.3'de verilen parametrelerde deneyler yapılarak polimer karışımından nanofiber üretiminde en uygun koşulların belirlenmesi için elektroegirme deneyleri tamamlanmıştır.

Çizelge 4.3 PHEMA-PAA nanofiberlerin elektroegirme parametreleri

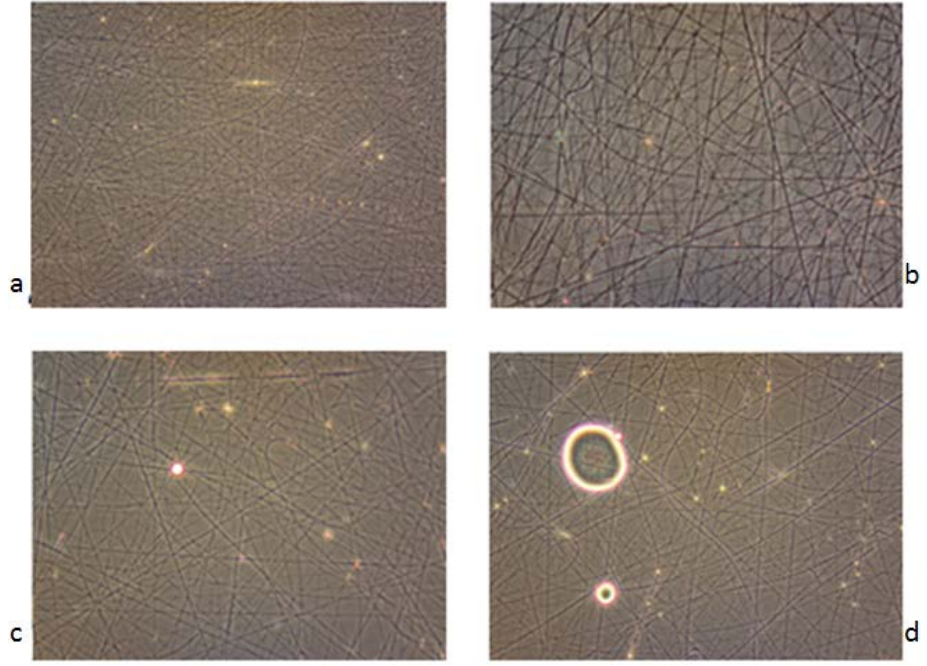
<b>Akış hızı (<math>\mu</math>l/dk)</b>	10-7.5-5-3.8
<b>Voltaj (kV)</b>	15-18-20-25
<b>Şırınga iğnesi ucu-toplama paneli arasındaki uzaklık 15 cm</b>	

Çizelge 4.3'de verilen parametreler kullanılarak üretilen fiberlerin öncelikle optik mikroskop görüntüleri alınmıştır. Bu görüntülerle boncuk oluşuma ve fiberlerin yapılarına bakıldıktan sonra en iyi görüntülerin elde edildiği parametrelerde membranlar

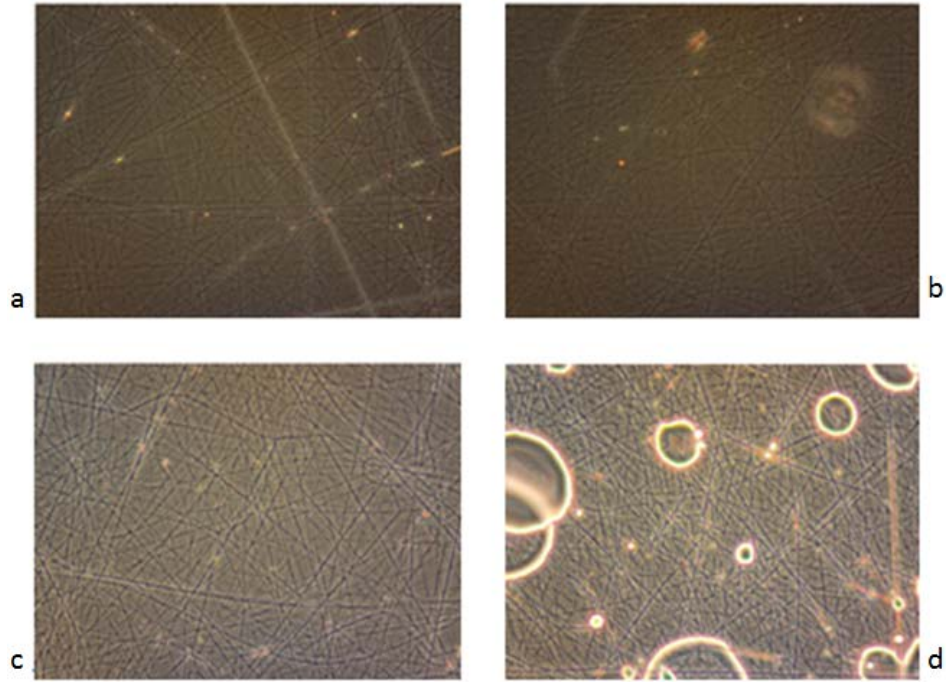
üretip SEM analizleri yapılmıştır. Şekil 4.18 - 4.21’de verilen optik görüntülerde tüm akış hızlarında optimum azlıkta boncuk olan voltaj değerleri 18 kV ve 20 kV’dir. Ayrıca 25 kV voltaj değerinde tüm akış hızlarında boncuk oluşumu gözlenmiştir. Akış hızı azaldıkça boncuk oluşumunda azalma görülmektedir. 18 ve 20 kV değerlerinde görüntüler daha iyi olduğu için bu parametrelerde üretilen membranların SEM analizi yapılmıştır.



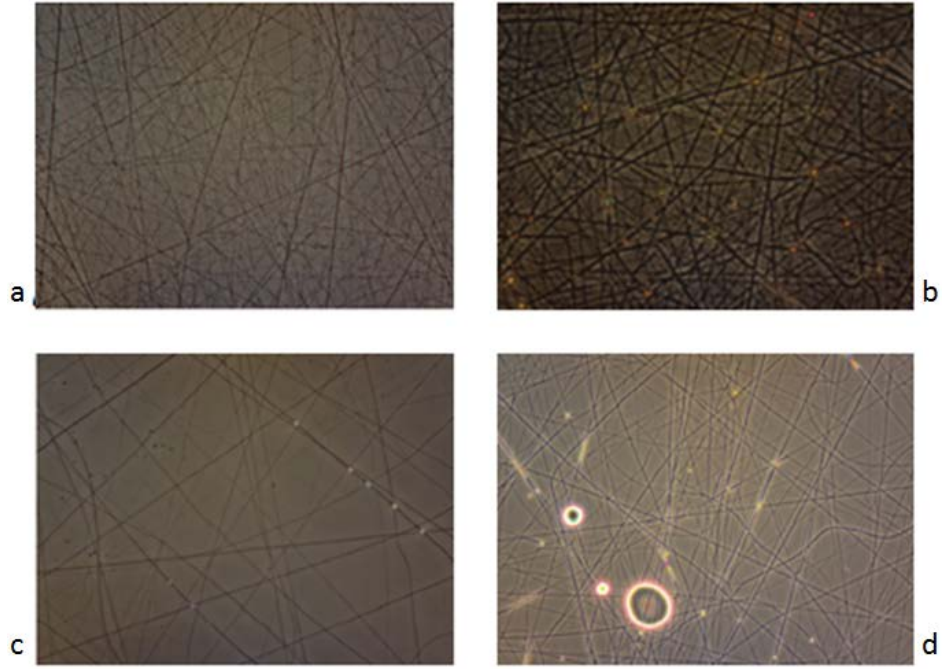
Şekil 4.18 PHEMA-PAA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, 10  $\mu$ L/dk  
a.15 kV, b.18 kV, c. 20 kV, d. 25 kV



Şekil 4.19 PHEMA-PAA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, 7.5  $\mu\text{L}/\text{dk}$   
a.15 kV, b.18 kV, c. 20 kV, d. 25 kV

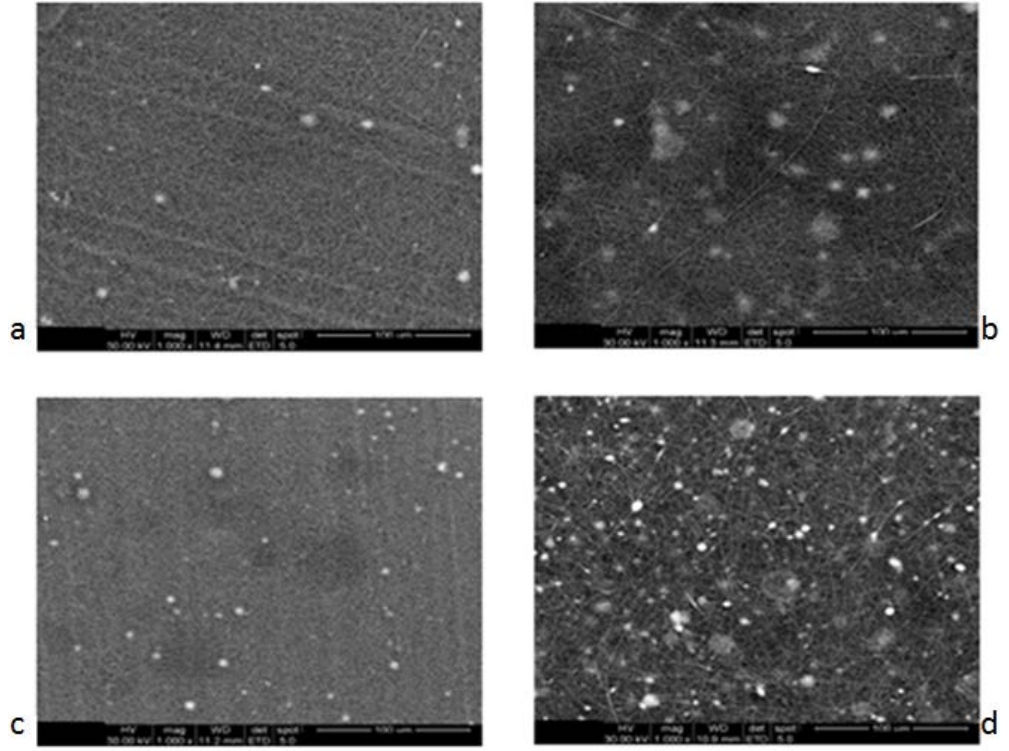


Şekil 4.20 PHEMA-PAA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, 5  $\mu\text{L}/\text{dk}$   
a.15 kV, b.18 kV, c. 20 kV, d. 25 kV



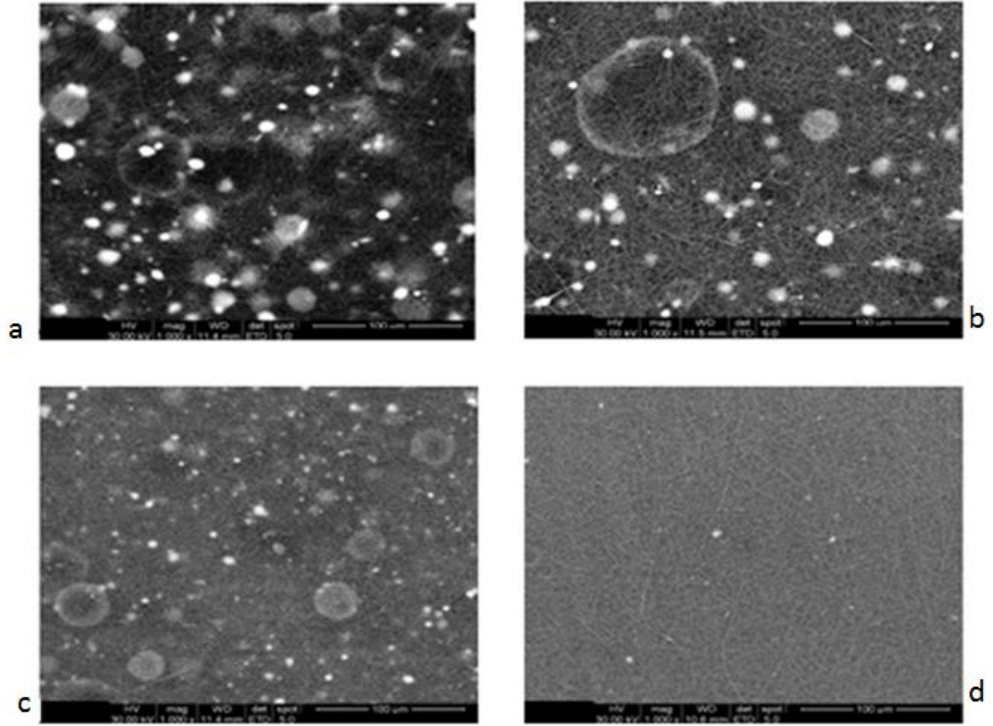
Şekil 4.21 PHEMA-PAA nanofiberlerin optik mikroskop görüntüleri, 3.8  $\mu\text{L}/\text{dk}$   
a.15 kV, b.18 kV, c. 20 kV, d. 25 kV

Şekil 4.22’de verilen SEM görüntülerinde 20 kV voltaj değerinde tüm akış hızları için boncuk oluşumu vardır. Voltaj değeri 18 kV düşürüldüğünde 5  $\mu\text{L}/\text{dk}$  dışında diğer tüm akış hızlarında oldukça fazla ve büyük boncukların oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 4.23). Bu nedenle PHEMA-PAA nanofiber membranların üretiminde en uygun koşul 5  $\mu\text{L}/\text{dk}$ , 15 cm ve 18 kV olarak seçilmiştir (Şekil 4.24). Ayrıca tüm bu SEM görüntülerinden ortalama fiber çapları hesaplanarak çizelge 4.4’de verilmiştir. En küçük çap seçilen koşul için bulunmuştur.



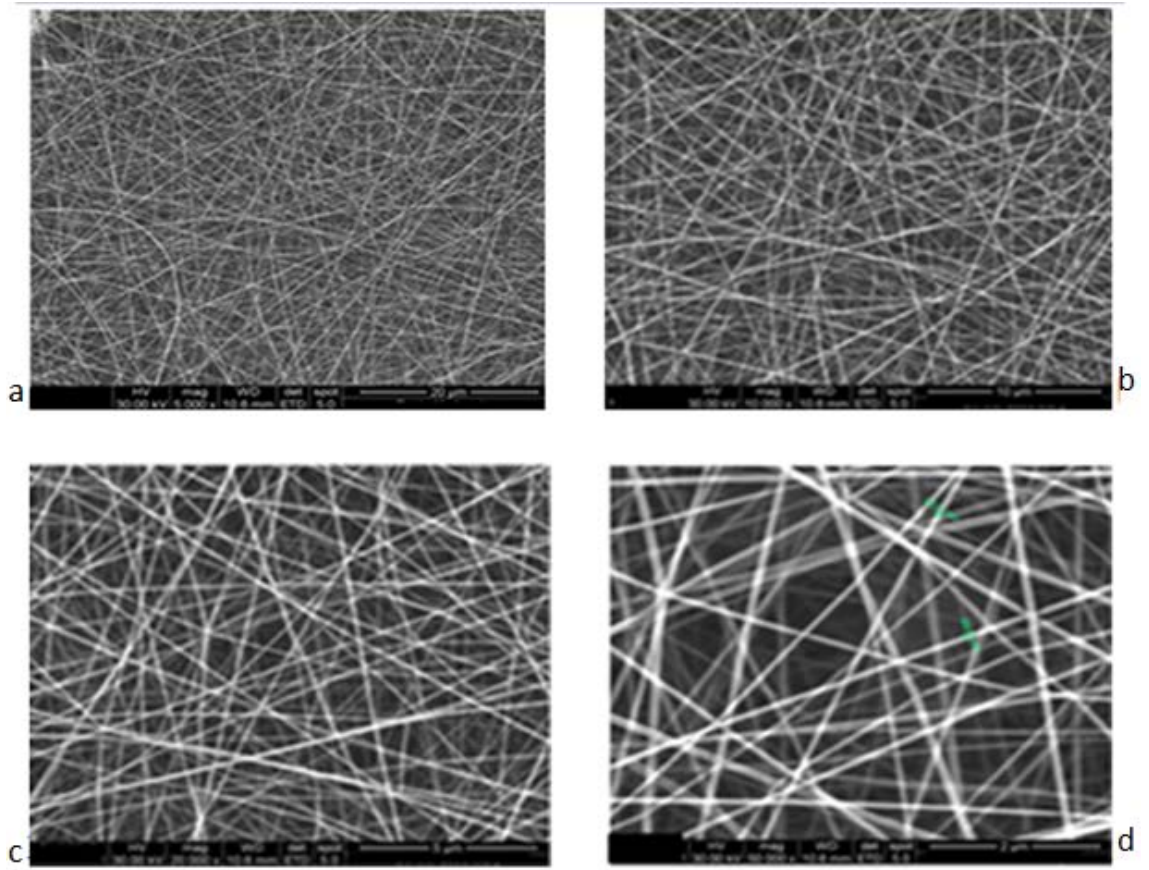
Şekil 4.22 PHEMA-PAA nanofiber membranların SEM görüntüleri, 20 kV

a.10  $\mu\text{L}/\text{dk}$ , b.3.8  $\mu\text{L}/\text{dk}$ , c.7.5  $\mu\text{L}/\text{dk}$ , d.5  $\mu\text{L}/\text{dk}$  (Büyültme oranı: 1000X )



Şekil 4.23 PHEMA-PAA nanofiber membranların SEM görüntüleri, 18 kV

a.10  $\mu\text{L}/\text{dk}$ , b.3.8  $\mu\text{L}/\text{dk}$ , c.7.5  $\mu\text{L}/\text{dk}$ , d.5  $\mu\text{L}/\text{dk}$  (Büyültme oranı: 1000X)



Şekil 4.24 PHEMA-PAA nanofiber membranların SEM görüntüleri, 5  $\mu\text{L}/\text{dk}$ , 18 kV

Büyültme oranı: a.5000X, b.10000X, c.20000X, d.50000X

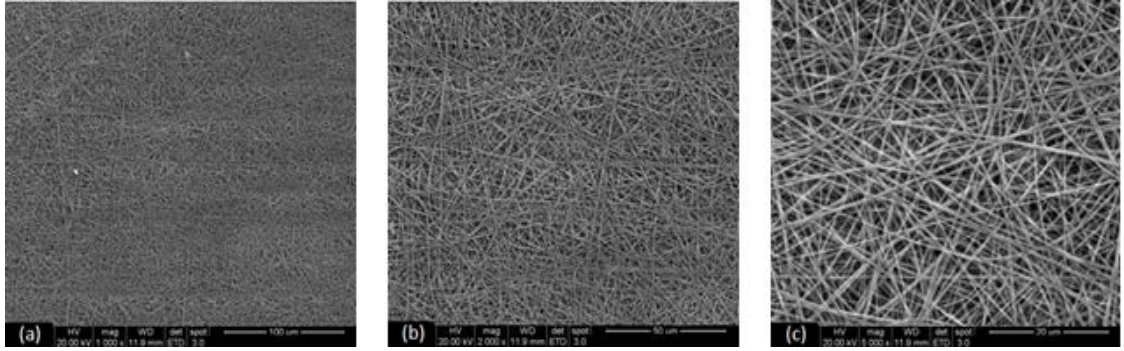
Çizelge 4.4 PHEMA-PAA nanofiber membranların üretim koşulları ve fiber çapları

Akış hızı, $\mu\text{L}/\text{dk}$	Voltaj, kV	Fiber çapları, nm
3.8	18	148.06 $\pm$ 31.73
	20	102.22 $\pm$ 23.52
5	18	<b>70.70<math>\pm</math>12.08</b>
	20	106.77 $\pm$ 27.04
7.5	18	101.51 $\pm$ 43.65
	20	76.96 $\pm$ 18.77
10	18	141.93 $\pm$ 31.60
	20	105.58 $\pm$ 26.14



#### 4.2.4 Çift tabakalı nanofiber yapıdaki membranların (yara örtüsünün) üretimi

Çift tabakalı membranın üretiminde öncelikle PCL-jelatin nanofiber matrisler elektroğirme yöntemi ile üretilmiştir. Bölüm 3.5.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan PCL-jelatin çözeltisi eğirilmek üzere şırıngaya beslenmiştir (Tıǧlı vd. 2011). Toplama paneli alüminyum folyo ile kaplandıktan sonra 1.8 mL/sa (Tıǧlı vd. 2011), 15 cm ve 18 kV olan elektroğirme parametreleri uygulanarak toplama paneline PCL-jelatin nanofiberler toplanmıştır. Alüminyum folyodan kolaylıkla çıkarılan PCL-jelatin membranlar %70’lik etanolde ıslatıldıktan sonra liyafilizatörde vakum altında 1 gece bekletilerek kuruması sağlanmıştır. Kurumuş olan PCL-gelatin membranların SEM görüntüleri şekil 4.25’de verilmiştir. Ortalama fiber çapı ve çap dağılımı  $189.79 \pm 80.36$  nm bulunmuştur.



Şekil 4.25 PCL-Jelatin nanofiber membranların SEM görüntüleri

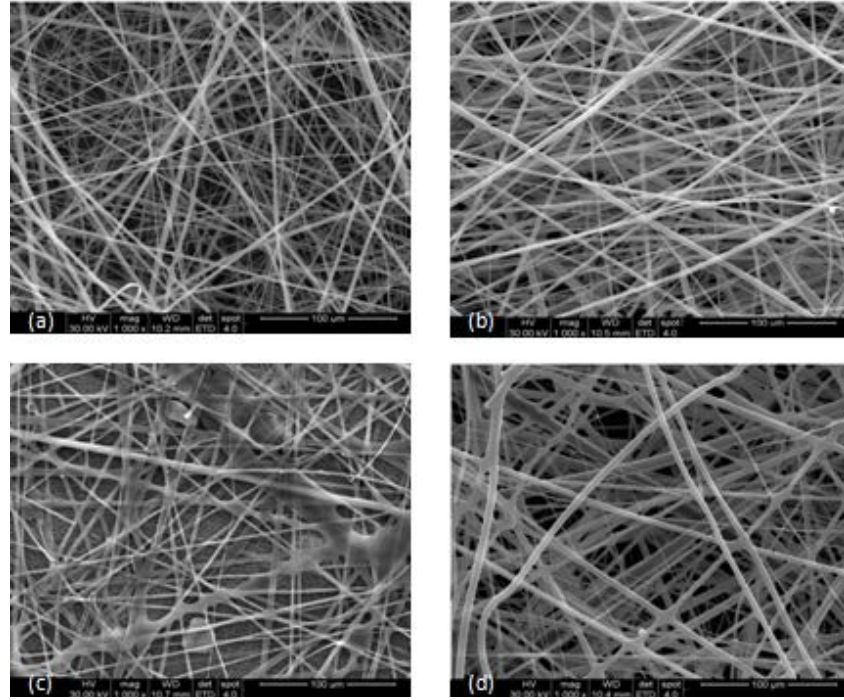
Büyültme oranı: a. 1000X, b. 2000X, c. 5000X

Olası bir enfeksiyon ile pH değişimi karşısında kontrollü antibiyotik salımını sağlayabilen membranlar üretmek amaçlanmıştır. Bu nedenle hazırlanan polimer karışımının ağırlıkça (w/w) % 0.1, % 0.3 ve % 0.5’i kadar ampisilin (AMP), polimer karışımına eklenmiştir. Hazırlanan PCL-jelatin membranlar alüminyum folyoya yapıştırılarak bu membranların üzerine ampisilin içermeyen ve farklı miktarlarda ampisilin içeren PHEMA-PAA homojen polimer karışımı eğirilmiştir. Ampisilin, polimer çözeltisinde az miktarda olduğu için PHEMA-PAA nanofiberlerin üretiminde seçilen parametreye yakın değerlerde çalışılmıştır. Belirlenen akış hızları için voltaj değerleri seçilirken polimer çözeltisi damlacığının 18 kV’da Taylor konisi oluşturmaya başlaması nedeniyle, kritik voltaj değeri 18 kV olarak belirlenmiştir. Şırınga iğnesi ucu-

toplama paneli arasındaki uzaklık 15 cm sabit değerinde tutularak yapılan deneylerde kullanılan parametreler: ampisilin içermeyen (boş membran) ve % 0.1 AMP için 5µL/dk akış hızı, 18 kV voltaj, % 0.3 AMP için 6.5µL/dk akış hızı, 18 kV voltaj ve % 0.5 AMP için 7µL/dk akış hızı, 20 kV voltaj değerindedir. Bu parametrelerde üretilen membranların SEM analizi yapılarak fiberlerin morfolojisi ve çapları-çap dağılımlarına bakılmıştır. Şekil 4.26’da verilen SEM görüntüleri incelendiğinde üretilen tüm membranların beklenenden daha büyük çaplara sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Oysa şekil 4.24 ve şekil 4.25’deki görüntülerde tek tabakalar halinde verilen alt tabaka (189.79± 80.36 nm) ve üst tabakanın (70.70±12.08 nm, AMP içermeyen) çapları oldukça küçüktür, tabakalar birleştiğinde fiber çaplarının aşırı derecede büyük çıkması istenmeyen bir durumdur. Bunun nedeninin üst tabakanın direk alüminyum folyoya değilde PCL-jelatin tabakasının üzerine eğrilmesinin elektriksel iletkenliği değiştirdiği düşünülmüştür. Bu nedenle PCL-jelatin tabakasının üzerine AMP içeren polimer çözeltisi (üst tabaka) eğrilirken çift tabakanın dışında kalan direk alüminyum folyonun üzerinde toplanan bölgeden alınan üst tabaka örneklerinin SEM görüntüleri alınarak şekil 4.27’de verilmiştir. Bu görüntülerde de fiber çapları oldukça büyük çıkmıştır (Çizelge 4.5). Eklenen AMP miktarı çözeltinin derişimini değiştirdiği için fiber çaplarını da etkileyecektir; ancak eklenen AMP miktarı en fazla (w/w) % 0.5’dir. Fiber çaplarının yaklaşık 70 nm’lerden yaklaşık 4000 nm’lere kadar büyük bir farkla çıkmış olmasının elektriksel iletkenlikten kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

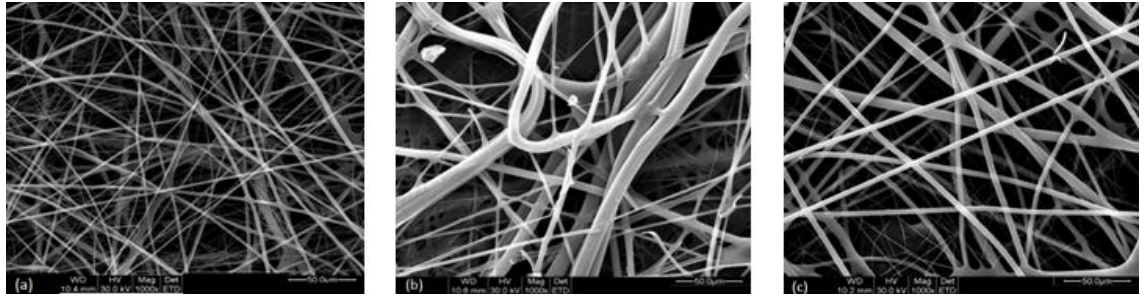
Çizelge 4.5 Çift tabakalı membranların elektroğirme parametreleri ve fiber çapları

Membranın içerdği % AMP miktarı (w/w)	Akış hızı, µL/dk	Voltaj, kV	Fiber Çapı, nm
Boş ( % 0 AMP)	5	18	1814.68±733.88
% 0.1 AMP	5	18	2583.89±1182.31
% 0.3 AMP	6.5	18	1912.10±1608.74
% 0.5 AMP	7	20	3335.98±962.21
<b>Çift tabakadan alınan AMP içeren üst tabakaların fiber çapları, nm</b>			
% 0.1 AMP		2676.35±725.35	
% 0.3 AMP		3854.77±1588.82	
% 0.5 AMP		4180.05±955.97	
<b>Sırınga iğnesi ucu ile toplama paneli arasındaki uzaklık:15 cm</b>			



Şekil 4.26 Çift tabakalı membranların SEM görüntüleri

Ağırlıkça yüzdeleri: a. boş membran, b. % 0.1 AMP, c. % 0.3 AMP, d. % 0.5 AMP (Büyültme oranı: 1000X)



Şekil 4.27 Tek tabakalı membranların (üst tabaka) SEM görüntüleri

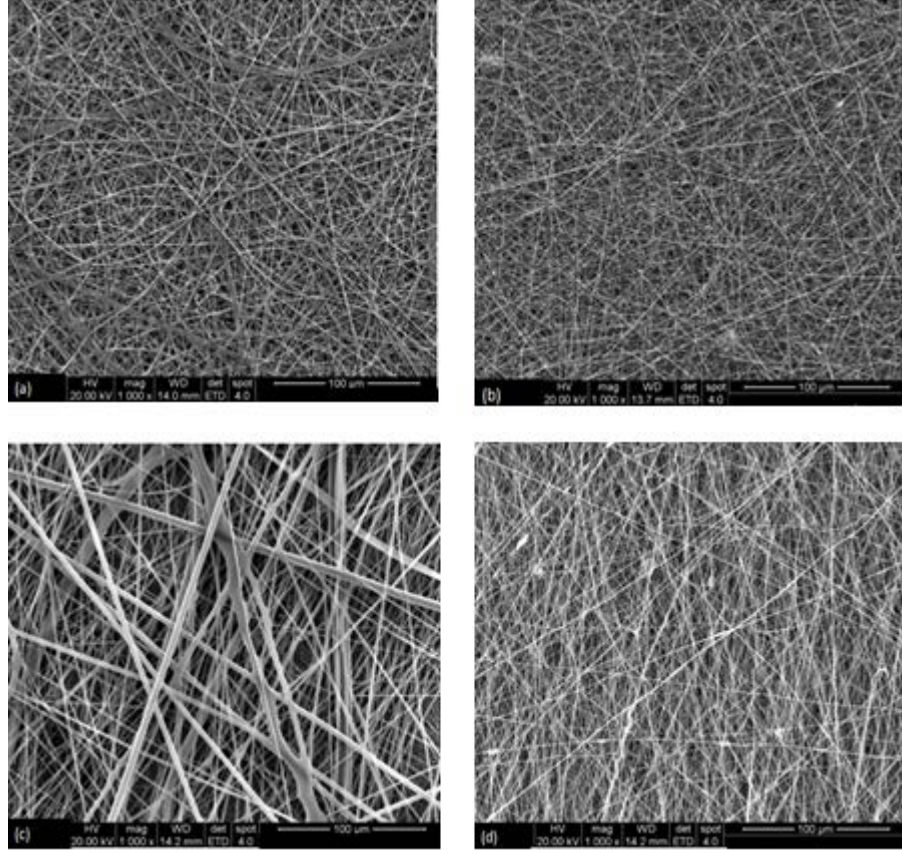
Ağırlıkça yüzdeleri: a. % 0.1 AMP, b. % 0.3 AMP, c. % 0.5 AMP (Büyültme oranı: 1000X)

Üretilen çift tabakalı membranların fiber çaplarının ve çap dağılımlarının büyük olmasından (Çizelge 4.5) dolayı daha önceden belirlenen elektroğirme parametrelerinin değerleri artırılarak çift tabakalı membranların üretiminde en uygun koşulları belirlemek için tekrar elektroğirme deneyleri yapılmıştır. Tüm membranlar 10µL/dk akış hızında, 20 cm (şırınga iğnesi ucu-toplama paneli arasındaki uzaklık) ve 21 kV voltajda üretilmiştir. Bu parametrelerde üretilen çift tabakalı boş membranın ve çift tabakalı boş membranın etrafındaki alüminyum folyo üzerine direk toplanan üst

tabakanın (PHEMA-PAA nanofiberler) SEM görüntüsü (Şekil 4.28.a,c) incelendiğinde fiberlerin ortalama çaplarının azaldığı fakat çap dağılımının fazla olması ve fiberlerin istenilen boyutta olmamasından dolayı daha önce PHEMA nanofiberlerin üretiminde etanolün etkisi ile ilgili deneyler yapılmış ve PHEMA çözeltisinin hacimce 2 katı kadar % 66.3'lük etanol çözeltisi eklenince fiber çaplarında azalma olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle polimer karışımının hacminin 2 katı kadar % 66.3'lük etanol çözeltisi ampisilin içermeyen polimer karışımına eklenmiştir. Yükseltilmiş parametre değerlerinde elektroğirme deneyleri gerçekleştirilerek çift tabakalı boş membranın ve üst tabakanın (Şekil 4.28.b,d) fiber çaplarında azalma olmasından (Çizelge 4.6) dolayı ampisilin içeren polimer karışımlarına da karışım hacminin 2 katı kadar % 66.3'lük etanol çözeltisi eklenmiş ve tüm membranların ortalama fiber çaplarında azalma sağlanmıştır (Çizelge 4.6, Şekil 4.29). Ampisilin içeren membranlar arasında fiber çaplarının daha küçük olmasından ve fiberlerin homojen olarak elde edilmesinden dolayı en iyi fiber morfolojisi olarak % 0.1 (w/w) AMP içeren membran seçilmiştir (Şekil 4.29.d, Şekil 4.30.b). Sonuç olarak çift tabakalı tüm membranların üst tabakasının üretimi için en uygun parametreler Etanol/PHEMA-PAA karışımı (v/v) oranı: 2/1, 10µL/dk, 20 cm ve 21 kV'dur.

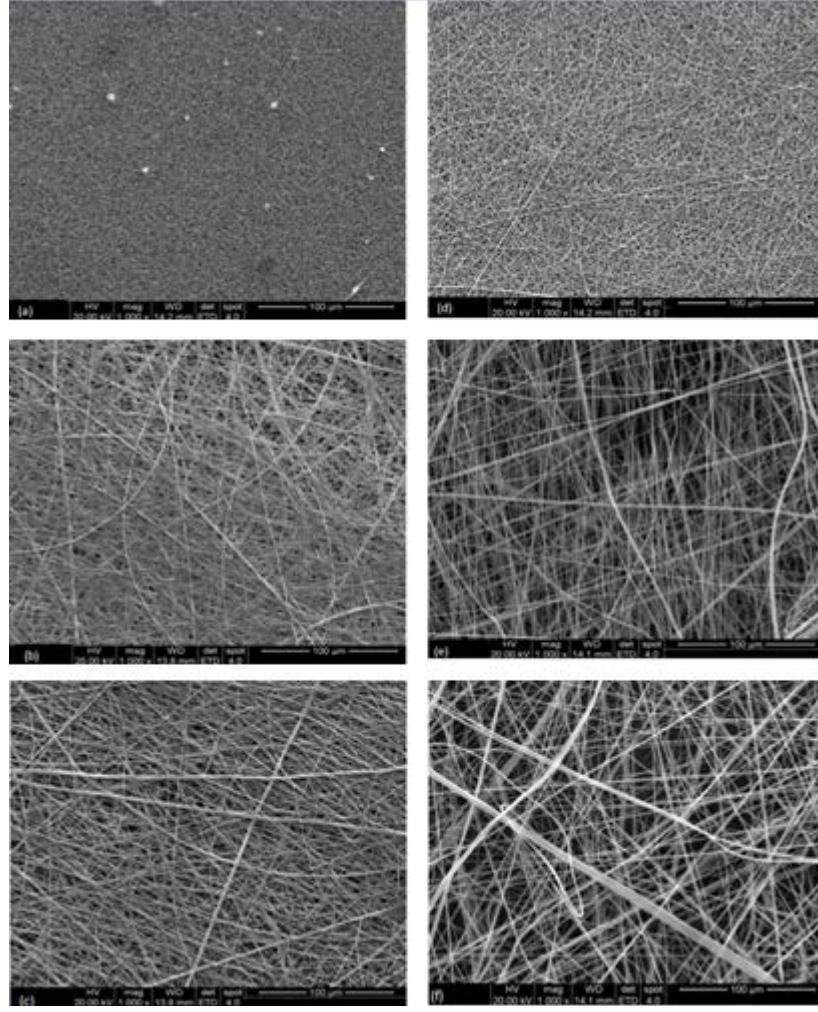
Çizelge 4.6 Yükseltilmiş elektroğirme parametreleri kullanılarak üretilen membranlar

Membran türü	Etanolsüz çözelti Fiber çapı, nm	Etanol/PHEMA-PAA polimer karışımı (v/v) :2/1 Fiber çapı, nm
Çift tabakalı boş membran	1235.45±1138.44	350.97±80.18
Boş membranın üst tabakası	678.03±374.29	264.02±74.88
<b>Membranın içerdiği</b>	<b>Etanol/PHEMA-PAA polimer karışımı (v/v) :2/1</b>	
<b>% AMP miktarı (w/w)</b>	<b>Çift tabaka Fiber çapı, nm</b>	<b>Çift tabakalı membran üst tabakası Fiber çapı, nm</b>
% 0.1 AMP	381.81±73.53	119.83±19.70
% 0.3 AMP	819.40±180.67	792.25±135.09
% 0.5 AMP	862.58±262.42	798.43±188.74
<b>Akış hızı 10µL/dk</b>		
<b>Şırınga iğnesi ucu-toplama paneli arasındaki uzaklık 20 cm</b>		
<b>Uygulanan voltaj 21 kV</b>		



Şekil 4.28 Yükseltmiş parametrelerde üretilen boş (AMP içermeyen) membranların SEM görüntüsü

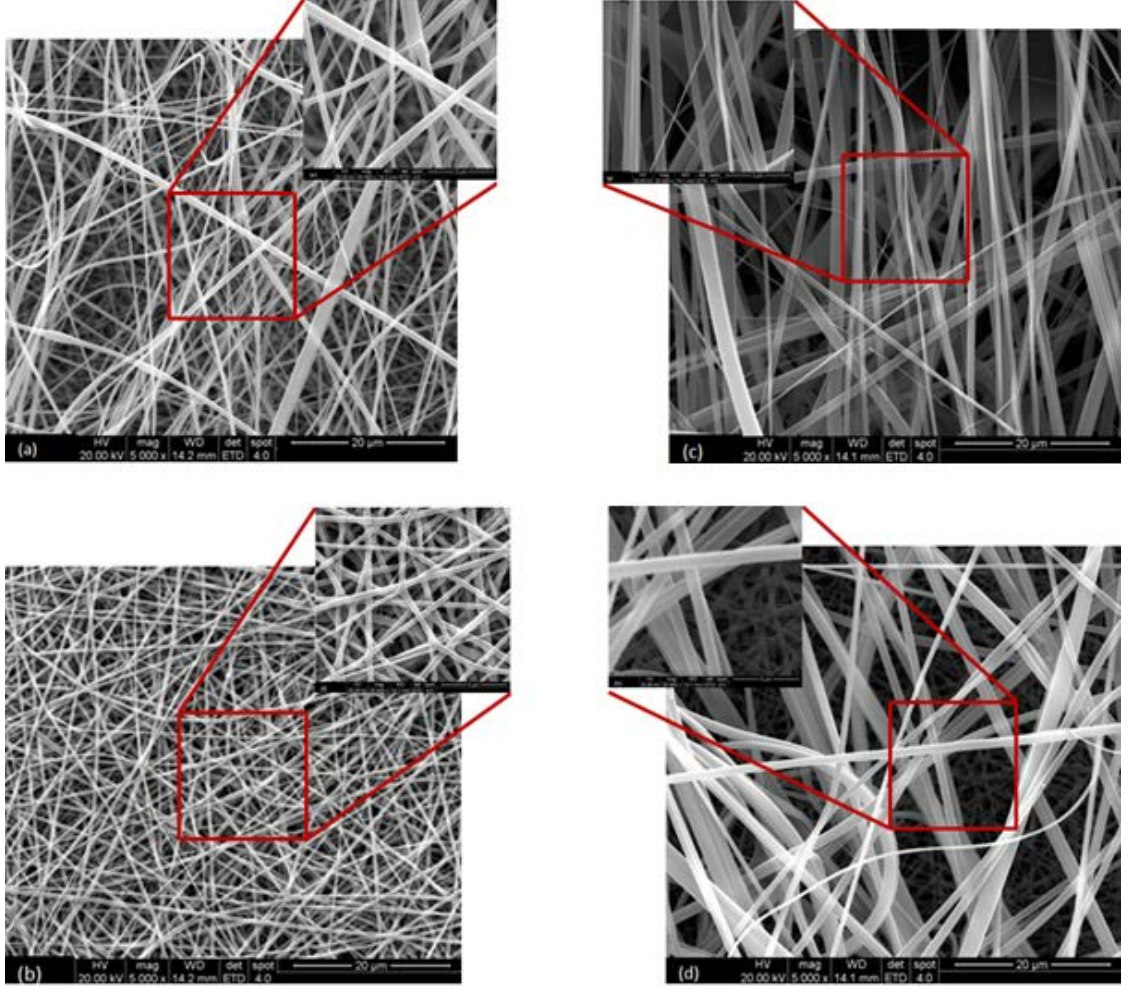
a. üst tabaka, etanolsüz, b. üst tabaka, etanollü, c. çift tabaka, etanolsüz, d. çift tabaka, etanollü (Büyültme oranı: 1000X)



Şekil 4.29 Yükseltmiş parametrelerde üretilen membranların SEM görüntüsü

a,b,c. üst tabakalar, d,e,f. çift tabakalar. Etanol/PHEMA-PAA karışımı (v/v): 2/1, ağırlıkça yüzdeleri: (a,d) % 0.1 AMP, (b,e) % 0.3 AMP, (c,f) % 0.5 AMP (Büyültme oranı: 1000X)

Şekil 4.30'da verilen çift tabakalı boş membranın ve farklı miktarlarda AMP içeren membranların SEM görüntüleri incelenildiğinde çift tabakalı yapıyı görebilmek için özellikle % 0.5 (w/w) AMP içeren membranda alt ve üst tabakadaki fiberler belirgin olarak fark edilebilmektedir (Şekil 4.30.d,h). Bu görüntüye göre çift tabakalı nanofiber yapıdaki yara örtüsünün başarılı şekilde elde edildiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.30 Yükseltilmiş parametrelerde üretilen çift tabakalı membranların SEM görüntüsü

Etanol/PHEMA-PAA karışımı (v/v): 2/1, ağırlıkça yüzdeleri: (a,e) % 0 AMP (boş membran), (b,f) % 0.1 AMP, (c,g) % 0.3 AMP, (d,h) % 0.5 AMP (Büyültme oranı: (a,b,c,d) 5000X, (e,f,g,h) 20000X)

### 4.3 PHEMA Nanofiberlerin Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) ile Optimizasyonu

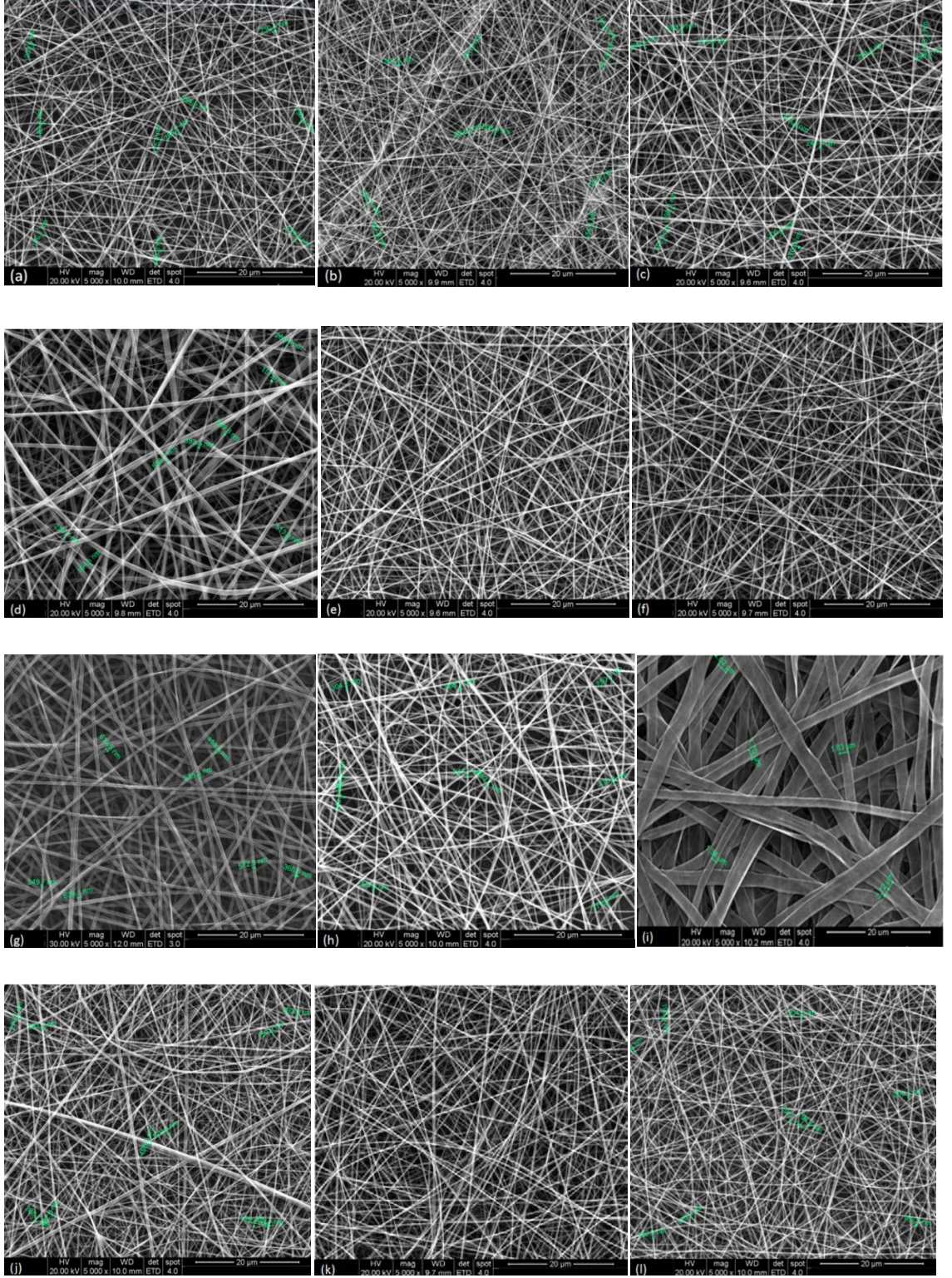
RSM yönteminde kullanılan Desing Expert-6 yazılımıyla yapılan tasarımda bağımlı değişken yani sayıca en fazla olan fiber çapları yanıt değişkenini oluşturmuştur. Merkez nokta Etanol/PHEMA oranı (v/v) 1.50, 10 µL/dk akış hızı ve 10 kV voltaj değeri olacak şekilde yazılım programına girilerek yazılım 20 adet deney önermiştir. Bunların 6 tanesi tekrar deneyi yani merkez noktadaki parametrelerdir. Yazılım tarafından önerilen deney programı uygulandığında üretilen nanofiberlerin SEM görüntüleri (Şekil 4.31,4.32) alınarak ortalama çapları ve çap dağılımları hesaplanmıştır. SEM görüntülerine harf simgeleri verilerek çizelge 4.7'ye eklenmiştir. Ölçülen fiber çapları

ile birlikte kullanılan kodlanmış ve gerçek değerler çizelge 4.7’de verilmiştir. Yazılımda 2. derece (quadratic) model seçilerek deney programının uygulamaya sokulup çözülmesi sağlanmıştır. Yazılımda çeşitli modeller seçilerek denemeler yapılmıştır; ancak sistem için en uygun olanın 2. derece (quadratic) model olduğu düşünülmüştür. En büyük ve en küçük yanıt değerleri arasındaki oran 7,87’dir. Bu değer 10’a yakın olduğu için yanıt değerleri üzerinde bir dönüşüm yapılması gerekmektedir. Yanıt değerlerinin doğal logaritması (ln) alınmıştır; çünkü yanıt değişkeni olan fiber çaplarının büyüklüğü önemlidir.

Çizelge 4.7 Kodlanmış ve gerçek değerler cinsinden deney programı ve elde edilen yanıt

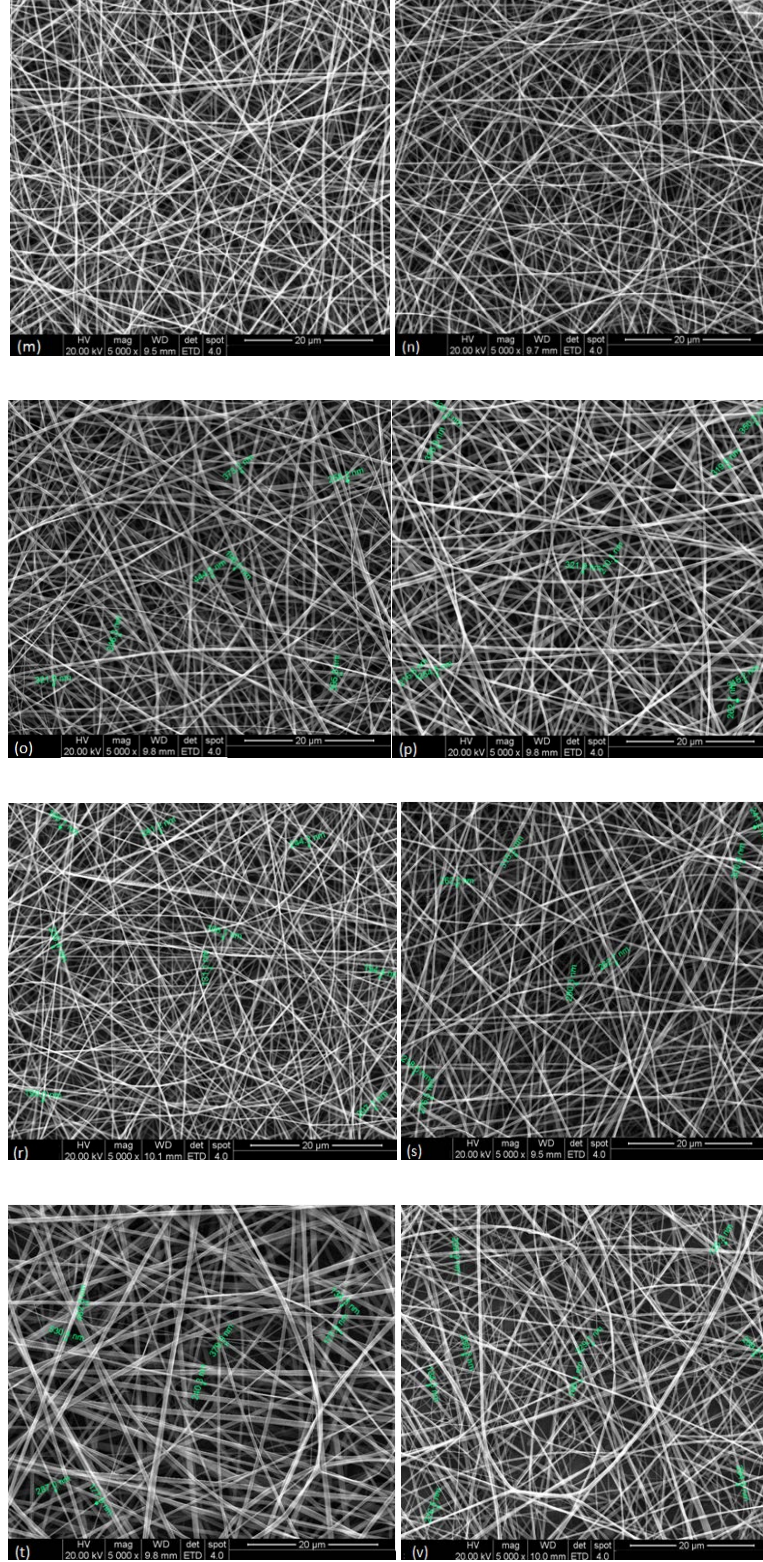
Deney numarası	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	Akış Hızı (µl/dk)	Voltaj (kV)	Etanol/PHEMA oranı (v/v)	Fiber Çapı (nm)	SEM Simgeleri
1	1	1	1	13	12	2	270	a
2	-1.68	0	0	4.95	10	1.5	211	b
3	0	0	0	10	10	1.5	260	c
4	-1	1	-1	7	12	1	430	d
5	0	0	0	10	10	1.5	276	e
6	0	0	0	10	10	1.5	293	f
7	1	-1	-1	13	8	1	596	g
8	1	-1	1	13	8	2	335	h
9	0	0	-1.68	10	10	0.66	1661	i
10	0	1.68	0	10	13.36	1.5	313	j
11	0	0	0	10	10	1.5	285	k
12	0	0	1.68	10	10	2.34	279	l
13	0	0	0	10	10	1.5	280	m
14	0	0	0	10	10	1.5	297	n
15	1	1	-1	13	12	1	381	o
16	0	-1.68	0	10	6.64	1.5	335	p
17	-1	-1	1	7	8	2	285	r
18	1.68	0	0	15	10	1.5	350	s
19	-1	-1	-1	7	8	1	436	t
20	-1	1	1	7	12	2	343	v





Şekil 4.31 Optimizasyon sonucunda üretilen PHEMA nanofiberlerin SEM görüntüleri

Fiber çapları (nm): a.  $270\pm 50$ , b.  $211\pm 37$ , c.  $260\pm 50$ , d.  $430\pm 99$ , e.  $276\pm 40$ , f.  $293\pm 51$ , g.  $596\pm 92$ , h.  $335\pm 53$ , i.  $1661\pm 433$ , j.  $313\pm 56$ , k.  $285\pm 44$ , l.  $279\pm 52$  (Büyültme oranı: 5000X)



Şekil 4.32 Optimizasyon sonucunda üretilen PHEMA nanofiberlerin SEM görüntüleri

Fiber çapları (nm): m.  $280\pm 50$ , n.  $297\pm 55$ , o.  $381\pm 90$ , p.  $335\pm 53$ , r.  $285\pm 54$ , s.  $350\pm 62$ , t.  $436\pm 90$ , v.  $343\pm 53$  (Büyültme oranı: 5000X)

SEM görüntüleri incelendiğinde akış hızı ve voltaj sabitken Etanol/PHEMA oranı 0.66'dan (Şekil 4.31.i) 2.34'e (Şekil 4.31.l) çıkarıldığında ortalama fiber çapları 1661 nm'den 279 nm'ye düşmüştür. Etanol/PHEMA oranı ve akış hızı sabitken voltajın etkisi incelendiğinde uygulanan voltaj 6.64 kV'den (Şekil 4.32.p) 13.36 kV'ye (Şekil 4.34.j) çıkarıldığında ortalama fiber çapları 335 nm'den 313 nm'ye düşmüştür. Akış hızının etkisi incelenirken sabit Etanol/PHEMA oranında ve voltajda akış hızı 7 $\mu$ L/dk'dan (Şekil 4.32.t) 13 $\mu$ L/dk'ya (Şekil 4.31.g) çıkarıldığında ortalama fiber çapları 436 nm'den 596 nm'ye çıkmıştır.

Modelin varyans analizi (ANOVA) gerçekleştirilerek yanıt yüzey yönteminin doğruluğu test edilmiştir. Modelin ANOVA testi sonucunda önemli olan değerler çizelge 4.8'de verilmiştir.

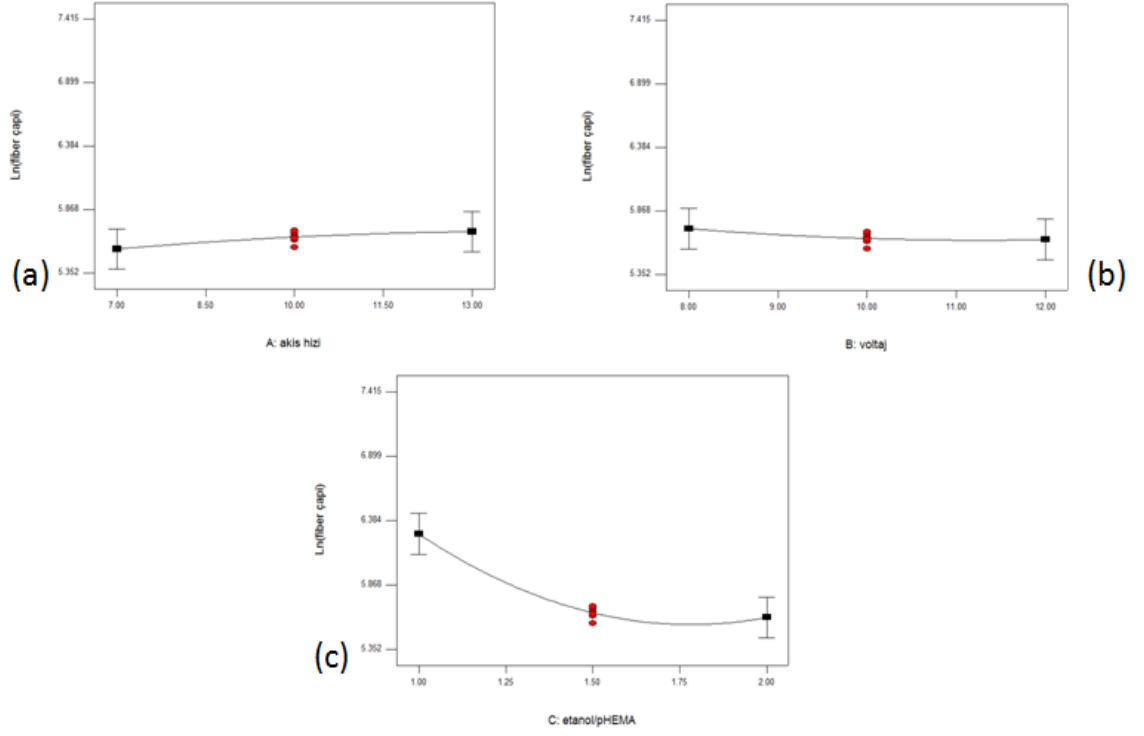
Çizelge 4.8 Minimum fiber çapının belirlenmesinde kullanılan modelin ANOVA testi sonuçları

	<b>F</b>	<b>Prob&gt;F</b>
Model	7.38	0.0022
x <sub>1</sub>	1.47	0.2525
x <sub>2</sub>	0.58	0.4634
x <sub>3</sub>	33.09	0.0002
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.22	0.6472
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.39	0.5479
x <sub>3</sub> <sup>2</sup>	27.66	0.0004
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	1.88	0.2001
x <sub>1</sub> x <sub>3</sub>	0.20	0.6674
x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	0.50	0.4950
Uygunluğun zayıflığı	39.72	0.0005
Standart sapma		0.22
R <sup>2</sup>		0.8691
Adj R <sub>2</sub>		0.7514
Doğruluk kesinlik değeri		10.522

Kullanılan modelin önemini ifade eden değer F testi değeridir. Bu değer modelde 7.38 çıkmıştır. Model parametrelerinin önemini gösteren değer ise Prob>F değerleridir. Bu değerlerin 0.05'ten küçük olması durumunda ilgili modeldeki parametrelerin önemli olduğunu göstermektedir. ANOVA testi sonucuna göre bu değerlerin Etanol/PHEMA (v/v) oranı ( $x_3$ ) için 0.0002 çıkması bu oranın fiber çapında önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Uygunluğun zayıflığı (lack of fit test) testinde F değerinin yüksek olması modelin zayıflamasına neden olmaktadır. Bu testte F değeri 39.72 olarak bulunmuştur. Regresyon katsayısı, bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin model tarafından ne şekilde ifade edildiğini göstermektedir. Bu değerlerin 1'e yakın olması istenmektedir Regresyon katsayısı olan  $R^2$  0.8691 çıkmıştır ve 1'e yakın bir değerdir. Ayrıca modelin standart sapmasının 0.22 gibi düşük bir değerde olması istenilen bir durumdur.  $R^2_{adj}$  (ayarlanmış regresyon katsayısı) değerinin ise 0.7514 olduğu görülmüştür. Yanıtın hataya oranını ölçen modeldeki doğruluk kesinlik değerinin 4'ten büyük olması istenmektedir ve bu değer 10.522 çıkmıştır. Parametrelerin fiber çapı üzerindeki etkisi model olarak 4.1 eşitliğindeki gibi bulunmuştur.

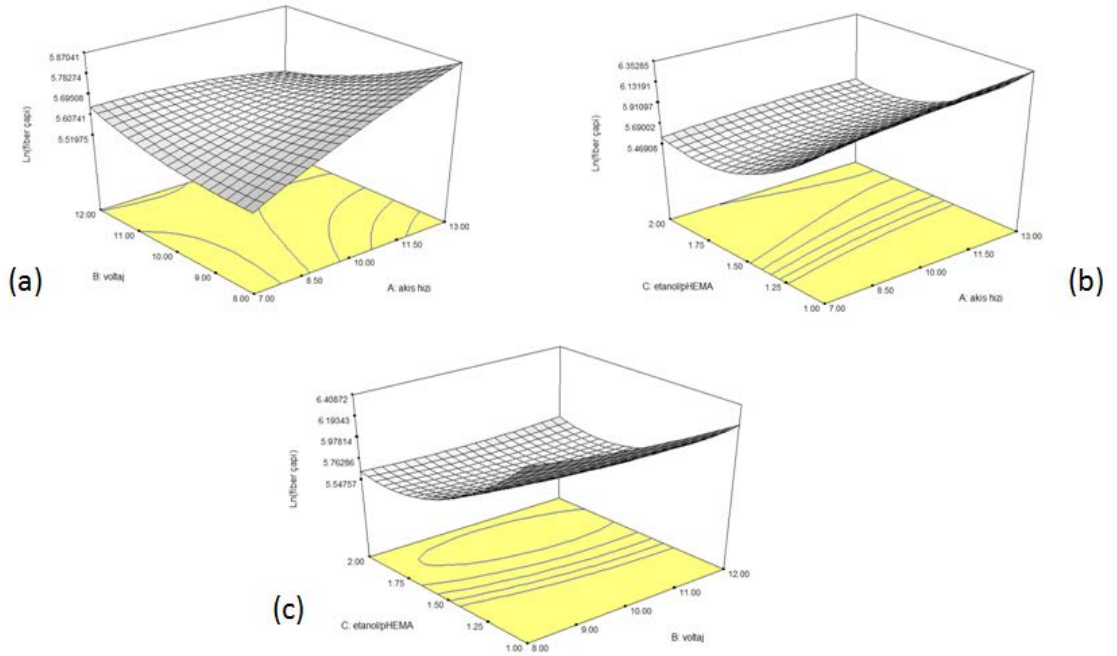
$$\ln(\text{fiber çapı}) = +5.64 + 0.071 * x_1 - 0.044 * x_2 - 0.33 * x_3 - 0.027 * x_1^2 + 0.035 * x_2^2 + 0.30 * x_3^2 - 0.10 * x_1 * x_2 - 0.034 * x_1 * x_3 + 0.054 * x_2 * x_3 \quad (4.1)$$

Denklem katsayıları incelendiğinde akış hızı ( $x_1$ ) fiber çapını artırma yönündedir. Voltaj ( $x_2$ ) ise katsayısı nedeniyle azda olsa fiber çapını azaltma yönünde eğilim göstermektedir. Etanol/PHEMA oranı ( $x_3$ ) ise fiber çapını azaltma yönünde etkisi olduğu ve katsayısı daha büyük olduğu için en etkin parametre olduğu belirlenmiştir. Parametrelerin fiber çapına etkileri tek boyutlu (Şekil 4.33) ve üç boyutlu (Şekil 4.34) grafikler halinde verilmiştir.



Şekil 4.33 Parametreler ile ln (fiber çapı) değişimlerinin tek boyutlu grafikleri

a. voltaj: 10 kV, Etanol/PHEMA:1.5, b. akış hızı: 10  $\mu$ L/dk, Etanol/PHEMA:1.50, c. akış hızı: 10  $\mu$ L/dk, voltaj: 10 kV



Şekil 4.34 Parametreler ile ln (fiber çapı) değişimlerinin üç boyutlu grafikleri

a. Etanol/PHEMA:1.50, b. voltaj: 10 kV, c. akış hızı: 10  $\mu$ L/dk

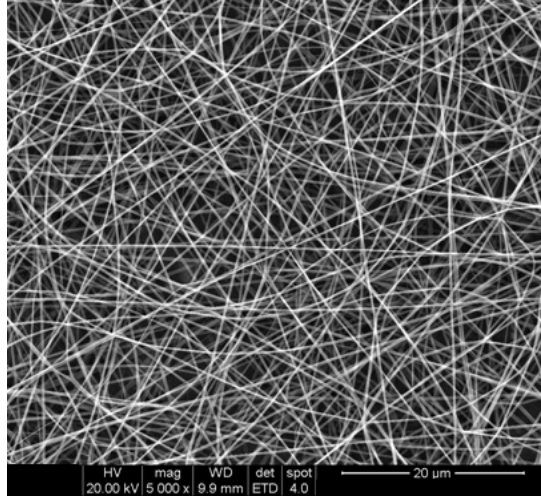
Design Expert-6 yazılım programına alt sınır-üst sınır değerleri ve yanıtın (fiber çapı) minimum olması girilerek, şekil 4.35'deki görüntüde fiber üretimi için en uygun altı koşul program tarafından verilmiştir. Programın verdiği fiber çapları 224 nm ile 242 nm arasında değişmektedir. İçlerinden deney numarası 6 olan koşul için elektroçirme deneyi yapılmış ve ortalama fiber çapı yaklaşık  $245 \pm 35$  nm bulunmuştur (Şekil 4.36). Programda bu koşul için  $\ln(5.490)=242.25$  nm olarak vermiştir. Deneysel ve hesaplanan yanıt değeri birbirine çok yakın çıkmıştır. Yapılan 20 deney sonucunda fiber çaplarının % 80'i 210 nm ile 350 nm arasındadır. RSM yöntemi alt sınırın altı ve üst sınırın üstünü kapsayacak şekilde deney programı verdiği için şekil 4.35'deki bazı koşulların sınır değerinde çıkması beklenen bir durumdur. Deneysel olarak bulunan (gerçek) ve tahmin edilen fiber çapları arasındaki ilişki şekil 4.37'de verilmiştir.  $\ln(\text{fiber çapı})$  olarak verilen yanıt değerleri arasında çok büyük bir fark bulunmadığı belirlenmiştir.

Değişkenler	Amaç	Alt sınır	Üst sınır
Akış hızı	Aralık	7	13
Voltaj	Aralık	8	12
Etanol/PHEMA	Aralık	1	2
$\ln(\text{fiber çapı})$	minimum	5.35186	7.41518

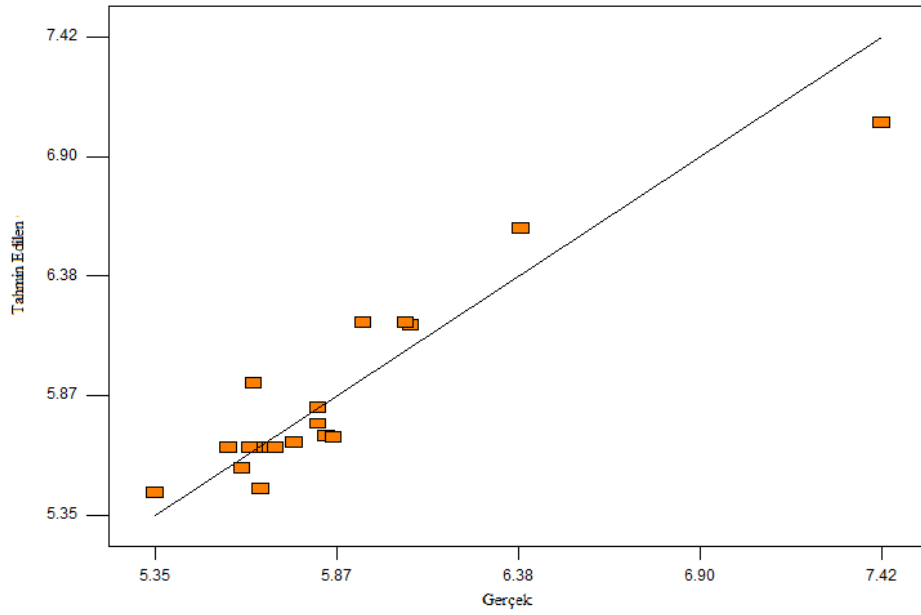
  

Çözümler	Akış hızı	Voltaj	Etanol/PHEMA	$\ln(\text{fiber çapı})$
1	7.00	8.00	1.80	5.415
2	7.00	8.00	1.79	5.415
3	7.00	8.10	1.79	5.416
4	7.00	8.48	1.79	5.422
5	7.00	8.67	1.68	5.438
6	<u>13.00</u>	<u>12.00</u>	<u>1.76</u>	<u>5.490 Seçilen</u>

Şekil 4.35 Design Expert-6 yazılım programının önerdiği koşullar



Şekil 4.36 Programın verdiği koşulda üretilen PHEMA nanofiberlerin SEM görüntüsü (Büyültme oranı: 5000X)



Şekil 4.37 Gerçek ve tahmin edilen yanıt değerleri arasındaki ilişki

#### 4.4 Nanofiber Membranların Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi

Elektroçirime yöntemiyle hazırlanan nanofiber membranlar üzerinde Bölüm 4.4'ün alt bölümlerinde verilen yöntemler uygulanarak karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar bu bölümün ilgili alt bölümlerinde verilmiştir.

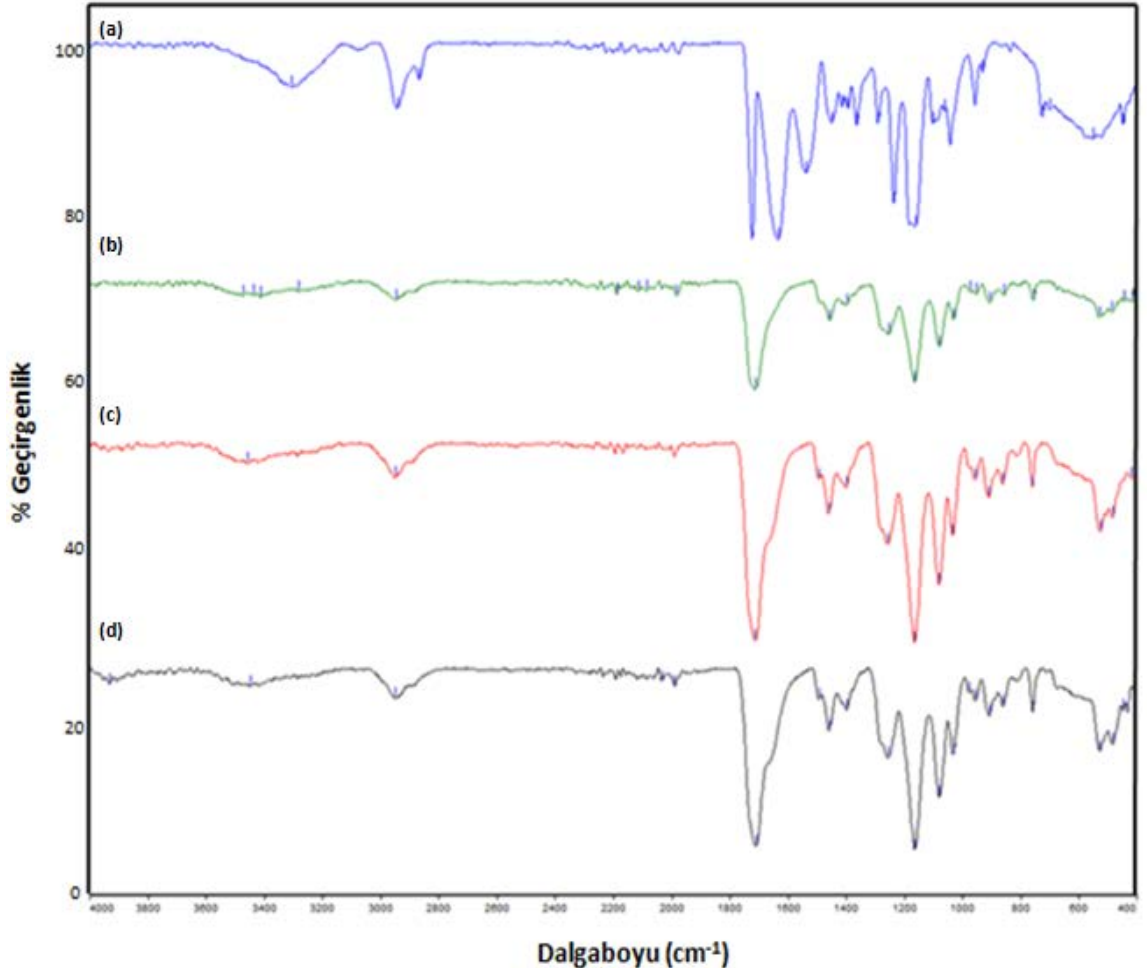
#### 4.4.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Üretilen tüm membranların morfolojik değerlendirilmesi SEM görüntüleri üzerinden yapılarak, farklı polimer çözeltilerinden fiberlerin üretimi için en uygun koşullar belirlenirken bu görüntüler incelenmiştir. Bölüm 4.2’de Nanofiber Membranların Üretimi ve Bölüm 4.3’te PHEMA Nanofiberlerin RSM ile Optimizasyonu başlıkları altında SEM görüntüleri ile ilgili yapılan incelemeler ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

#### 4.4.2 FTIR-ATR analizi

Alt tabaka (PCL-Jelatin), üst tabaka (PHEMA-PAA), çift tabakalı boş membran ve % 0.5 AMP içeren çift tabakalı membranların yüzey karakterizasyonları, FTIR-ATR spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.38’de verilen FTIR-ATR spektrumlarında (a) ile simgelenen spektrum PCL-jelatinden oluşan alt tabakaya aittir. Asimetrik CH<sub>2</sub> gerilmesine bağlı 2943 cm<sup>-1</sup>, simetrik CH<sub>2</sub> gerilmesine bağlı 2866 cm<sup>-1</sup>, C=O gerilmesine bağlı 1724 cm<sup>-1</sup>, C-C ile C-O gerilmesine bağlı 1293 cm<sup>-1</sup> ve asimetrik C-O-C gerilmesine bağlı 1239 cm<sup>-1</sup> dalga boylarındaki pikler PCL’in karakterisitik pikleri olarak tanımlanmaktadır. Jelatin proteine ait karakteristik pikler ise Amid I ve Amid II bağlarındaki gerilmeden kaynaklanan ve sırasıyla 1636 cm<sup>-1</sup> ve 1540 cm<sup>-1</sup> dalga boylarında yer alan piklerdir. (b) ile simgelenen PHEMA-PAA spektrumu ve (c) ile simgelenen çift tabaka boş membranın üst tabakası 3435 cm<sup>-1</sup>, 1707 cm<sup>-1</sup>, 1157 cm<sup>-1</sup> dalga boylarındaki pikler sırasıyla PHEMA’nın yapısındaki –OH, C=O, C-O-C gruplara aittir. 2945 cm<sup>-1</sup> ve 1450 cm<sup>-1</sup> dalga boylarındaki pikler ise sırasıyla PAA’de bulunan –OH ve C-O gruplara aittir. Şekil 4.38. d spektrumu AMP içeren çift tabakalı membrana aittir. AMP’nin membranın yapısına katıldığı 3928 cm<sup>-1</sup>, 1700 cm<sup>-1</sup> ve 1450 cm<sup>-1</sup> dalga boylarındaki piklerden anlaşılmaktadır (Hosokawa 2011). 1700 cm<sup>-1</sup> PHEMA’dan gelen C=O ve 1450 cm<sup>-1</sup> PAA’dan gelen C-O gruplara ait pikler AMP’ye ait piklerle çakıştığı düşünülmüştür.





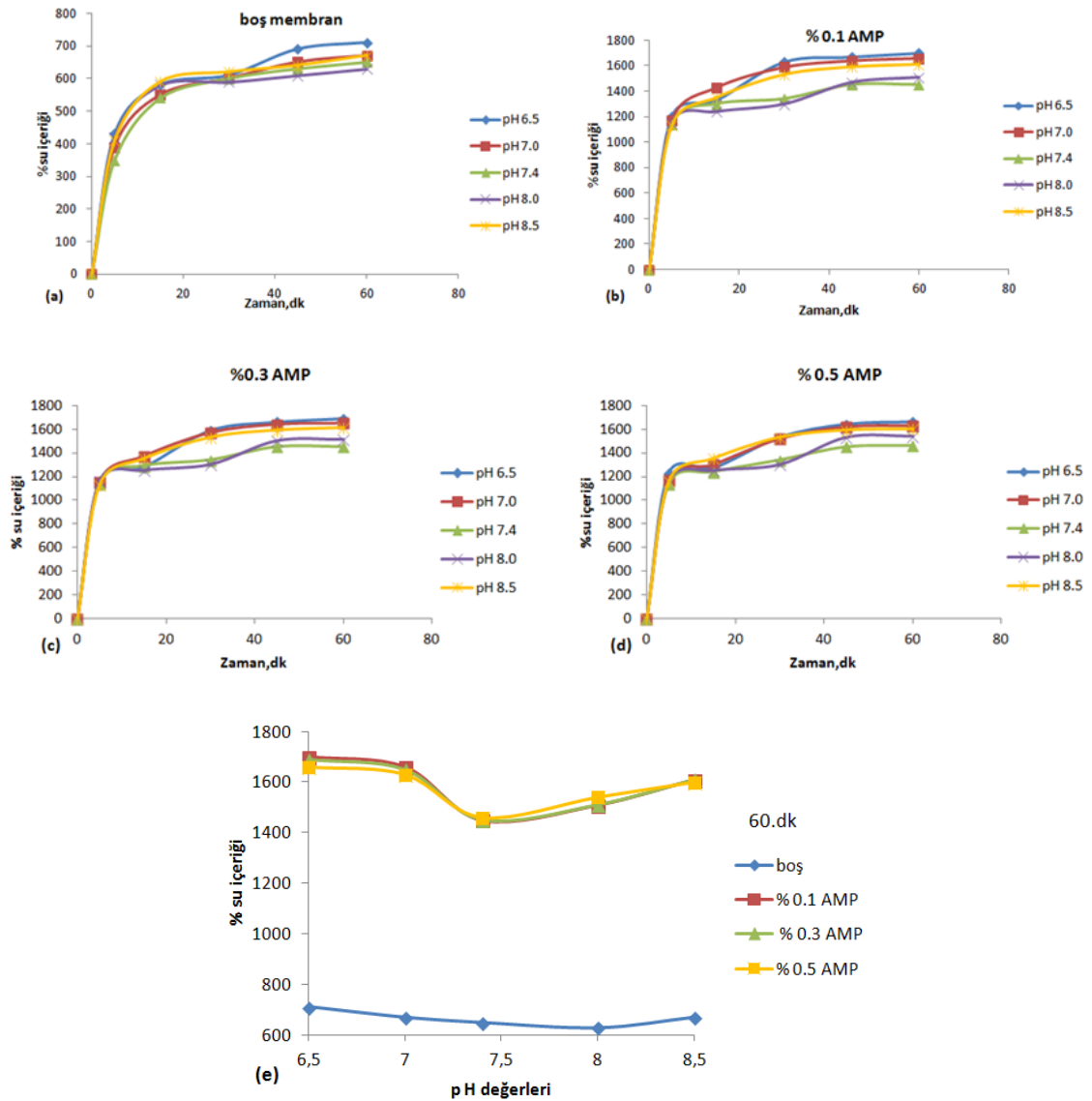
Şekil 4.38 Üretilen membranlara ait FTIR-ATR spektrumu

a. PCL-jelatin, b. PHEMA-PAA, c. çift tabakalı boş membran, d. AMP içeren çift tabakalı membran.

#### 4.4.3 Şişme deneyleri

Boş ve AMP içeren membranların farklı pH'lardaki tampon çözeltilerinde (pH:6.5, pH:7.0, pH:7.4, pH:8.0, pH:8.5) şişme deneyleri yapılmıştır. Başlangıç anındaki (0. dk) kuru ağırlığı tartılan membranların, 5., 15., 30., 45., 60. dk sonunda ıslak tartımları alınmıştır. 45. ve 60. dk'larda membranların ağırlıkları çok yakın çıktığı için 60.dk'da ölçülen ağırlıklar denge şişme ağırlıkları olarak kabul edilmiştir. Bu ağırlık değerleriyle % su içerikleri hesaplanmıştır. Şekil 4.39'da verilen membranların farklı pH'lara karşı % su içeriği incelendiğinde genel olarak zamanla maksimum şişmede asidik ortamdan pH 7.4'e doğru azalma eğilimi, pH 7.4'den sonra ise grafikler artma eğilimi göstermektedir. Ayrıca AMP içeren membranların % su içerikleri boş membranlara göre daha fazla

olduğu belirlenmiştir ve farklı miktarda AMP içerenlerin % su içerik değerleri birbirine oldukça yakın çıkmıştır. Şekil 4.39'de zamana karşı verilen % su içeriklerinin incelendiğinde grafiklerde pH 7.4'de en az şişme olduğu söylenebilir. Bu nedenle pH 7.4 dönüm noktası olarak kabul edilebilir. Hazırlanan membranların su alım kapasitelerinin fazla olması yara örtüsü uygulamalarında kullanımı için önemli bir avantaj sağlamaktadır.



Şekil 4.39 (a,b,c,d) Denge şişme eğrileri ve (e) farklı pH değerlerine karşı membranların % su içeriği

#### 4.4.4 Mekanik dayanım testi

Doku mühendisliği uygulamaları için kullanılacak olan biyomalzemelerin mekanik özellikleri kullanım performansını etkileyen özellikler arasındadır. Malzemenin dayanımını için kullanılan mukavemet ölçüsü olan elastik modülü (young modülü), malzemeye kuvvet uygulandığında elastik şekil değiştirmesinin bir ölçüsüdür. Üretilen biyomalzemelerin gerilime karşı gösterdikleri dirençleri belirlemek için mekanik dayanım testi yapılmıştır. Elastik modülleri ve gerilim dirençleri değerlendirilmiştir. Çekme hızı dakikada 10 mm'dir. Çizelge 4.9'da boş ve % 0.5 AMP içeren membranların mekanik dayanım testi sonucunda elastik modülleri (MPa), çekme mukavemeti (MPa) ve maksimum mukavemetteki % uzama yani çekme uzaması (%) değerleri verilmiştir. Boş membranların, AMP içeren membranlara göre elastik modülü yaklaşık 4 kat, çekme mukavemeti ise yaklaşık 2.5 kat daha fazladır. Bunun nedeni AMP'nin yapıya katılması membranların yüzeyinde pürüzlülüğün olmasına dolayısıyla kırınanlığın artmasına neden olduğu düşünülmüştür.

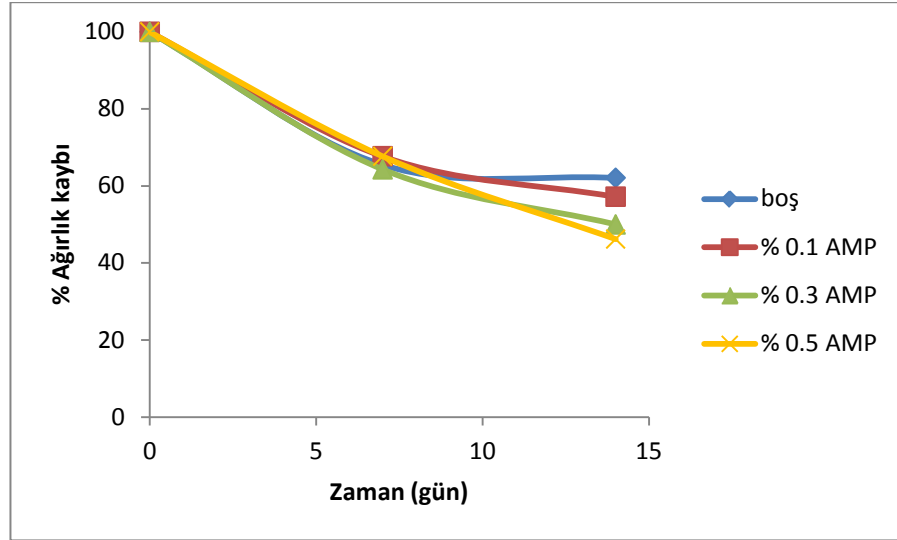
Çizelge 4.9 Boş ve AMP içeren çift tabakalı membranların mekanik özellikleri ve boyutları

Çift tabakalı membran	Elastik modülü (MPa)	Çekme mukavemet (MPa)	Çekme uzaması (%)	Ortalama Kalınlığı (µm)	Genişliği (mm)	Uzunluğu (mm)
Boş (%0 AMP)	139±17.6	4.34±0.85	14±3.7	163±41.0	4	75
%0.5 AMP içeren	46.3±9.0	1.85±0.80	11.2±2.7	147±46.6	4	75

#### 4.4.5 Biyobozunurluk çalışmaları

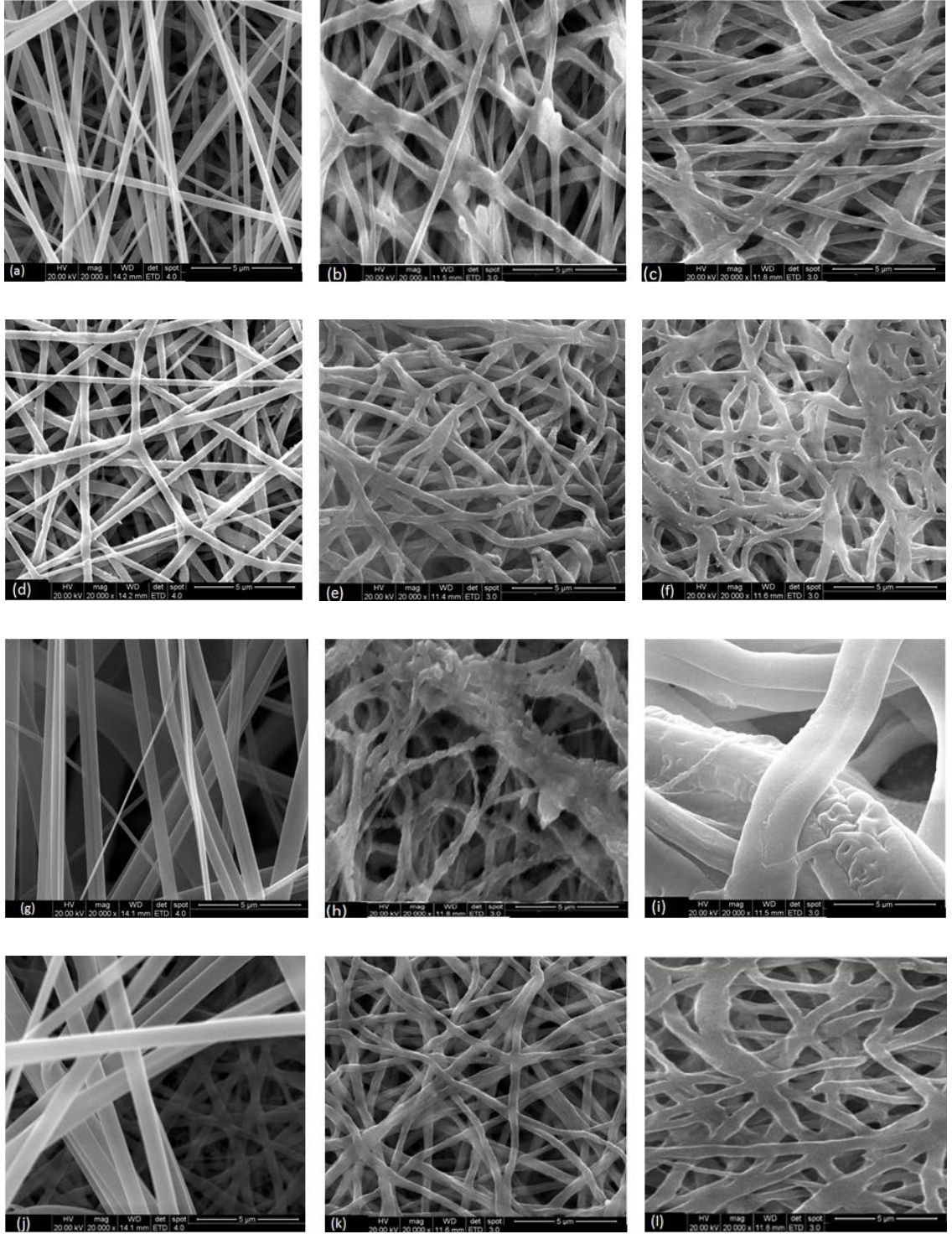
Biyobozunma çalışmaları çift tabakalı boş ve ampisilin yüklenmiş membranların 37°C'de, %0.1 (w/v) sodyum azid içeren 10 ml'lik PBS ortamında (pH=7.4) gerçekleştirilmiştir. Bozunma sonrasındaki 7.gün ve 14. gün sonunda PBS ortamından alınıp kurutulan membranların SEM görüntüleri (Şekil 4.41) alınarak morfolojik değişimleri incelenmiştir. Ayrıca membranların başlangıç kuru ağırlığı ve bozunma

sonrası kuru ağırlıkları tartılarak % ağırlık kaybı hesaplanmış ve ilgili grafik şekil 4.40'da verilmiştir. Grafik incelendiğinde 7.gün sonunda tüm membranlarda ağırlık kayıpları yaklaşık olarak aynı bulunmuştur. 14.gün sonunda ise en fazla ağırlık kaybı % 0.5 AMP içeren membranda olduğu belirlenmiştir. Membrandaki AMP miktarı arttıkça ağırlık kaybının daha fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.40 Hazırlanan membranların 14 günlük süre sonunda % ağırlık kaybı

Bozunurluk testinin 7. ve 14.gününde alınan SEM görüntülerinde fiberlerin morfolojisi incelendiğinde fiberlerin birbirine yapıştığı görülmektedir. Bu yapışmanın 14.günde daha fazla olduğu ve bunun sonucunda fiberlerin yapısının bozunarak kalınlaştığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.41).



Şekil 4.41 Çift tabakalı membranların bozunma öncesi ve sonrası SEM görüntüleri

bozunma öncesi; a. boş, d. % 0.1 AMP, g. % 0.3 AMP, j. % 0.5 AMP, 7 günlük bozunma testi sonrasında; b. boş, e. % 0.1 AMP, h. % 0.3 AMP, k. % 0.5 AMP, 14 günlük bozunma testi sonrasında; c. boş, f. % 0.1 AMP, i. % 0.3 AMP, l. % 0.5 AMP (Büyütmeye oranı: 20000X)

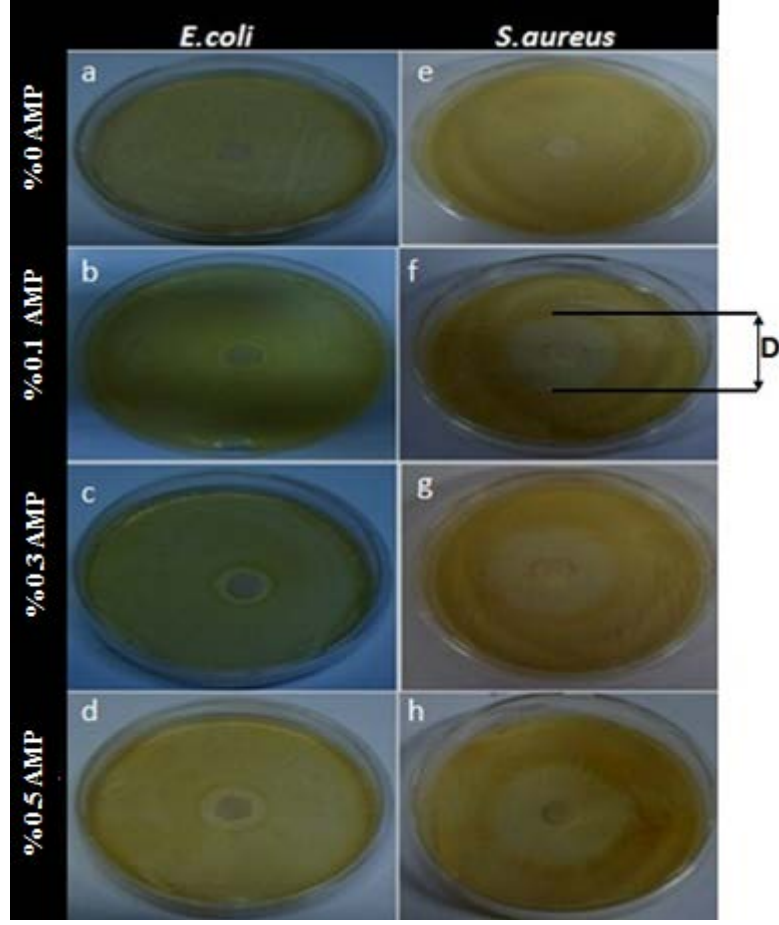
#### 4.5 Çift Tabakalı Yara Örtüsünün Antimikrobiyal Etkinliğinin Kanıtlanması

Çift tabakalı membranların antimikrobiyal aktivitesini araştırmak için *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) ve *Escherichia coli* (*E.coli*) mikroorganizmaları ile çalışılmıştır. Çizelge 4.10'da ilgili mikroorganizmaya ait inhibisyon bölgelerinin çapları (**D**) verilmiştir. Şekil 4.42'de verilen görüntülerde AMP içermeyen (% 0, boş membran) membranlarda her iki mikroorganizma için petrielerde bir değişim gözlenmemiş, membranlardaki AMP miktarı arttıkça, inhibisyon bölgesinin çapının (**D**) arttığı ve çaplar *S.aureus*'da daha büyük olmasından dolayı bu mikroorganizmaya karşı membranların daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bu durum incelenen literatürle uyumlu çıkmıştır. 2010 yılında Liu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada poli( $\epsilon$ -kaprolakton) nanofiber ipliklerin antimikrobiyal özeliğini belirlemek için ampisilin kullanarak benzer bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada gram pozitif olan *Staphylococcus aureus*, gram negatif olan *Klebsiella Pneumoniae* mikroorganizmaları kullanılmış ve ampisilin içeren nanofiber ipliklerin *S.aureus*'a karşı inhibisyon bölgesindeki çapların daha büyük olmasından dolayı daha duyarlı olduğunu belirlemişlerdir.

Sonuç olarak membranların ampisilin içermesinden dolayı gram pozitif mikroorganizmalara karşı daha etkili olduğu söylenilebilir. Ayrıca tez kapsamında yapılan bu çalışma membranlarda AMP'nin varlığını ve başarılı bir şekilde AMP içeren membranların elektroçirme yöntemiyle üretildiğini göstermektedir.

Çizelge 4.10 İnhibisyon bölgeleri

<b>Mikroorganizmaların inhibisyon bölgelerinin çapları D (mm)</b>				
<b>AMP yüzdeleri (w/w)</b>	<b>% 0</b>	<b>% 0.1</b>	<b>% 0.3</b>	<b>% 0.5</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	0±0	35.67±0.57	41.33±1.53	45.67±0.57
<i>Escherichia coli</i>	0±0	14±1	17.33±0.57	19.33±0.57



Şekil 4.42 Farklı miktarlarda AMP içeren çift tabakalı membranların inhibisyon bölgesi görüntüleri

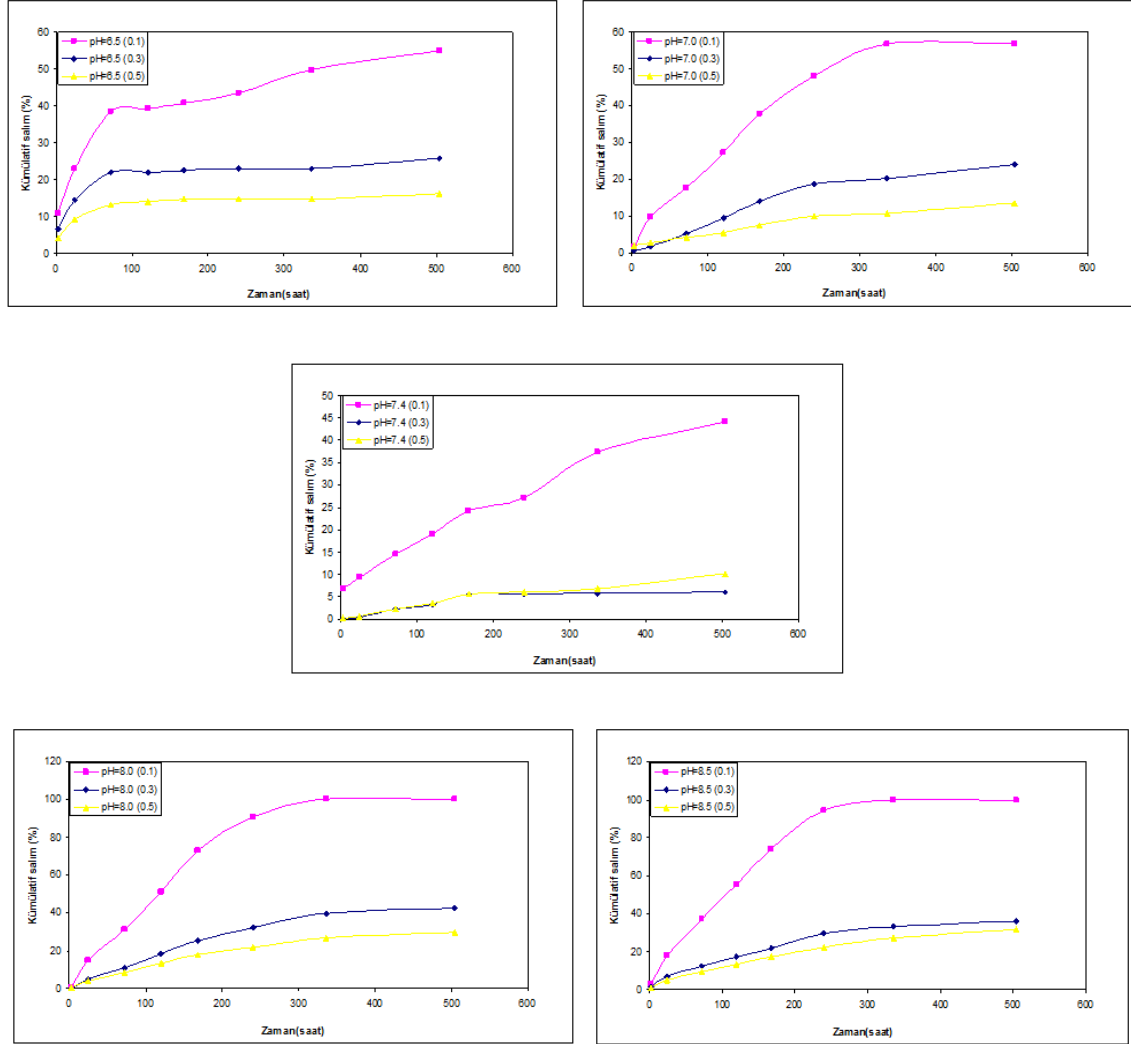
AMP miktarları (w/w): *Escherichia coli*'ye karşı; a. % 0, b. % 0.1, c. % 0.3, d. % 0.5, *Staphylococcus aureus*'a karşı; e. % 0, f. % 0.1, g. % 0.3, h. % 0.5.

#### 4.6 Çift Tabakalı Yara Örtüsünden Ampisilin Salımının İzlenmesi

In vitro salım çalışmaları % 0.1 (w/v) sodyum azid içeren farklı tampon çözelti (pH:5, pH:6.5, pH:7.0, pH:7.4, pH:8.0, pH:8.5) ortamında, 37°C'de ve 30 rpm çalkalamalı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Salım ortamı belirlenen sürelerde uzaklaştırılarak UV-görünür bölge spektrofotometresi ile 250 nm'de nicel ölçümler yapılmıştır.

Elde edilen ölçümler sonucunda farklı miktarlarda AMP içeren membranların kümülatif salım miktarları belirlenmiş ve ilgili grafikler şekil 4.43'de verilmiştir. Grafikler incelendiğinde pH: 8 ve pH: 8.5 olduğu ortamlarda diğer pH'lara göre tüm membran çeşitleri için AMP salımının daha fazla olduğu görülmektedir. Bu pH'larda % 0.1 AMP

içeren membranlar için kümülatif salımın % 100'e ulaştığı görülmektedir. pH 5 içinde salım deneyleri yapılmıştır; ancak absorbans değerleri eksi değerde okunduğu için kümülatif salım grafiği çizilememiştir. Bu durum pH: 5 iken membran yapılarının bozulmasından dolayı AMP salımının gerçekleşmediği düşünülmüştür.

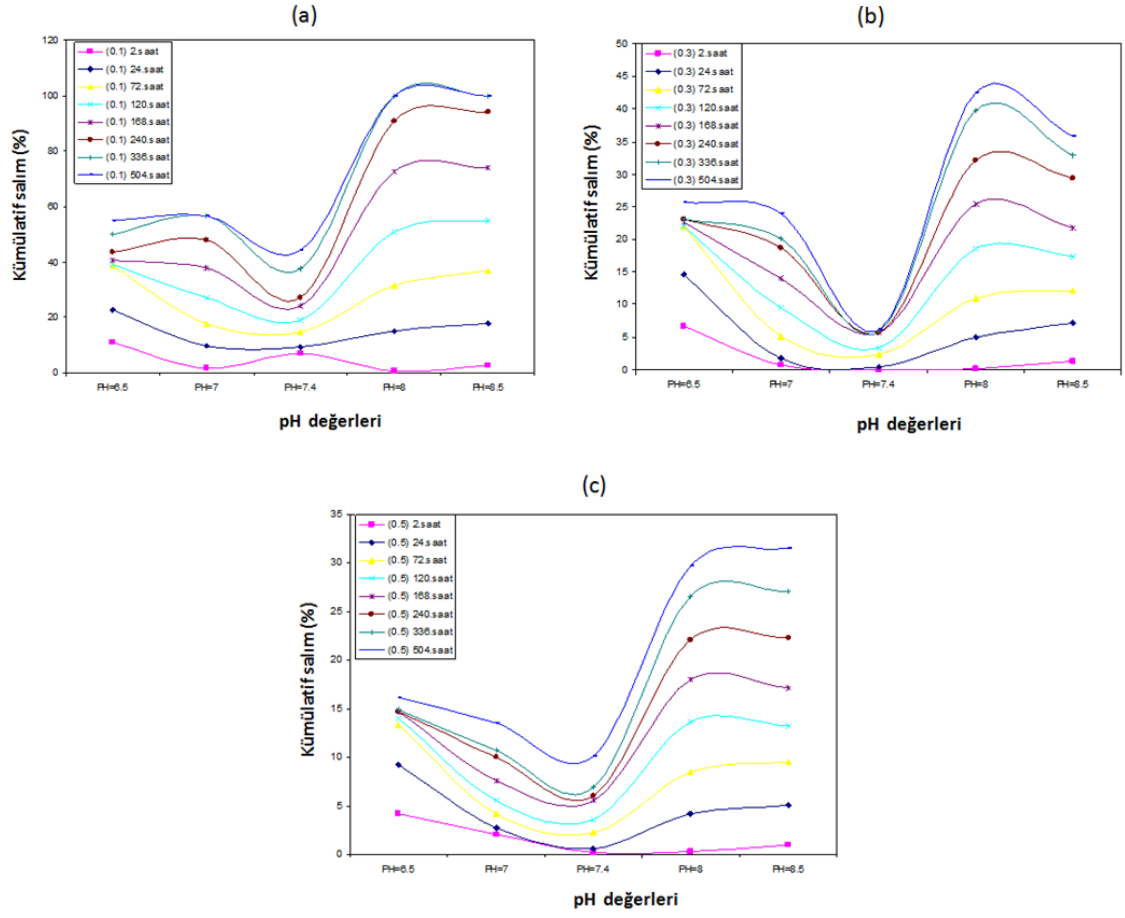


Şekil 4.43 Kümülatif salım grafikleri

Şekil 4.44 verilen grafikler ise farklı miktarlarda AMP içeren membranların farklı pH değerlerine karşı zamanla salınan miktarları karşılaştırmak amacıyla çizilmiştir. Grafikleri incelediğimizde en başta (2. saat) alınan örneklerde asidik ortamda salım miktarları daha fazla çıksa da zaman geçtikçe asidik ortamdan bazik ortama geçildiğinde salım miktarlarının arttığı belirlenmiştir. pH 7.4, asidik ortamdan bazik



ortama geçişte dönüm noktası olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.43-4.44 tüm grafiklere göre bazik ortamda salının daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.44 Farklı pH değerlerine karşı zamanla salınan miktarlar  
AMP yüzdeleri (w/w): a. % 0.1, b. % 0.3, c. % 0.5

## 5. SONUÇ

Sunulan tez çalışması kapsamında, deri doku mühendisliği uygulamalarına yönelik yara örtü malzemesi olarak hazırlanan çift tabakalı nanofiber membranların elektroçirime yöntemi ile üretimi gerçekleştirilmiştir. Çeşitli analiz yöntemleri ile membranların karakterizasyonları yapılmıştır. Antimikrobiyal etkinliğini kanıtlamak için mikroorganizma çalışmaları tamamlanmıştır. Farklı pH değerlerindeki tampon çözeltiler kullanılarak in-vitro salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresince elde edilen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- PHEMA nanofiberlerin üretimi için en uygun elektroçirime parametreleri Etanol/PHEMA (v/v) : 2/1 oranında, 10  $\mu$ L/dk akış hızında, 15 cm uzaklıkta (şırınga iğnesi ucu-toplama paneli) ve 10 kV voltaj değerinde bulunmuştur. Elde edilen fiberlerin ortalama çapı ve çap dağılımı  $98.6 \pm 15.6$  nm'dir.
- PHEMA nanofiberlerin çaplarına etki eden akış hızı, voltaj ve çözeltili derişimi parametrelerinden en önemlisi polimer çözeltilisine eklenecek olan etanol miktarı olduğu SEM görüntüleri incelenerek belirlenmiştir.
- Ayrıca PHEMA nanofiberlerin çapına elektroçirime parametrelerinin etkisi yanıt yüzey yöntemi (RSM) uygulanarak da incelenmiş ve model olarak bulunmuştur. Bu modele göre de en etkili parametre Etanol/PHEMA (v/v) oran olduğu sonucuna varılmıştır.
- RSM uygulanarak elektroçirime yöntemiyle sentezlenen PHEMA nanofiberlerin ortalama çapları ile çalışmanın ilk aşamasında hesaplanan PHEMA ortalama çapları arasında yaklaşık 100 nm gibi bir fark bulunmuş ve bu farkın çok önemli olmadığı düşünülmüştür.
- pH duyarlı membran üretmek amacıyla öncelikle poli(HEMA-ko-AA) kopolimeri sentezlenmiştir. Elde edilen kopolimer çözeltilisinde AA/HEMA oranı (v/v) : 0.2 için fiberlerin oluşmadığı, 0.3 ve 0.4 için ise fiberlerde boncuklar ve kopmalar oluşmasından dolayı farklı kopolimer sentez deneyleri yapılmış; ancak sentezlenen kopolimerlerin çözünmesinde problem yaşanmıştır.
- Yukarıdaki açıklanan durum nedeniyle PHEMA ve PAA içeren polimer karışımının hazırlanmasına karar verilmiştir. Polimer çözeltilisinden fiberlerin

üretimi için en uygun koşul 5  $\mu$ L/dk, 15 cm ve 18 kV bulunmuştur. Ortalama fiber çapı ve çap dağılımı  $70.70\pm 12.08$  olarak hesaplanmıştır.

- Çift tabakalı membranın alt tabakası PCL-jelatin çözeltisi kullanılarak yapılmıştır. Alt tabaka için 1.8 mL/sa, 15 cm ve 18 kV olan elektroğirme parametreleriyle üretilen membrandaki ortalama fiber çapı ve çap dağılımı  $189.79\pm 80.36$  nm bulunmuştur.
- pH değişimi karşısında kontrollü antibiyotik salımı için polimer karışımının (w/w) % 0.1, % 0.3 ve % 0.5'i kadar ampisilin (AMP) çözeltiye eklenerek, AMP yüklü membranlar sentezlenmiştir.
- AMP içeren ve içermeyen çift tabakalı membranların üretiminde kullanılan elektroğirme parametreleri Etanol/PHEMA-PAA karışımı (v/v) : 2/1 oranında, 10  $\mu$ L/dk akış hızında, 20 cm uzaklıkta (şırınga iğnesi ucu-toplama paneli) ve 21 kV voltaj değeri olarak belirlenmiştir.
- Membranların içerdiği % AMP miktarına (w/w) göre ortalama fiber çapları ve çap dağılımları boş (% 0), % 0.1, %0.3 ve % 0.5 için sırasıyla  $350.97\pm 80.18$  nm,  $381.81\pm 73.53$  nm,  $819.40\pm 180.67$  nm ve  $862.58\pm 262.42$  nm olarak hesaplanmıştır. Membranlardaki ampisilin miktarı arttıkça fiber çaplarının arttığı ve fiber çap dağılımındaki homojenliğin azaldığı belirlenmiştir.
- Çift tabakalı membranların yüzey karakterizasyonları, FTIR-ATR spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
- Şişme-büzüşme deneyleri ile membranların pH duyarlılıkları belirlenmiş ve % su içeriği hesaplanmıştır. Maksimum şişmede pH 6.5'dan, 7.0 ve 7.4'e doğru azalma, pH 7.4'den 8.0, 8.5 doğru artma olduğu gözlenmiştir. Ayrıca hesaplanan su alım kapasiteleri AMP yüklü olanlarda daha fazladır (%1100-%1700) ve yara örtü uygulamalarında kullanımı için avantaj sağlamaktadır.
- Membranlara uygulanan mekanik dayanım testlerinden elde edilen veriler ise; boş membranların AMP içeren membranlara oranla 4 kat daha fazla elastik modülüne ve 2.5 kat daha fazla çekme mukavemetine sahip olduğunu göstermiştir.
- PBS tampon çözeltisi ortamında gerçekleştirilen biyobozunurluk deneyleri sonucunda 7 günlük bir periyodun ardından tüm membranlar için ağırlık kayıpları yaklaşık olarak aynı bulunmuş, 14. günde ise en fazla ağırlık kaybı %

0.5 AMP içeren membrandır ve bu membranın % 53.8 oranında bozunmaya uğradığı belirlenmiştir.

- Çift tabakalı membranların antimikrobiyal etkinliğini belirlemek için *E.coli* ve *S. aureus* mikroorganizmaları ile çalışılmıştır. *S.aureus*'a karşı AMP yüklü membranların daha duyarlı olduğu saptanmıştır.
- *In-vitro* salım deneyleri farklı tampon çözeltilerde (pH:5, pH:6.5, pH:7.0, pH:7.4, pH:8.0, pH:8.5) gerçekleştirilerek kümülatif salım miktarları hesaplanmış ve bazik ortamda %0.1 AMP içeren membran için ampisilin salımını %100'e varan kümülatif salım verimliliği ile gerçekleştiği belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Anonymous.2014.WebSitesi:<http://www.acikbilim.com/2013/07/dosyalar/laboratuvardan-yaralarin-uzerine-yapay-deri.html>, Erişim Tarihi: 31.05.2014
- Anonymous.2014.WebSitesi:[http://www.niroinc.com/food\\_chemical/spray\\_drying\\_gelatin.asp](http://www.niroinc.com/food_chemical/spray_drying_gelatin.asp), Erişim Tarihi: 01.06.2014
- Anonymous.2014.WebSitesi:<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/147230>, Erişim tarihi: 01.06.2014
- Altay, P. ve Başal, G. 2010. Yara rtleri, Tekstil teknolojileri elektronik dergisi. 4(1); 109-121.
- Ayutsede, J., Gandhi, M., Sukigara, S., Micklus, M., Chen, H. E. and Ko, F. 2005. Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning. Part 3: characterization of electrospun nonwoven mat. Polymer 46; 1625-1634.
- Basan, H., Gmşderelioğlu, M. and Orbey,T. 2002. Diclofenac sodium releasing pH-sensitive monolithic devices. Int J Pharmaceutics, 245; 191-198.
- Blitterswijk C.V. 2008. Tissue Engineering. Academic Press, 146-178 .
- Brown, N. J., Reed.,M.W.R.,Staton C.A. and Valluru, M. 2011. Transforming growth factor-β and endoglin signaling orchestrate wound healing. Frontiers in physiology, doi: 10.3389/fphys.2011.00089.
- Buchko, C.J., Chen, L.C., Shen, Y. and Martin, D.C. 1999. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. Polymer, no.40; 7397-7407.
- Cárdenas, G., Muņoz C. and Carbacho, H. 2000. Thermal properties and TGA-FTIR studies of polyacrylic and polymethacrylic acid doped with metal clusters. European Polymer Journal, 36; 1091-1099.
- Chen, J.P., Chang, G.Y. and Chen, J.K. 2008. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. Colloids and Surfaces A: Physicochem.eng. aspects, 313, 314,183-188.
- Chong, E.J , Phan, T.T. , Lim ,I.J. , Zhang , Y.Z. , Bay, B.H. , Ramakrishna , S. and Lim, C.T. 2007. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. Biomaterialia,3; 321-330.
- akal, C. 2004. PHEMA bazlı yara/yanık örtü materyalleri. Yüksek Lisans Tezi,Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Dalkıranoglu, S. 2011. EGF ile desteklenmiş PCL/kollajen bazlı nanofibröz doku iskeleleri ile deri doku mühendisliği. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ende, M.T., and Peppas, N.A. 1994. Factors influencing drug and protein transport and release from ionic hydrogels. *Reactive polymers*, 25; 127-137.
- Fellers, C.R. and Griffeths, F.P. 1928. Jelly-strength measurements of fruit jellies by the bloom gelometer. *Industrial and Engineering Chemistry*, August, 857 s.
- Gu, S.Y., Ren, J. and Vancso, G.J. 2005. Process optimization and empirical modeling for electrospun polyacrylonitrile (PAN) nanofiber precursor of carbon nanofibers. *European Polymer Journal* 41; 2559–2568.
- Gümüşderelioğlu, M. 2007. Doku mühendisliğinde nanoteknoloji. *Bilim ve Teknik Özel Eki, Tübitak Yayınları*; 2-3.
- Gümüşderelioğlu, M. and Demirtaş T.T. 2011. Doku mühendisliği ders föyü (BYM 637), Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Hosokawa, R. 2011. The Ministry of Health, Labour and Welfare Ministerial Notification No. 65 Japanese Pharmacopoeia Sixteenth Edition from General Notices to Ultraviolet-visible Reference Spectra; 1784.
- Hsu, C.M. and Shivakumar, S. 2004. N,N-Dimethylformamide additions to the solution for the electrospinning of poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers. *Macromol. Mater. Eng.*, 289 ; 334-340.
- Ji, B.C., Lee, E.M. and Han, Y.A. 2009. The physical properties of poly(2-Hydroxyethyl methacrylate) copolymer hydrogels used as intravaginal rings. *Chinese Journal of Polymer Science*, 27(3); 359-366.
- Kameoka, J., Orth, R., Yang, Y., Czaplewski, D., Mathers, R., Coates, G. and Craighead, H.G. 2003. A scanning tip electrospinning source for deposition of oriented Nanofibres. *Nanotechnology*, 14; 1124-1129.
- Kazaroğlu, N.M. 2009. Yara örtüleri için alternatif doku iskeleleri: In vitro çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kim, S.H., Kim, S., Nair, S. and Moore, E. 2005. Reactive electrospinning of cross-linked poly(2-hydroxyethyl methacrylate) nanofibers and elastic properties of individual hydrogel nanofibers in aqueous solutions. *Macromolecules*, 38; 3719-3723.
- Krupers, M.J., Van Der Gaang, F.J. and Feijen, J. 1996. Complexation of poly(ethylene oxide) with poly(acrylic acid-co-hydroxyethyl methacrylate)s. *European polymer journal*, 32(6); 785-790.

- Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D. and Farson, D. 2007. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, 27;504-509.
- Liu, Q., De Wijn, J. and Van Blitterswijk, C. 1998. A Study on the grafting reaction of isocyanates with hydroxyapatite particles. *J Biomed Mater Res Part A* 40; 257-364.
- Liu, H., Leonas, K.K. and Zhao Y. 2010. Antimicrobial properties and release profile of ampicillin from electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanofiber yarns. *Journal of engineered fibers and fabrics* 5; 10-19.
- März, A., Trupp, S., Rösch, P., Mohr, G.J. and Popp, J. 2011. Fluorescence dye as novel label molecule for quantitative SERS investigations of an antibiotic. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* DOI: 10.1007/s00216-011-5273-z .
- Ma Z., He W., Yong T. and Ramakrishna S. 2005. Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation. *Tissue Eng.*, 11 ; 1149-1158,.
- Montgomery, G.C. 1997. *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley and Sons, New York.
- Montgomery, D.C. and Runger, G.C. 2007. *Applied statistics and probability for engineers*. John Wiley and Sons, New York, fourth edition; 602-617.
- Moulay, S. and Mehdaoui, R. 2004. Hydroquinone/catechol-bearing polyacrylic acid:redox polymer. *Reactive&Functional polymers*, 61; 265-275.
- Prabhakaran, M.P., Venugopal, J., Chan, C.K. and Ramakrishna, S. 2009. Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 5; 2884–2893.
- Pradny, M., Martinova, L., Michalek, J., Fenclova, T. and Krumbholcova, E. 2007. Electrospinning of the hydrophilic poly (2-hydroxyethyl methacrylate) and its copolymers with 2-ethoxyethyl methacrylate. *Central European Journal of Chemistry*, 5(3); 779-792.
- Pulat, M. and Abbasoğlu, U. 1995. Water and antimicrobial agent permeation of PU and PHEMA membranes in relation to their surface and bulk properties. *Journal of biomaterials applications* 9; 363-371.
- Rivas, B.L., Pooley, S.A., Soto, M. and Geckeler, K.E. 1997. Synthesis, characterization, and polychelatogenic properties of poly(acrylic acid-co-acrylamide). *Journal of polymer science:Part A:polymer chemistry*, 35; 2461-2467.

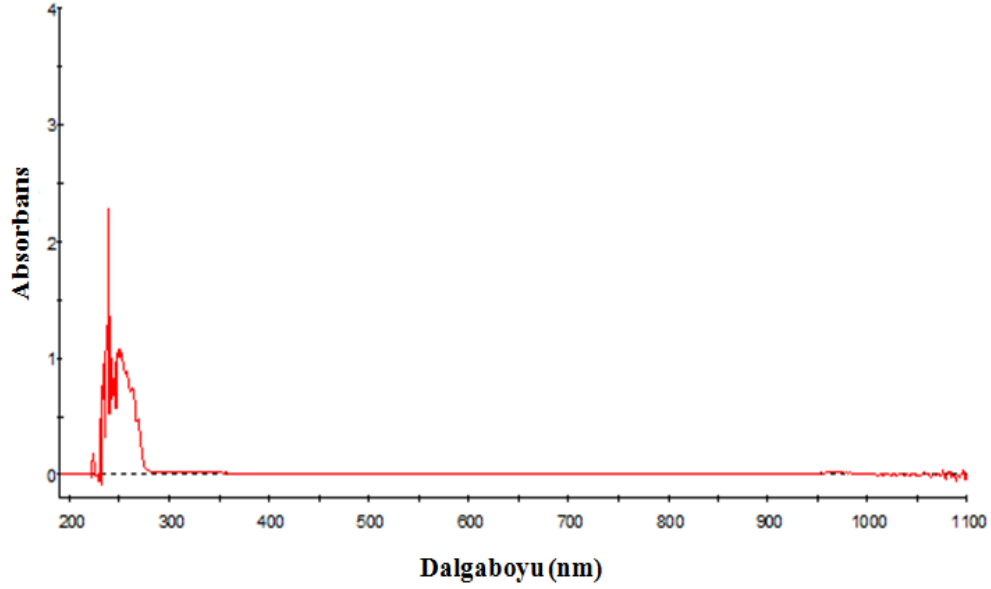
- Rivas, B.L., Quilodran, B. and Quiroz, E. 2005. Metal ion retention properties of poly(acrylic acid) and poly[N-3-(dimethylamino)propyl acrylamide-co-acrylic acid]. *Journal of Applied Polymer Science*, 97; 1385-1394.
- Rizzo, D.C. 2001. *Delmar's Fundamentals of Anatomy and Physiology*. Thompson Learning, 137-142.
- Rutledge, G.C., Li, Y., Fridrikh, S., Warner, S.B., Kalayci, V.E. and Patra, P. 2000. Electrostatic spinning and properties of ultrafine fibers. *National textile center, Annual Report (M98-D01)*; 1-10.
- Sastre, R. and Mateo, J. 1988. Materiales polim ricos en medicina. Aplicaciones de los polimeros en oftalmologia. *Rev Plast Mod* 55; 77-83.
- Sill, T. J. and Recum, H. A. 2008. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29; 1989-2006.
- Sohrabi, A., Shaibani, P. M., Etayash, H., Kaur, K. and Thundat, T. 2013. Sustained drug release and antibacterial activity of ampicillin incorporated poly(methyl methacrylate)-nylon6 core/shell nanofibers. *Polymer*, 54; 2699-2705.
- Son, W.K, Youk, J.H, Lee, T.S. and Park, W.H. 2004. The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*, vol.45; 2959-2966.
- Sukigara, S., Gandhi, M., Jonathan, A., Micklus, M. and Ko, F. 2004. Regeneration of bombyx mori silk by electrospinning. Part 2. Process optimization and empirical modeling using response surface methodology. *Polymer*, 45; 3701–3708.
- Taylor, G.I. 1969. *Proc Roy Soc London*, A313,453 p.
- Tıǧlı, R.S., Kazaroǧlu, N.M., Maviş, B. and Gümüşderelioǧlu, M. 2011. Cellular behavior on Epidermal growth factor (EGF)-immobilized PCL/gelatin nanofibrous scaffolds. *Journal of Biomaterials Science* 2; 207-223.
- Tian,L., Prabhakaran , M. P. , Ding, X., Kai , D. and Ramakrishna S. 2011. Emulsion electrospun vascular endothelial growth factor encapsulated poly(L-lactic acid-co-e-caprolactone) nanofibers for sustained release in cardiac tissue engineering. *Journal of Material Science* 47; 3272–3281.
- Yarımkaya, S. and Basan, H. 2007. Swelling behavior of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-acrylic acid-co-ammonium acrylate) hydrogels. *Journal of macromolecular science,part A: Pure and applied chemistry*, 44(9); 939-946.
- Yördem, O.S., Papila, M. and Menciloǧlu,Y.Z. 2008. Effects of electrospinning parametres on polyacrylonitrile nanofiber diameter: An investigation by response surface methodology. *Material&Desing*, 29; 34-44.



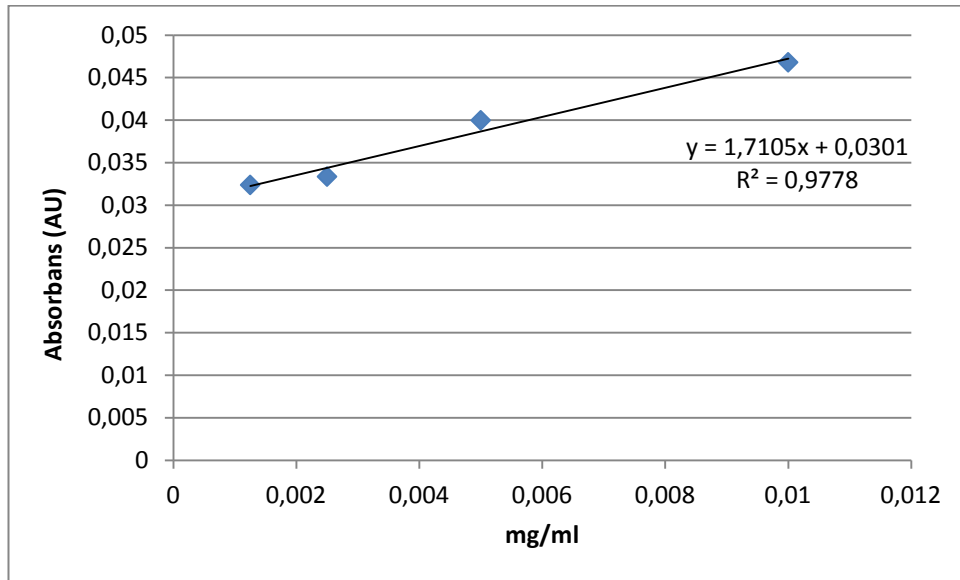
- Yue, Y., Sheng, X. and Wang, P. 2009. Fabrication and characterization of microstructured and pH sensitive interpenetrating Networks hydrogel films and application in drug delivery field. *European polymer journal*, 45; 309-315.
- Xu, X. and Zhou, M. 2010. Antimicrobial gelatin nanofibers containing silver nanoparticles. *Fiber Polym*, 11; 3898–3905.
- Velnar, T., Bailey, T. and Smrkolj, V. 2009. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *The Journal of International Medical Research*, 37; 1528-1548.
- Zecheru, T., Zaharia, C., Salageanu, A., Tucureanu, C., Rusen, E., Marculescu, B., Rotariu, T. and Cincu, C. 2007. Polymeric biocompatible structures for controlled drug release. *Journal of optoelectronics and advanced materials*, 9(9); 2917-2920.
- Ziabari, M., Mottaghitalab, V. and Haghi, A.K. 2009. Application of direct tracking method for measuring electrospun nanofiber diameter. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 26(1);53-62.
- Zhang, B., Lalani, R., Cheng, F., Liu, Q. and Liu, L. 2011. Dual-functional electrospun poly(2-hydroxyethyl methacrylate). *Journal of biomedical materials research A*, 99A(3); 455-466.
- Zhang, B. 2011. Electrospun poly(2-hydroxyethyl methacrylate) nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering. Master thesis, The University of Akron.
- Zhao, S.L., Wu, X.H., Wang, L.G. and Huang, Y. 2004. Electrospinning of ethylcyanoethyl cellulose/tetrahydrofuran solutions. *J. Appl. Polym. Sci.*, 91; 242-246.
- Zhong, X.H., Kim, K.S., Fang, D.F., Ran, S.F., Hsiao, B.S. and Chu, B. 2002. Structure and process relationship of Electrospun bioabsorbable nanofiber Membranes. *Polymer.*, 43; 4403-4412.

## EK 1 Nicel Ölçümler için Dalgaboyunun Belirlenmesi ve Kalibrasyon Grafiği

Bölüm 4.6'da çift tabakalı yara örtüsünden ampicillin salımının izlenmesiyle ilgili deneylerde nicel ölçümün yapılabilmesi için dalga boyunun belirlenmesi ve hesaplarda kullanılan kalibrasyon eğrisi aşağıda verilmiştir.



Şekil 1 Nicel ölçümlerin yapılabilmesi için dalga boyunun belirlenmesi



Şekil 2 Salım deneylerinde kullanılan kalibrasyon grafiği

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşe Nur EROĞLU

Doğum Yeri : Rize

Doğum Tarihi : 03.04.1988

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

### **Eğitim Durumu**

Lise :Batıkent Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi (2006)

Lisans :Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü (2012)

Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı (Eylül 2012- Haziran 2014)

### **Çalıştığı Kurum**

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi-Proje Destek Uzmanı (Mayıs 2013-Aralık 2013)

### **Ulusal Kongre Sunum**

1."Preparation and Characterization of PolyHEMA and Poly(HEMA-AA) Nanofiber Membranes", NanoTR-9 Erzurum 24-28 June 2013, Abstract Book, Oral Presentation;67.

2."Poli 2-hidroksietil metakrilat (PHEMA) Nanofiberlerin Sentezi", Ankara Kimya Mühendisliği Bölümleri Birlikteliği (AKMBB), ODTÜ 16 Mayıs 2014,Poster Sunum.

3."Poli-2-hidroksietil metakrilat (PHEMA) Nanofiber Membranların Elektroeğirme Yöntemiyle Üretiminde Yanıt Yüzey Yönteminin Uygulanması",UKMK-11 Eskişehir 2-5 Eylül 2014, Poster Sunum (Kabul aldığı tarih:15 Mayıs 2014).

4." Antimikrobiyal Çift Tabakalı Yara Örtüsü Tasarımı ",UKMK-11 Eskişehir 2-5 Eylül 2014, Sözlü Sunum (Kabul aldığı tarih:16 Mayıs 2014).