İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

ELEKTRO-EĞİRME YÖNTEMİYLE ELDE EDİLEN KOLLAJEN NANOFİBERLERİN ALTERNATİF YÖNTEMLER KULLANILARAK DAYANIKLILIĞININ ARTTIRILMASI

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Selçuk Kaan HACIOSMANOĞLU

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Murat KAZANCİ

Haziran-2018

ONAY

İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü'nde Yüksek lisans öğrencisi olan Selçuk Kaan Hacıosmanoğlu'nun hazırladığı ve jüri önünde savunduğu "ELEKTRO-EĞİRME YÖNTEMİYLE ELDE EDİLEN KOLLAJEN NANOFİBERLERİN ALTERNATİF YÖNTEMLER KULLANILARAK DAYANIKLILIĞININ ARTTIRILMASI" başlıklı tez başarılı kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ	**İMZA**
Tez Danışmanı:	
[Doç. Dr. Murat KAZANCİ]	.....
Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi	
Üyeler:	
[Prof.Dr. Emine CAN]	.....
Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi	
[Doç. Dr. Şahin UYAVER]	.....
Kurumu: Türk-Alman Üniversitesi	

Tez Savunma Tarihi: 1 Haziran 2018

ETİK İLKELERE UYGUNLUK BEYANI

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü bünyesinde hazırladığım bu Yüksek Lisans tezinin bizzat tarafımdan ve kendi sözcüklerimle yazılmış orijinal bir çalışma olduğunu ve bu tezde;

1- Çeşitli yazarların çalışmalarından faydalandığımda bu çalışmaların ilgili bölümlerini doğru ve net biçimde göstererek yazarlara açık biçimde atıfta bulunduğumu;

2- Yazdığım metinlerin tamamı ya da sadece bir kısmı, daha önce herhangi bir yerde yayımlanmışsa bunu da açıkça ifade ederek gösterdiğimi;

3- Alıntılanan başkalarına ait tüm verileri (tablo, grafik, şekil vb. de dâhil olmak üzere) atıflarla belirttiğimi;

4- Başka yazarların kendi kelimeleriyle alıntıladığım metinlerini kaynak göstererek atıfta bulunduğum gibi, yine başka yazarlara ait olup fakat kendi sözcüklerimle ifade ettiğim hususları da istisnasız olarak kaynak göstererek belirttiğimi,

beyan ve bu etik ilkeleri ihlal etmiş olmam halinde bütün sonuçlarına katlanacağımı kabul ederim.

Selçuk Kaan HACIOSMANOĞLU

[İmza]

Teşekkürler,

Tez dönemim boyunca hem literatür hem de deneysel çalışmalarımda yardımını ve desteğini benden esirgemeyen, değerli fikirleriyle bana yol gösteren ve bilimsel olarak çok şey katan kıymetli danışmanım Doç. Dr. Murat KAZANCİ 'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Bütün hayatım boyunca olduğu gibi, yüksek lisans öğrenimim boyunca her türlü zorlukta yanımda olan, hiçbir şekilde yardımlarını esirgemeyen, gerek maddi gerek manevi desteklerini eksik etmeyen, bir gölge misali sürekli arkamda olan, babam Yıldıray HACIOSMANOĞLU ve annem Tülin HACIOSMANOĞLU'Na ve kardeşlerime en içten teşekkürlerimi sunarım.

İyi ki varsınız.

Haziran 2018 Selçuk Kaan HACIOSMANOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER ..... **i**
Kısaltmalar ..... **iii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **iv**
TABLO LİSTESİ ..... **v**
Özet ..... **vi**
Summary ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
2. Kollajen **4**
2.1 Jelatin 6
3.ELEKTRO-EĞİRME **7**
3.1. Elektro-eğirme Parametreleri 9
3.1.1. Polimer çözeltisine bağlı parametreler 9
3.1.2 Üretim Parametreleri 12
3.1.3 Çevresel Parametreler 13
4. ÇAPRAZ-BAĞLAMA **14**
5. DENEYSEL KISIM **15**
5.1 Kollajen Ekstraksiyon 15
5.1.1 Sıçan Kuyruğundan Kollajen Ekstraksiyonu 15
5.1.2 Sığır Derisinden Kollajen Eldesi 17
5.2 Elektro-Eğirme 18
5.2.1 Solüsyon Hazırlanması 19
5.2.2 Elektro-eğirme Prosedür 19
5.3 Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FT-IR) 20
5.4 Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi 21
5.5 Diferansiyel Taramali Kalorimetre (DSC) 21
5.6 UV Spektrofotometre 22
6. DENEYSEL KISIM SONUÇLARI **24**
6.1 Kollajen Ekstraksiyon Sonuçları 24
6.1.1 FT-IR Sonuçları 24
6.1.2 CD Sonuçları 26
6.2 Çapraz-Bağlama Sonuçları 27
6.2.1 Klasik Yöntem Çapraz-Bağlama 27
6.2.2 Bulk Çapraz-Bağlama 28
6.3 DSC Sonuçları 30
6.3.1 Bulk Çapraz-Bağlama Sonuçları 30
6.3.2 In-situ Çapraz-Bağlama Sonuçları 32
6.4 FT-IR Sonuçları 34
6.4.1 Bulk Çapraz-Bağlama Sonuçları 34
6.4.2 In-situ FT-IR Sonuçları 35
6.5 UV Spektrofotometre Sonuçları 36

6.5.1 Çözücü olarak su ile elde edilen sonuçlar 36
6.5.2 Çözücü olarak etanol ile elde edilen sonuçlar 37
6.6 Çözünürlük Deneyi 40
7.TARTIŞMA 42
7.1 Kollajen Ekstraksiyon 42
7.2 In-situ Çapraz-Bağlama 43
Kaynakça 44
Özgeçmiş 47

KISALTMALAR

A.A: Asetik asit

CYS: Sistein

DMF: Dimetilformamid

ECM: Hücreler arası ortam

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide hidroklorid

GEN: Genipin

GLY: Glisin

GTA: Gluteraldehit

HCl: Hidroklorik Asit

HPR: Hidroksiprolin

NHS: N-Hidroksisukkinimid

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

PRO: Prolin

TFE: 2,2,2-Trifluoroetanol

TG: Transglutaminaz

TRP: Triptofan

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. Kollajenin hiyerarşik yapısı 6
Şekil 2. Elektro-eğirme sisteminin şematik gösterimi..... 7
Şekil 3. Yatay sistem elektro-eğirme cihazı 8
Şekil 4. Dikey sistem elektro-eğirme cihazı 9
Şekil 5. (a) Sıçan kuyruğundan tendon çekim işlemi (b) kuyruktan çekilen tendonlar 17
Şekil 6. (a) Folyo üzerine tpolanan nanofiberler (b) nanofiberlerin optik mikroskop görüntüsü 20
Şekil 7. Ninhidrin solüsyonu ile mavi renk oluşturan numuneler..... 23
Şekil 8. Kollajen ekstraksiyon FT-IR grafiği 24
Şekil 9. Kollajen ekstraksiyon işleminin CD grafiği 26
Şekil 10. Klasik yöntem uygunlanmış nanofiberlerin (a) önceki ve (b) sonraki halleri..... 28
Şekil 11. Çapraz-bağlama ajanı katılmamış jelatin çözeltisi 29
Şekil 12. (a) Genipin (b) gluteraldehit (c) EDC-NHS kombinasyonu (d) transglutaminaz enzimi ile hazırlanan jelatin solüsyonları..... 29
Şekil 13. (a) Toz jelatin için DSC grafiği (b) genipin bulk çapraz-bağlama için DSC grafiği (c) gluteraldehit bulk çapraz-bağlama için DSC grafiği..... 31
Şekil 14. (a) Kontrol nanofiber için DSC grafiği (b) Genipin ile çapraz-bağlanan nanofiber için DSC grafiği (c) Gluteraldehit ile çapraz-bağlanan nanofiber için DSC grafiği 33
Şekil 15. Bulk çapraz-bağlama için FT-IR grafikleri 34
Şekil 16. In-situ çapraz-bağlanan nanofiberler için FT-IR grafiği 35
Şekil 17. (a) Su eklenmeden önce nanofiberler (b) su eklendikten sonra kontrol nanofiberler 40
Şekil 18. Su içerisindeki nanofiberlerin zamana göre dayanımları 41

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1. En çok bilinen kollajen türleri ve vücutta bulunduğu yerler 5
Tablo 2. Su ile yapılan ölçümün referans eğrisi sonuçları 37
Tablo 3. Su ile ölçülen UV testinin numune sonuçları..... 37
Tablo 4. Etanol ile yapılan ölçümün referans eğrisi sonuçları..... 38
Tablo 5. Etanol kullanılarak yapılan ölçümün numune sonuçları..... 39

ÖZET

Kollajen doğada farklı hayvansal kaynaklarda en sık rastlanan protein türüdür. Yirmiden fazla türü olmakla birlikte, Tip I; deri, kemik, tendon, ligament gibi yapılarda en fazla rastlanan çeşididir. Biyomedikal uygulamalarda karşılaşılan en büyük sorunlardan bir tanesi kullanılan malzemenin toksik etki göstermesidir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda kollajenin kayda değer bir toksik etki göstermemesi, kollajenin biyomedikal uygulamalarda yaygın bir kullanım alanına sahip olmasına sebep olmuştur. Kullanıma uygun hale getirmek için kollajenin farklı formlarda (film, membran, fiber) yeniden üretilmesi gerekmektedir. Kollajen, ekstraselüler matriksin yapısında, fiber formunda bulunduğu için, biyomedikal ve doku mühendisliği gibi alanlarda kullanımı açısından bu formda üretimi özellikle önem kazanmaktadır. Bunun için önerilen metot ise elektriksel eğirme işlemidir. Elektriksel eğirme yöntemi kolay, ucuz ve kısa zamanda fiber üretimi için uygun bir tekniktir. Aynı zamanda gerekli parametreler değiştirildiği takdirde fiber çapı nanometre boyutlarına kadar indirilebilmektedir. Bunun yanında elektriksel eğirme yöntemi kesintisiz fiber üretimini sağlayan, bilinen tek teknik olma özelliğine de sahiptir.

Kollajenin yaygın olarak kullanılmasının önündeki en önemli problemler; ekstraksiyon yöntemlerinin uzun sürmesi, pahalı olması, çok aşamalı ve üretim sonrası verimi düşük prosedürlerden oluşmasından kaynaklanmaktadır. Kollajenin yurt dışından temin yoluna gidildiğinde ise dışarıya önemli miktarda kaynak aktarımı söz konusudur (Ülkemizde şuan için kayda değer bir kollajen üretimi yapılamamaktadır). Tüm bu sorunları aşabilmek için, önerilen bu proje ile kendi kollajen hammaddemizi, şimdiye kadar kullanılan ve uzun zaman alan yöntemlerde bazı modifikasyonlar yaparak, üretmeyi hedeflemekteyiz.

Şimdiye kadarki yaptığımız çalışmalarda kollajen nanofiber üretimi gerçekleştirilmiş, kollajenin doğal yapısına çözeltilerin etkisi, elektriksel eğirme metodunun ve

uygulanan farklı işlemlerin etkisi başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Ancak karşılaştığımız en önemli sorun, farklı biyolojik ve biyomedikal uygulamalar için düşünülen bu ürünün suda kolayca çözünmesidir. Literatürdeki çalışmalar, ağırlıklı olarak fiziksel ve kimyasal çapraz bağlama tekniklerini içermektedir. Fiziksel çapraz bağlama yöntemlerinin en önemli dezavantajı kollajenin doğal yapısını bozması ve istenilen özellikleri kazandıramamasıdır. Kimyasal çapraz bağlama yöntemlerinde ise nanofiberlerin çözünme hızı, çapraz bağlanma hızına göre daha yüksek olduğunda, işlem gerçekleşmeden nanofiberler deforme olup şeklini kaybetmektedir. Bu da son üründe beklenilen fiber morfolojisinin korunamamasına sebep olmaktadır. Bu sebeple önerilen bu projede iki temel yöntemde gözlenen zafiyetin ortadan kaldırılması için iki aşamalı ve iki temel yöntemin birleştirilmesinden oluşan yeni bir prosedür yenilikçi bir yaklaşım olarak sunulmaktadır.

İlk aşamada dört farklı ajanın birbiriyle karşılaştırılması amacıyla, (Genipin, Transglutaminaz, EDC(1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide hidroklorid)-NHS(N-Hidroksisukkinimid), Gluteraldehit), elektriksel eğirme için hazırlanan dört farklı kollajen solüsyonu içine ayrı ayrı katılarak nanofiber üretimi esnasında yapının sağlamlaştırılması (in-situ bağlama) amaçlanmaktadır. Bu şekilde kollajenin fizyolojik şartlara dayanıklılığı arttırılırken, morfolojik yapısının da önemli ölçüde korunması planlanmaktadır. Böylelikle rejeneratif tıp ve biyomedikal gibi alanlarda kullanımı yaygınlaşacaktır.

Anahtar Kelimeler: kollajen, ekstraksiyon, elektro-eğirme, nanofiber, çapraz-bağlama

SUMMARY

Collagen is the most common animal-derived protein in Nature. Even though there are more than twenty types of collagen, Type I is the most common one that could be found in skin, bone, tendon and ligament. This is the reason it has recieved attraction as an alternative biomaterial to be used in different biomedical applications to avoid any toxic effect. It is necessary to regenerate collagen in different forms (film, membrane, fiber) to be able to answer different demands. Extracellular matrix (ECM) is one of the components that contain collagen in nanofiber forms and electrospinning technique is the best suitable method to imitate the ECM nanofiber structure. Electrospinning is inexpensive, easy, efficient and robust method for fiber production. It is possible to produce fibers from micro diameter to nano diameter by changing the certain parameters. Moreover, the electrospinning is the only technique to produce continues nano scale fibers.

The main limiting factor for collagen to become a common biomaterial is the extraction methods that are time consuming, expensive, inefficient and consist of many further purification steps. Main collagen production companies are located abroad, as a result, a significant amount of money transfer to foreign countries (There is no collagen production in Turkey, only gelatin production is possible). In order to solve this problem, we are aiming to produce our own collagen raw material with some modifications in established techniques.

In our previous publications, we have already successfully produced collage nanofibers. The effect of different solvents, production techniques and electrospinning process itself on natural structure of collagen were successfully investigated. Even though the physical structure of ECM was successfully imitated, the main problem of these nanofibers' applications in biological and biomedical fields is their degradation in physiological conditions. Until now, the major works in the literature focus on the chemical and physical crosslinking of collagen nanofibers. The main disadvantage of physical crosslinking method is the ineffectiveness for fiber degradation and lack of required strength values. The main problem with the chemical crosslinking method is the rate of collagen degradation is faster than the rate of crosslinking is. Therefore, the nanofibers cannot preserve their fiber forms in solvent during the process. To be able

to tackle these major problems, we propose to use two steps process, simple combining these two major techniques in a noble way.

As a first step, four different crosslinkers (Genipin, Transglutaminaz, EDC-NHS, Gluteraldehide) will be added separately into different electrospinning solution to compare their effectiveness. In this way, the crosslinking will be realized during electrospinning process that called as in-situ crosslinking. As a second step, in-situ crosslinked collagen nanofibers will be collected on lamellae that dipped into genipin solution and dried over night before the deposition of the collagen nanofibers. The second step is mainly physical crosslinking method. The fibers will not be just cross-linked, but also the degradation will be avoided, and the fibers morphology will be preserved. We expect that this approach will increase the usage (broaden the application) of collagen nanofibers in biological and biomedical field.

Keywords: collagen, extraction, electrospinning, nanofiber, crosslink

1. GİRİŞ

Nano kelimesi Yunanca 'da "cüce" anlamına gelmektedir. Kelime anlamından da anlaşılabileceği gibi "Nanobilim ve Nanomühendislik" 'de oldukça küçük boyutlarla ilgilenen bir bilim dalıdır. Nanometre ölçü birimi olarak metrenin bir milyarda birine eşittir. Başka bir deyişle ifade etmek gerekirse 1 metre(m) = 10^{-9} nanometre(nm) 'ye eşittir. Gözümüzde daha iyi canlanması açısından Dünya'yı 1 metre olarak kabul edersek, bir bilye yaklaşık olarak 1 nanometre olmaktadır. Bir nanometre ölçü birimine ancak 2-3 atom sığmaktadır. Bu sebeple, ancak yaklaşık 1000 atom bir araya gelerek nano ölçekte bir malzemeyi oluşturabilmektedir. Ortalama 50 nanometrenin altındaki boyutlarda geleneksel fizik kuralları ortadan kalkar ve " kuantum fiziği kuralları" devreye girer. Bu kuralların devreye girmesi ile malzemelerin iletkenlik, renk, sıcaklığa dayanıklılık, esneklik veya sertlik gibi özelliklerinde değişiklikler meydana getirir. Bu değişiklikler ise endüstriyel anlamda her açıdan çık daha iyi çözüm olanağı sağlaması açısından önemlidir.

Nanobilim' in doğuşu, ünlü fizikçi Richard Feynman'ın "There is plenty of room at the bottom" (aşağıda daha çok yer var) başlıklı konuşmasıyla başlar (Feynman, 1960). Feynman bu konuşmasında dinleyicilerine, atomların ve moleküllerin kontrol edilebileceğini vurgulamıştır. 1981 yılında "Taramalı Tünelleme Mikroskobu(STM) (1981) ve "Atomik Kuvvet Mikroskobu'nun(AFM)" bulunması ve diğer bir ünlü fizikçi Norio Taniguchi' nin ilk olarak "Nanoteknoloji" terimini kullanması ile Nanobilim ve Nanomühendislik bilim dalının yaptığı araştırma alanı Nanoteknoloji adını almıştır (Taniguchi, 1974). Taramalı tünelleme mikroskobunun (STM) keşfiyle birlikte iletken yüzeyler atomik seviyede incelenebilmiş, çekirdek çevresindeki elektronların üç boyutlu haritası çıkartılabilmiştir. Bunun nanobilim için büyük bir buluş olmasının sebebi, daha önceki mikroskoplarla (elektron mikroskobuyla bile) tek bir atoma odaklanıp onu oluşturan çekirdek ve elektronlara dair bir resim elde edebilmenin mümkün olmamasıdır. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) da taramalı tünelleme mikroskobu gibi yüzeylerin atomik özelliklerini incelemeyi sağlar ancak diğer mikroskobun yapamadığı bir şeyi daha yapar; iletken olmayan yüzeyleri

inceleme imkânını da sunar. İki mikroskop da birbirinden çok farklı tekniklerle yüzeydeki atomlar hakkında bilgi sağlarken AFM'nin görüntü kalitesi STM'ye göre daha düşüktür.

Ortaya çıktığı günden bu yana nanoteknoloji popülerliğini artarak sürdürmüştür. Bu kadar popüler olmasının sebepleri arasında, daha önceki bilim dallarına kıyasla, tek bir alana bağlı kalmayıp tamamen multidisipliner bir araştırma alanı olması ve uygulama alanlarının çok geniş olması gösterilebilir. Yapılan çalışmaların içeriğinde fizik, kimya, biyoloji gibi temel bilimlerin yanı sıra daha spesifik mühendislik alanların da olması bir çok farklı daldan bilim adamının bir araya gelmesine imkan sağlamıştır. Nano-Biyoteknoloji, nanomalzemelerin üretimi, tıp ve sağlık, çevre ve enerji, elektrik-elektronik ve bilgisayar teknolojiler, uzay ve havacılık çalışmaları gibi konularda çalışma ve uygulama imkânı olması, bu popülerliğini koruması ve giderek arttırmasına ile sonuçlanmıştır (www.understandingnano.com, 2007).

Nano malzemelerin üretimleriyle ilgili yöntemler iki başlık altında toplanmaktadır. Bunlar; "Yukarıdan aşağı üretim"(top-down) ve "Aşağıdan yukarıya üretim"(bottom-up) olarak sıralanmaktadır (Biswas, ve diğerleri, 2012). Yukarıdan aşağı üretim metodu, büyük maddelerden küçük maddelerin elde edildiği üretim yöntemidir. Başka bir deyişle maddelerin boyutlarını küçültmeye yönelik yöntemleri içerir. Aşağıdan yukarıya üretim metodu ise küçük moleküllerden büyük moleküller in elde edildiği yöntemlerdir. Elektro-eğirme işlemi ile nanofiber üretimi de yukarıdan aşağı üretim yöntemlerine bir örnektir.

Nano malzemeler genel olarak üç grupta incelenmektedir (Stone, ve diğerleri, 2010). Bu üç grup, nanopartiküller, nanotüpler ve nanofiberlerdir. Nanopartiküller, nano boyutlarda içi boş partiküllerdir. İlaç ve kozmetik alanında bir ilaç veya bir molekülün hedefe yönelik taşınma işlemlerinde yaygın olarak kullanılır. Nanotüplerin en yaygın ve bilinen örneği karbon nanotüplerdir. Yüzey-hacim oranları oldukça fazladır. Öyle ki çapları nanometre boyutundayken uzunlukları mikron boyutlarına kadar çıkabilir. Oldukça dayanıklı olmalarının yanı sıra esneklik özellikleri de fazladır. Elektriği iyi iletmelerinden dolayı yarı-iletken teknolojileri, elektrik-elektronik ve bilgisayar teknolojileri gibi alanlarda sıklıkla kullanılmaktadırlar (Herrera-Herrera, Gonzalez, Borges, & Rodriguez, 2012). Nanofiberler de aynı şekilde çapları nanometre

boyutlarındayken uzunlukları mikrometre boyutlarını kadar çıkabilir. Gözenekli yapıda olmaları tıp ve hücre kültürü çalışmalarında kullanımlarını elverişli hale getirmiştir. Birçok yolla ve birçok malzemeden üretilebilmeleri ise diğer bir avantajlarıdır. Kullanım alanları oldukça geniş olmakla birlikte, nanofiberin üretildiği malzeme ve yöntemle de alakalı olarak, doku mühendisliği, ilaç taşınımı, tekstil, tarım, uzay uygulamaları ve savunma sanayi şeklinde sıralanabilir (Wei, 2012).

2. KOLLAJEN

Kollajen kelimesinin kökü Yunancaya dayanmaktadır.”Kolla” kelimesi bu dilde yapıştırıcı anlamına gelmektedir. Böylelikle kelimenin kökeni de bu yapının görevine ışık tutmaktadır. Biyopolimerler canlı organizmalar tarafından üretilen polimerlerdir. Selüloz, nişasta, kitin, proteinler, peptidler, DNA ve RNA biyopolimerlere örnek olarak gösterilebilir. Sayılan bu biyopolimerler sırasıyla şeker, amino asit ve nükleotid adı verilen monomerlerden oluşmaktadır (Mohanty, Misra, & Drazel, 2005) .

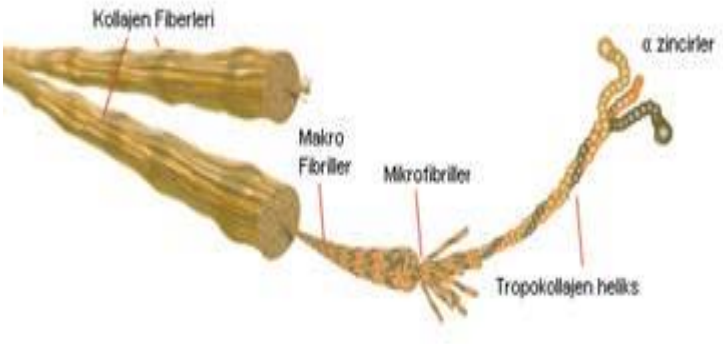
Vücut içerisinde tanımlanmış yaklaşık olarak 20 adet kollajen tipi mevcuttur (Bornstein & Sage, 1980). Her farklı tipin bulunduğu yerler ve görevleri değişmektedir. Bazı kollajen tipleri ve vücutta bulundukları yerler Tablo 1’de gösterilmiştir. Kollajen ailesi, lif oluşturucu kollajen, liflerarası bağ kurucu kollajen, ağ oluşturucu kollajen, zarlar arası kollajen, bazal membran kollajeni ve bunun benzeri birçok eşsiz göreve sahiptir. Kollajen deri, tendon, kemik, ligament kıkırdak gibi yapılar dahil olmak üzere tüm vücut proteinlerinin %30’unu oluşturan fibröz bir proteindir ve bu yapıların temel yapı taşı görevindedir. İnsan vücudunda en bol bulunan kollajen tip 1 kollajendir. Tip 1 kolajen kemiklerin %90'dan fazlasını oluşturur ve bununla birlikte tendon, bağ doku, kornea gibi birçok bağ dokuda bulunur. İnsan cildinin %80'inde ana bileşen olarak bulunur. Geriye kalan kısmını ise büyük oranda tip 3 kolajen oluşturur (Sibilla, Godfrey, Brewer, Budh-Raja, & Genovese, 2015).

Tablo 1. En çok bilinen kollajen türleri ve vücutta bulunduğu yerler

Kollajen Tipleri	Bulunduğu Yer
Tip 1	Deri, tendon, ligament ve kemikler
Tip 2	Kıkırdak, omurlar
Tip 3	Cilt,damar,akciğer, karaciğer, dalak
Tip 4	Bazal lamina, epitel doku
Tip 5	Akciğer, saç, fetal membran ve kemik

Fiziksel özellikleri sayesinde cildimizde yoğun bir ağ tabakası oluşturarak, kemik ve kıkırdaklarda olduğu gibi, cildimizi de yapısal olarak sağlamlaştırır. Elastin ile birlikte cildimizin hücrelerarası (ECM) ortamını oluşturarak esneklik ve dayanıklılık katar.Kollajenin sentezi fibroblastlar aracılığı ile bağ dokuda gerçekleşir.

Kollajenin temel yapısı üç adet çoklu alfa prolin zincirinden oluşur. Kollajenin hiyerarşik yapısı Şekil1'de gösterilmiştir. Bu zincirlerdeki her 3 aminoasitten birinin glisin(GLY) olması, kollajenin en karakteristik özelliği olan üçlü alfa sarmal yapının oluşmasında önemli bir rol oynar (Engel & Bachinger, 2005). Bu prolin zincirlerindeki aminoasitlerin genel dizilimi "GL-1-2" şeklinde olmakla birlikte, 1 ve 2 numaralı aminoasitler büyük oranda prolin(PRO) ve prolinin hidroksillenmiş hali olan hidroksiprolin(HPR) 'dir (Fratzl, 2008). Bunun yanında 1 ve 2 konumlarında, triptofan (TRP) ve sistein (CYS) hariç DNA'nın kodladığı diğer 16 aminoasitten herhangi biri bulunabilir. Genel olarak kolajenin yapısında TRP ve CYS bulunmaz (Galian & Bowes, 1977). Kollajenin oluşmasında hidrojen bağları da önemli rol oynar. Bu bağlar, hem alfa zincirleri arasında hem de su ile gerçekleşmektedir. Bir alfa zincirdeki GLY ile komşu alfa zincirdeki 2 numaralı aminoasidin karboksil grubu arasındadır (Brinckmann, Nothbom, & Müller, 2005).



Şekil 1. Kollajenin hiyerarşik yapısı

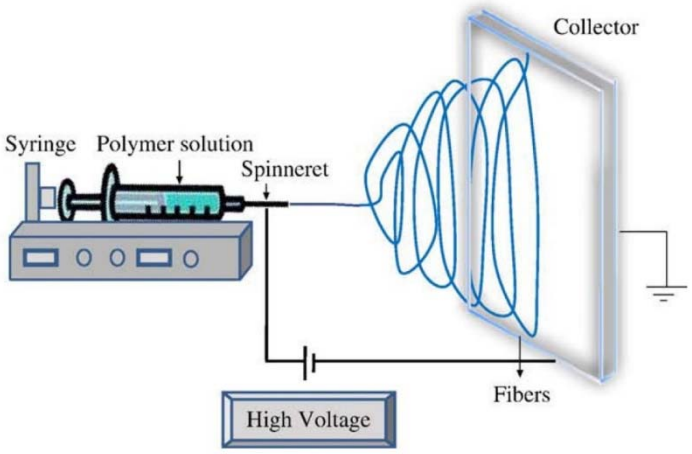
Kollajen hayvanlar âleminde en bol bulunan proteindir (Duan & Sheardown, 2005). Bundan dolayı, deri, kemik, kıkırdak gibi hayvansal kaynaklardan rahatlıkla ekstrakte edilebilir. Ekstrakte edilen kollajen çeşitli işlemlerle saflaştırılarak liyafilizasyon, döküm veya diğer işlemlerden geçirilerek, kullanım amacına uygun olarak lif, sünger, jel veya film halinde işlenebilir. Kollajenin hücre bağlama kapasitesi, yüksek mekanik mukavemeti, biyo-uyumlu ve biyo-bozunur olması bilim dünyasında, tıp ve farmösatik endüstrisinde etkin bir biyomateryal olmasına sebep olmaktadır (Fratzl, 2008).

2.1 Jelatin

Jelatinin kollajenin yapısal ve kimyasal bozunmasının bir ürünü olduğu iyi bilinmektedir (Kozlov & Burdygina, 1983). Kollajen maddesi asit içerisinde çözüldükten sonra 40°C üzerinde hidrolize edilir ve üçlü sarmal yapısı geri dönüşümsüz olarak bozulur (Hinterwaldner, 1977). Jelatinin ana maddesi olan kollajenin molekül ağırlığı 330 kDa'dur (Engel & Bachinger, 2005). Kollajen molekülünün kısmi hidrolizasyonu sonucunda, karakteristik üçlü sarmal yapısı bozulur ve molekül ağırlığı yaklaşık 30 kDa olan jelatin molekülleri oluşur. Sonuç olarak kollajen ve jelatin bir çok özellik bakımından birbirine benzerken, aralarındaki en büyük fark, uygulanan sıcaklık nedeniyle kollajen alfa zincirleri arasındaki hidrojen bağlarının yıkılması sonucunda en karakteristik özelliği olan 3'lü sarmal yapısını kaybetmesidir (Kozlov & Burdygina, 1983).

3.ELEKTRO-EĞİRME

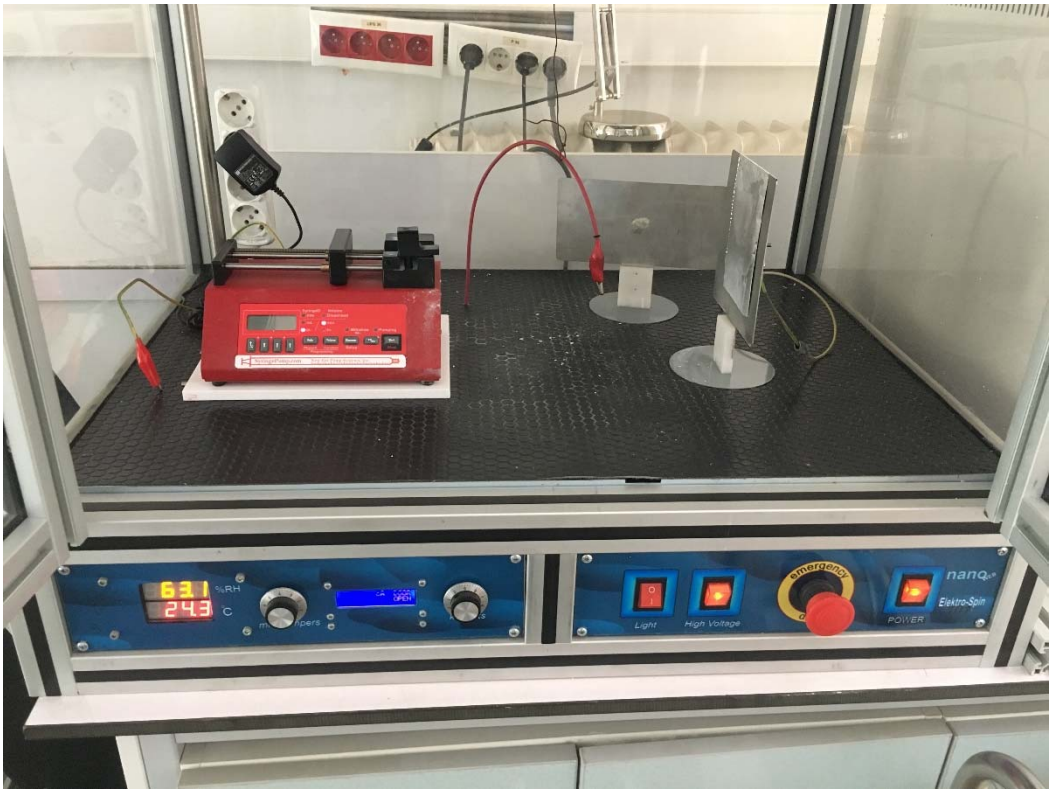
Literatürde bulunan nanofiber üretim teknikleri arasında sonsuz uzunlukta ve sürekli yapıda nanofiber üretimine imkân sağlayan tek yöntemdir (Bhardwaj & Kundu, 2010). Elektro-eğirme cihazı genel olarak bir yüksek voltaj sağlayıcı, bir şırınga pompası ve bir toplayıcı üniteden oluşmaktadır. En yaygın kullanılan nanofiber üretim yöntemi olan elektro-eğirme, uygulanan yüksek voltaj sayesinde oluşturulan elektrik alan ile solüsyondan fiber çekimi prensibine dayanmaktadır. Şırınga pompası aracılığı ile belirli bir hızda akışı sağlanan polimer çözeltisi, küt ağızlı iğne ucunda koni şeklinde bir yapı oluşturmaktadır. Bu koni literatürde "Taylor Konisi" olarak geçmektedir (Kumar, ve diğerleri, 2012). Taylor konisinde bir yüzey gerilimi mevcut olduğundan, uygulanan elektrik alan bu yüzey gerilim kuvvetini aşması sonucunda, topraklanma bağlantısı yapılmış olan toplayıcı üniteye doğru fiber çekimi gerçekleşmektedir. Elektro-eğirme sistemi şematik olarak Şekil 2'de gösterilmiştir.



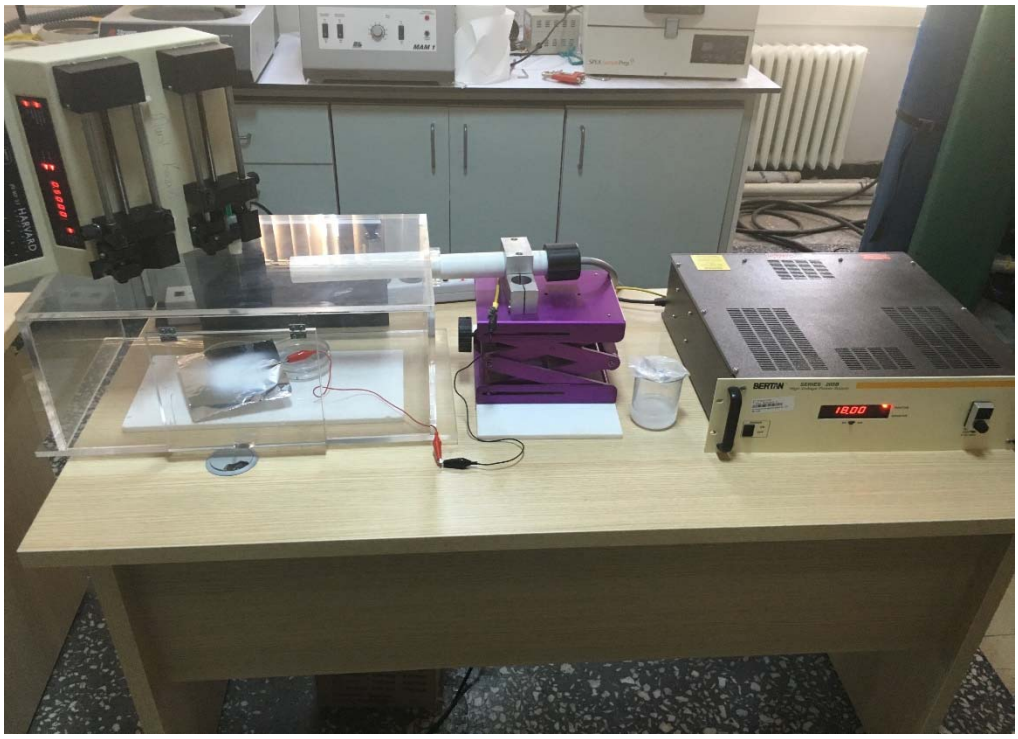
Şekil 2. Elektro-eğirme sisteminin şematik gösterimi

(http://polybiolab.ippt.pan.pl/18-few-words-about/17-electro-spinning)

Üç temel parçadan oluşan bu sistem, kullanılacak olan malzeme çeşidine de bağlı olarak, yatay veya dikey olarak kurulabilir. Her ikisi sisteminde kendine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Molekül ağırlığı büyük olan malzemelerde, yer çekimi etkisi de dikkate alındığında, yatay sistem, toplanan malzemenin toplayıcı üniteye ulaşması bakımından zorlaşmakta ve üretilen malzemenin miktarında azalmaya sebep olması ile bir dezavantaj oluşturmaktadır. Bunun yanında dikey sistemde, polimer çözeltisinin direkt toplama ünitesi üzerine damlama ihtimali olması ve sürekli kontrol gerektirmesi bu sistemin bir dezavantajıdır. Laboratuvarımızda kullandığımız yatay ve dikey sistemli elektro-eğirme cihazları Şekil 3 ve 4'de gösterilmiştir. Dikey sistemin kurulumu tamamıyla bize aittir.



Şekil 3. Yatay sistem elektro-eğirme cihazı



Şekil 4. Dikey sistem elektro-eğirme cihazı

Her sistemde olduğu gibi elektro-eğirme işlemine de belirli parametreler etki etmektedir. Bu parametreler üç ana başlık altında toplanmaktadır. Bu üç başlık; polimer çözeltisine bağlı parametreler, üretim paarametreleri ve çevresel parametreler olarak sıralanabilir. Elektro-eğirme işlemini etkileyen parametreler aşağıda başlıklar halinde açıklanmıştır.

3.1. Elektro-eğirme Parametreleri

3.1.1. Polimer çözeltisine bağlı parametreler

Çözücü Cinsi

Çözücü cinsi dört farklı özellik açısından üretilen nanofiber morfolojisini etkilemektedir. Bunlar; iletkenlik, yüzey gerilimi, dielektrik özellik ve uçuculuktur. Çözücü seçimi literatürde kesin kriterlerle belirlenmemiş olup çoğu çalışmada deneme yanılma yolu ile tespit edilmektedir (Andrady, 2008). Bundan dolayı literatürde, aynı tip polimer için birden farklı çözücü alternatifi bulmak mümkündür. Üretilen nanofiberin sonraki uygulama alanı, farklı çözücüler arası seçim yapma konusunda yardımcı olabilir. İdeal çözücü seçiminde önemli olan nokta, elektro-eğirme işlemi sırasında şırınganın ucundan çekilen fiberlerin toplama ünitesine ulaşıncaya kadar

geçen sürede çözücünün buharlaşmasıdır. Bu buharlaşma sağlanmadığı takdirde toplayıcı ünitede ıslak olarak birikir ve dolayısıyla istenilen fiber morfolojilerini kaybetmiş olurlar. Yuya ve diğerleri (2010) polivinilpirolidon ile yaptıkları çalışmada, %10 konsantrasyon ve %30 nem oranını sabit tutarak, çözücü olarak metanol, etanol, ve su ve dimetilformamid e (DMF) karışımını kullandılar. Etanol ve metanol kullanarak ürettikleri fiberler daha kuru ve düzgün morfolojili olurken su ve DMF kullanarak ürettikleri fiberler ıslar ve bozuk morfolojide gözlemlenmiştir.

Konsantrasyon Etkisi

Nanofiber üretiminde polimer çözeltisine bağlı parametreler arasından en kritik parametre oluşturulan çözeltinin konsantrasyonudur. Zira diğer parametreler optimum olmadığı takdirde morfolojisi bozuk olsada fiber üretimi gerçekleşmektedir. Ancak konsantrasyon parametresi, kullanılan polimer için optimum hale getirilmediği sürece işlem sonucunda elde edilebilecek sonuçlar, en iyi ihtimalle istenilenden çok daha büyük çaplı fiberler kötü ihtimaller ise damlacıklar ve püskürtme şeklinde yapılardır. Bundan dolayı diğer parametreler sabit tutulduğunda, konsantrasyonun artması üretilen fiberlerin çapında artışa sebep olmaktadır (Andrady, 2008). Polimer konsantrasyonu kullanılan polimer çözeltisindeki çözücü cinsi ile de doğrudan alakalıdır. Laboratuvarda yaptığımız çalışmalarda görmüş olduk ki kollajen asetik asit içerisinde çözelti oluşturulduğunda %40 konsantrasyonda optimum sonuçları verirken, 2,2,2-Trifluoroetanol (TFE) içerisinde çözüldüğü takdirde %10 konsantrasyonda optimum fiber şartlarını sağlamaktadır.

Çözelti iletkenliği

Elektrospinning yönteminde elektrik alan sayesinde fiber çekimi yapıldığından dolayı, kullanılan polimer çözeltisinin elektrik iletkenliği önem taşımaktadır. İletkenlik değeri sıfır olan çözeltilerde, elektrik alan sağlanamadığından çekim işlemi gerçekleşmemektedir. Çözeltilerin iletkenlikleri Siemens (S) birimi ile ifade edilmektedir. 1 S = 1 Amper/ Volt değerindedir (Andrady, 2008). Çözeltinin iletkenliğinin arttırılmasının üretilen nanofiberlerin kalitesini arttırdığı gösterilmiştir. Boncuk veya topak şeklinde yapılar içeren fiberlerin oluştuğu durumlarda, çözeltinin sodyum klorür(NaCl) veya fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ilave edilmesi, boncuk oluşumunu azalttığı veya ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (Son, Youk, Lee, & Park,

2004). Genel olarak konsantrasyon arttığı takdirde elektrik iletkenliği de artar. Fakat iyonik bileşenleri olmayan polimer tiplerinde bu durum tam tersi şekilde sonuçlanmaktadır. Bu durum için de polimer çözeltisine çeşitli tuzlar eklenerek iletkenlik arttırılabilmektedir (ElectrospinTech, 2012). Eklenecek tuz türünü seçerken dikkate alınması gereken bir husus vardır. Nanofiber çapını azaltmada tuzun etkinliği, moleküler ağırlığına bağlanmıştır. Küçük moleküler boyuttaki tuzun, muhtemelen daha küçük boyutlu olmasından dolayı daha büyük iyon hareketliliğinin daha etkili olduğu söylenmiştir (Zeng, Li, Liu, Sun, & Zhong, 2002).

Dielektrik Sabiti

Polimer çözeltisinin dielektrik sabiti bünyesinde ne kadar elektrik yükü barındırabileceği açısından önem taşımaktadır ve F/m(Farad/metre) olarak birimlendirilir. Bu sabit tamamen malzemeye özgü olduğundan, polimer cinsi ve kullanılan çözücüye göre değişmektedir. Dielektrik sabitinin yüksek olması daha dengeli bir yük dağılımına sebep olduğundan dolayı üretilen fiberlerin kalitesinde de artışa neden olmaktadır (Andrady, 2008). Dielektrik sabitini değiştirmek için çeşitli katkı maddeleri eklenebilmektedir. Fakat bu katkı maddeleri sadece dielektrik sabitini değil aynı zamanda iletkenlik ve yüzek gerilimi gibi parametreleri de değiştirdiğinden dolayı çok kontrollü bir yöntem sunmamaktadır.

Yüzey gerilimi

Yüzey gerilimi sıvıların yüzeyinde oluşuan ve bu sıvılara esnek bir tabakaya benzer özellikler kazandıran etkiye verilen isimdir. Şırıngaya yüklenen polimer çözeltisi şırınga ucunda bir yüzey gerirlim kuvveti oluşturacağından, başarılı bir fiber çekim işlemi gerçekleşmesi için uygulanan yüksek voltaj değeri bu yüzey gerilim kuvvetini aşmak mecburiyetindedir. Bu nedenle, kullanılan polimer çözeltisinin yüzey gerilme kuvveti ne kadar çok olur ise, uygulanması gereken voltaj değeri de doğru orantılı olarak artmaktadır. Bu sebepten ötürü, suyun yüzey gerilimi diğer sıvılarla karşılaştırıldığında yüksek olduğundan, elektro-eğirme işlemi için çok uygun bir çözücü olarak tercih edilmemektedir (ElectrospinTech, 2012).

Yüzey geriliminin düşük olması daha düşük voltajlarda çalışma imkânı sağladığından daha küçük çapa sahip ve daha düzgün morfolojide nanofiber üretimi imkânı sağlamaktadır (Leach, Feng, Tuck, & Corey, 2011).

3.1.2 Üretim Parametreleri

Voltaj

Uygulanacak olan voltajın ayarlanması üretim parametreleri içinde büyük öneme sahiptir. Voltaj sayesinde oluşan elektriksel kuvvet ile çekim işlemi gerçekleşeceğinden dolayı "Taylor Konisi" üzerinde oluşan gerilme kuvvetini aşmadığı takdirde fiber çekim işlemi başarısız olacaktır (ElectrospinTech, 2012).

Akış hızı

Akış hızı belirli bir zaman aralığında ne kadar polimer çözeltisinin nanofiber formuna geçtiğini temsil etmektedir. Akış hızının belirlenmesinde en önemli etken "Taylor Konisi" oluşumudur. Bu hız belirli bir değerin altında olduğu zaman, koni oluşumu gerçekleşmemektedir. Bunun aksine belirli bir değerin üzerine çıktığında ise olması gerektiğinde büyük bir koni oluşacağı için, elektriksel yüklenme azalacak, bunun sonucunda ya oluşan fiberlerin çapında artma meydana gelecek ya da fiber oluşumu tamamen duracaktır (Doshi & Reneker, 1995).

Toplayıcı mesafesi

Toplayıcı ünite ve şırınga ucu arasındaki mesafe elektriksel alanın kuvvetini ve dolayısı ile oluşan çekim gücünü etkilemektedir. Aynı zamanda kullanılan polimer çözeltisindeki çözünün buharlaşması açısından da önemlidir. Yeterli mesafe olmadığı takdirde toplanan nanofiberler yaş bir şekilde toplayıcı üniteye ulaşmakta ve eriyik halde bir ağ tabakası oluşması ile sonuçlanmaktadır. Diğer şartlar sabit tutulduğunda mesafenin arttırılması genellikle nanofiber çapında azalma meydana getirmektedir (Bhardwaj & Kundu, 2010) fakat tam tersi ihtimalin örnekleri de literatürde mevcuttur. Mesafenin az olması eriyik fiberlerin toplanmasına sebep olduğu gibi, gereğinden fazla olması da aynı etkiyi göstermektedir. Gheliech ve diğerleri (2005) yaptıkları bir çalışmada 8 cm'lik toplayıcı mesafesinde elektrospinning yaptıklarında, toplayıcı ünite de kaynaşmış lifler gözlemlediler. Aynı çözelti ile 10 cm'de, ayrı ayrı lifler toplandı. Her iki mesafede toplanan liflerin çapı benzerdi. 15 cm'de tekrar erimiş lifler gözlemlendi ve çap önemli ölçüde arttı.

Toplayıcı Cinsi

Toplayıcı ünitenin cinsi iki farklı açıdan önem taşımaktadır. Bunlardan birincisi toplayıcı ünitenin üretildiği materyal, ikincisi ise toplayıcı ünitenin geometrik şeklidir. Nanofiberler toplayıcı ünite üzerine toplanırken, üniteye temas ettikleri sırada elektriksel yükleri sıfırlanmaktadır. Topraklanan üniteye toplanmayan fiberlerde yük boşalımı daha yavaş olduğundan fiber morfolojisi bu durumdan olumsuz etkilenmektedir. Bundan dolayı toplayıcı ünitenin üretildiği materyalin dielektrik katsayısı önem taşımaktadır. Toplayıcı ünitenin geometrik şekli ise örneğin hareketli olması, toplanan fiberlerin birim alanda istenilen yoğunlukta toplanmasına olanak sağladığı için daha kontrollü bir üretim sunması açısından önemlidir (Andrady, 2008).

3.1.3 Çevresel Parametreler

Elektrospinning işlemi sırasında en önemli çevresel parametreler sıcaklık ve nem oranıdır. İşlemin yapıldığı ortamın sıcaklığı, kullanılan polimer çözeltisindeki çözücünün buharlaşması açısından önemlidir (Andrady, 2008). Kuru fiberlerin elde edilmesi açısından ortam sıcaklığı belirli derecelerde sabit tutulması gerekmektedir. Aksi takdirde önceki başlıklarda değinilen, eriyik şeklinde ağ yapılarının oluşması kaçınılmazdır. Sıcaklık gibi ortamdaki nem oranı da üretilen fiberlerin morfolojisini doğrudan etkilemektedir. Nemin lif çapına etkisi, çözelti ile çevreleyen su buharı arasındaki etkileşime bağlıdır. Kim ve diğerleri (2004) daha yüksek nemin, aynı konsantrasyona sahip polimer çözeltilerinden üretilen polistiren fiberlerin çapında artışa sebep olduğunu göstermiştir. Bu çevresel etmenler tamamen kullanılan polimer ve çözeltiyle alakalı olduğundan, kullanılan malzemeyi iyi tanımak, verimli bir fiber üretimi açısından hayati bir önem kazanmaktadır.

4. ÇAPRAZ-BAĞLAMA

Polimer zincirleri arasındaki etkileşimler sonucu 3 boyutlu bağlanma işlemine çapraz bağlanma denmektedir. Bu polimer zincirler arasında bağlar kurmak için tepki veren reaktif noktalara fonksiyonel grup adı verilir. Kollajen yapı olarak doğal bir moleküldür, amino asitler ve bunlara ek olarak amin, karboksilat, ve hidroksil gruplarına sahiptir.

Kollajen ile ilgili büyük problemlerden bir tanesi ise, elektro-eğirme yöntemi ile nanofiber formuna getirildikten sonra suda tamamen çözünür hale gelmesidir. Bu sebepten ötürü kollajen nanofiberlerin dayanımını arttırmak için bir dizi çapraz-bağlama işlemleri gerekmektedir. Bu çalışmada dört farklı çapraz bağlama ajanı denenmiştir. Bunlar sırasıyla genipin, EDC-NHS, transglutaminaz ve gluter aldehit'dir.

5. DENEYSEL KISIM

Bu başlık altında kollajen ekstraksiyon işlemleri, electrospining işlemleri ve yapılan farklı çapraz-bağlama işlemleri sırasıyla anlatılmıştır. Aynı zamanda kullanılan karakterizasyon yöntemlerinin ne için yapıldığı ve nasıl uygulandığı detaylı olarak verilmektedir.

5.1 Kollajen Ekstraksiyon

Ekstraksiyon, çözeltilerden veya katı karışımlardan bir maddeyi ayırma, çözücünün ve istenmeyen safsızlıkların karışımlardan uzaklaştırmak için yapılan işlemlerin tümüne verilen isimdir. Kollajen biyo-aktif olması, biyo-uyumluluk ve biyo-bozunurluk gibi özelliklerinden dolayı bilimsel çalışmalarda her zaman popüler bir biyomalzeme olmuştur (Bürck, ve diğerleri, 2017). Yıllar boyunca kollajen ekstraksiyonu üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Buna karşın yapılan literatür taramasında, yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunun eski tarihlerde olması ve yeterince güncel olmaması, kollajen ekstraksiyonu üzerine çalışmayı cazip hale getirmiştir. Hayvanlar âleminde en çok bulunan protein olması hayvansal kaynaklardan ekstraksiyon sonucu elde edilmesini kolaylaştırmıştır. Yapılan bu çalışmada kollajen ekstraksiyonu için iki farklı kaynak kullanılmıştır. Bu kaynaklar iki kaynağı sıçan kuyruğu ve sığır derisi oluşturmaktadır. Sıçan kuyrukları Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı tarafından bağış şeklinde temin edilmiştir. Sığır derisi ise danışmanım Doç. Dr. Murat KAZANCİ tarafından kurban derisi şeklinde temin edilmiştir. Yapılan bu çalışmada canlı hayvanlarla hiçbir şekilde temasta bulunulmamıştır.

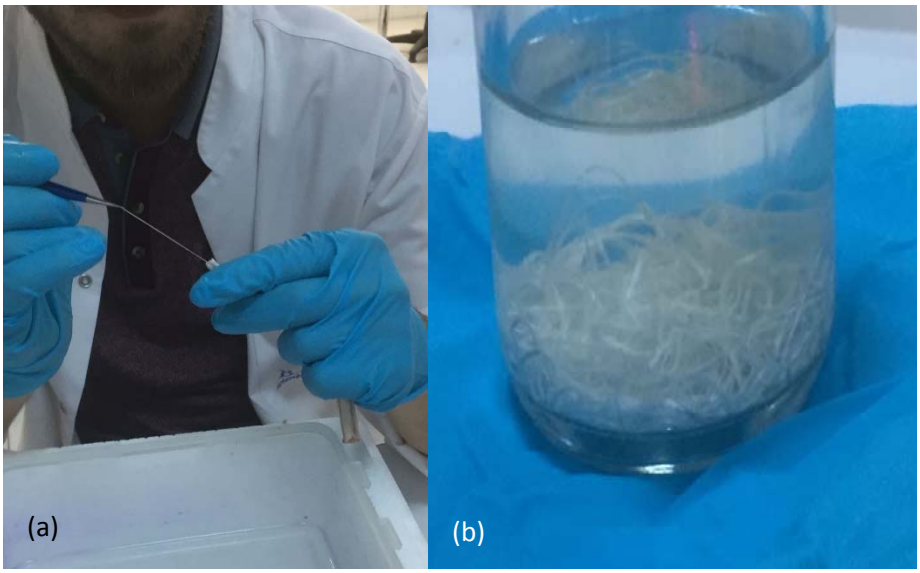
5.1.1 Sıçan Kuyruğundan Kollajen Ekstraksiyonu

Kollajenin tendonların yapısında bolca bulunması ve sıçan kuyruğunun büyük çoğunluğunun tendonlardan oluşması, bu kaynağı ekstraksiyon işlemi için ideal bir kaynak olmasına sebep olmuştur. Bundan dolayı yakın zamanlarda yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu bu kaynak üzerine yoğunlaşmıştır. Rajan ve diğerleri

(2007) yaptıkları çalışmada sıçan kuyruğundan kollajen ekstraksiyonu için bir protokol oluşturmuşlardır. İşlemler çoğunlukla bu protokole bağlı olarak, küçük modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir.

İşlemler

Öncelikle dondurulmuş halde temin edilen kuyruklar 1X PBS çözeltisi içerisinde çözüldü. Daha sonra kuyruğun sert derisi üzerine bisturi yardımıyla bir çizik açıldı. Açılan bu çizik kenarından kalkan deriler cerrahi makas yardımıyla kesildi. İnce bir pens yardımıyla tendonlar teker teker çekilip yine aynı şekilde 1X PBS çözeltisi içerisine doldurulduldu. Tendon çekim işlemi ve çıkarılan tendonlar Şekil 5'de gösterilmiştir. Takip edilen protokole uygun olarak tendonlar bir ön işlemden geçirildi. Bu ön işlem tendonların 5'er dakika süre ile sırasıyla aseton ve isopropil alkollerde bekletilmesini içeriyordu. Bu ön işlem Tip 1 kollajenin saflaştırılması için gerekliydi (Rajan, Habermehl, Cote, Doillon, & Mantovani, 2007). Kollajenin asit içerisindeki çözünürlüğü bilindiğinden dolayı elde edilen tendonlar ile, asit cinsinin etkisini de saptamak adına, iki farklı asit kullanılarak çözeltiler hazırlandı. İlk denemeler elektro-eğirme işlemine de uygun olması açısından, 0,01M hidroklorik asit(HCl) ve 0,01M asetik asit(AA) içerisine %30'luk olarak hazırlandı. Fakat çözünme problemi nedeniyle, bu oran önce %5'e, problemin devam etmesi sebebiyle %1'e düşürüldü. Bu oranda çözünme işlemi hiçbir sıkıntı olmadan gerçekleştirilebildi. Çözelti halindeki kollajenin sıcaklıktan kaynaklanan yapısının bozulma özelliğinden dolayı kullanılan tüm materyaller önceden soğutuldu ve bütün karıştırma işlemleri 4ºC'de gerçekleştirildi. Elde edilen kollajen çözeltisini saflaştırmak adına, içerisindeki asidi uzaklaştırmak için suya karşı diyaliz işlemi uygulandı. Diyaliz sonrası elde edilen çözelti -85 ºC'de 1 gece dondurulduktan sonra, 48 saat süreyle liyafilize edildi. Liyafilizasyon işlemi sonunda su molekülleri tamamen uzaklaştırılmış ve toz haline kollajen başarılı bir şekilde elde edilmiş olundu.



Şekil 5. (a) Sıçan kuyruğundan tendon çekim işlemi (b) kuyruktan çekilen tendonlar

5.1.2 Sığır Derisinden Kollajen Eldesi

Kollajen kaynağı olarak sığır derisi tercih edilmesinde bazı avantajlar ve dezavantalar bulunmaktadır. Dezavantajları; deri kullanılarak yapılan protokol ve çalışmalar oldukça eski, güncellikten uzak olmaları ve tedarik edilmesi kuyruğa göre daha zor olmasıdır. Avantajı ise kaynağın tedarik edilmesi durumunda kütlece daha büyük olduğundan, miktar olarak daha fazla üretim imkânı sağlamasıdır. Sığır derisinden kollajen üretimi için literatür araştırması sonucunda, en güncel protokoller olan, Tris-HCl protokolü ve pepsin enzimi (Nimni, Cheung, Strates, Kodama, & Sheikkh, 1988) protokolü uygulanmıştır.

Tris-HCl İşlemler

Dondurulmuş deri parçaları jilet ve bisturi yardımıyla kıl ve yap gibi yapılardan temizlendi. Temizlenmiş deri sonraki adımları kolaylaştırmak adına ufak parçalara bölündü. 0,15M sodyum klorür(NaCl) çözeltisi ve 0,05M Tris-HCl çözeltisi hazırlandı. Deri ağırlıkça %5 olacak şekilde bu karşım içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile 3 gün boyunca karıştırıldı. Karıştırma işleminin tümü, buz desteğiyle 4 ºC'de gerçekleştirildi. 3 gün sonunda elde edilen solüsyon 3200rpm(rate per minute)

de 45 dakika boyunca soğutuculu santrifüjde 4ºC'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak santrifüj işlemi üç sefer tekrar edildi. Son işlem sonrasında oluşan pellet alındı. 0.5M asetik asit(AA) içerisinde 1 hafta süresince manyetik karıştırıcı da çözüldü. Karıştırma işlemi yine buz takviyesi ile birlikte yapıldı. Sonrasında içerisindeki asidin uzaklaştırılması için suya karşı diyaliz işlemi yapıldı. Diyaliz işlemi sonrasında bir gece -85 ºC 'de dondurularak liyafilizasyon işlemi uygulandı. Liyafilizasyon sonrasında toz halinde kollajen elde edilmiş olundu.

Pepsin Enzimi İşlemler

Dondurulmuş deri öncelikle jilet ve bisturi yardımıyla kıl ve yağ gibi yapılardan temzilendi. Temizlenmiş deri sonraki adımları kolaylaştırmak adına ufak parçalara bölündü. Daha sonrasında deri ağırlığı %5'lik olacak şekilde HCl içerisinde çözelti hazırlandı. Bu çözeltinin içine aynı zamanda %0,1'lik sodyum azid (NaN_3) ve 1 mg/ml olacak şekilde pepsin enzimi katıldı. Pepsin enziminin de katılmasıyla oluşan çözelti 20 saat boyunca bu şekilde karıştırıldı. 20 saatin sonunda enzim aktivitesini durdurmak için pH değeri 10'a çıkana kadar sodyum hidroksit (NaOH) eklendi ve 24 saat boyunca enzimin tamamen inaktif hale gelmesi beklendi. 24 saat sonra pH değerini normale döndürmek için 7'ye gelene kadar HCl eklendi. Oluşan son çözelti soğutucu özelliği olan santrifüjde, 4 ºC, 3200 rpm(rate per minute)'de 45 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Bu işlem aynı şekilde 3 defa tekrarlandı. Santrifüj işlemleri tamamlandıktan sonra oluşan pellet %3'lük A.A. içerisinde çözüldü. Çözülme işlemlerinin tümü 4 ºC'de gerçekleştirildi. Oluşan son çözelti bir tülbent yardımıyla süzüldükten sonra -85 ºC'de bir gece boyunca donduruldu. Dondurulduktan sonra 48 saat boyunca liyafilize edilerek su molekülleri tamamen uzaklaştırılmış, toz halinde kollajen başarılı bir şekilde elde edilmiş olundu.

5.2 Elektro-Eğirme

Elektro-eğirme işlemi için kullanılan prosedürler aşağıda açıklanmıştır.

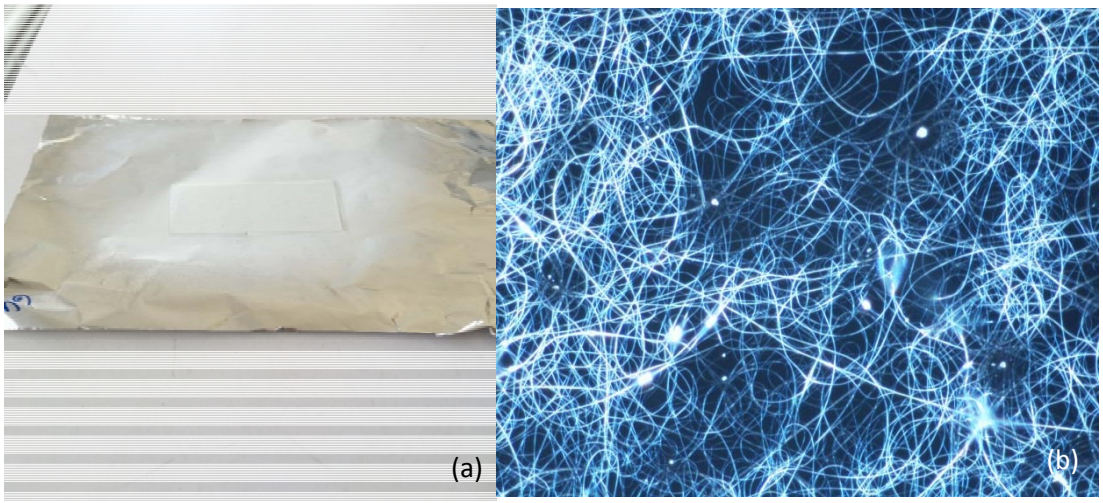
5.2.1 Solüsyon Hazırlanması

Elektro-eğirme işleminde kullanılan her polimer için birden fazla çözücü seçeneğinin mevcut olma durumu kollajen için de geçerlidir. Çözücü seçiminde nelere dikkat edilmesi gerektiği daha önceki başlıklarda açıklanmıştır(bkz. Parametreler). Kollajen ile ilgili temel problemlerden bir tanesi, çözelti halindeyken karakteristik üçlü sarmal yapısının bozulmasıdır. Bundan dolayı çözücü seçimi kollajen için büyük önem taşımaktadır. Bürck ve diğerleri (2014) yaptıkları çalışmada kollajen nanofiber üretimindeki en yaygın iki çözücüyü incelemişlerdir. Asetik asit ve TFE ile yaptıkları çalışmada asetik asitin çözelti halindeyken kollajenin üçlü sarmal yapısını daha iyi koruduğunu ispatlamışlardır. Bunda dolayı bu çalışmada diğer alternatiflerdense, kollajenin asetik asit içerisinde çözülmesi tercih edilmiştir. Kollajen %40'lık asetik asit içerisinde hacimde ağırlıkça (w/v) %30 olarak çözülmüştür.

5.2.2 Elektro-eğirme Prosedür

Kollajen nanofiber üretimi için elektro-eğirme prosedürü daha önceleri açıklanmıştır (Bürck, ve diğerleri, 2013). Hazırlanan elektro-eğirme çözeltisi 3 mililitre(ml)'lik şırıngalar içerisine doldurulmuştur. Vida ağızlı bu şırıngaların ucuna küt ağızlı metal iğne uçları takılmıştır. Taylor konisi oluşması açısından küt ağızlı olması önem taşımaktadır. Hazırlanan bu şırınga hızı kontrol edilebilen bir şırınga pompasına yerleştirilmiş ve pompanın hızı 0.5 mikrolitre/ dakika olarak ayarlanmıştır. Bir elektrot aracılığıyla yüksek voltaj kaynağı metal iğne ucuna bağlanmıştır.İşlem sırasında uygulanacak yüksek voltaj 18-20 kilovolt(kV) olarak ayarlanmıştır. Ortam sıcaklığı 22-24 ºC arasın tutulmuş ve nemlilik %40-50 arasında tutulmaya çalışılmıştır. Nemliliğin istenilen değerler dışında olduğu zamanlarda, kapalı hazne içerisine yerleştirilen doymuş K_2CO_3 çözeltisi kullanılmıştır (OMEGA). Nanofiberlerin toplanacağı ünite iğne ucundan 15 cm uzaklığa yerleştirilmiştir. Toplayıcı ünitede biriken nanofiberleri oradan ayırma işlemini kolaylaştırmak için toplayıcı ünite aliminyum folyo ile kaplanmış, folyonun üstene ince lameller yerleştirilmiştir. Bu prosedür ışığında kollajen nanofiber üretimi başarı ile gerçekleştirilmiştir. Folyo

üzerine toplanan nanofiberler ve optik mikroskop ile elde edilen görüntüleri Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. (a) Folyo üzerine tpolanan nanofiberler (b) nanofiberlerin optik mikroskop görüntüsü

5.3 Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FT-IR)

Kızılötesi (IR) spektroskopisi, organik veya inorganik bileşikler olan maddelerin karakterizasyonunda kullanılan güçlü bir test tekniğidir. FTIR, ışığın farklı frekanslarda absorbansını ölçerek bir molekülün kimyasal yapısını tanımlayabilir. Bir IR spektrumu, malzemeyi oluşturan atomların bağları arasındaki titreşimlerin frekanslarına karşılık gelen emilim pikleri, bir numunenin parmak izini temsileder. Her materyal benzersiz bir atom kombinasyonu olduğu için, iki bileşik aynı IR spektrumunu üretemez. Katıların, sıvıların ve gazların analizine uygulanabilir (Settle, 1997).

Bu çalışmada FT-IR tekniği, üretilen kollajenin ne denli ticari kollajene yakın olup olmadığı saptamak, elektro-eğirme yöntemi ile üretilen kollajen nanofiberlere uygulanan çapraz-bağlama işlemlerinin, yapıya katılıp katılmadığı, yapı üstünde ekstradan ajan kalıp kalmadığı ve çapraz-bağlama işleminin başarısı hakkında bilgi alınması amacıyla kullanılmıştır.

5.4 Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi

Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi, moleküllerin CD'sinin bir dizi dalga boyu üzerinde ölçüldüğü bir spektroskopik tekniktir. CD spektroskopisi, her tür ve boyuttaki kiral molekülleri incelemek için yaygın olarak kullanılır, ancak en önemli uygulama alanını, büyük biyolojik moleküllerin incelemesinde bulmaktadır. Makromoleküllerin sekonder yapısını veya konformasyonunu analiz etmekte yaygın olarak kullanılır. Aynı zamanda makromoleküller hakkında yapısal, kinetik ve termodinamik bilgiler dairesel dikroizm spektroskopisinden türetilebilir.

Dairesel dikroizm bu çalışmada yalnızca kollajen ekstraksiyonu kısmında kullanılmıştır. Bu bölümdeki kullanım amacı ise, ekstraksiyon işlemleri sonucunda üretilen toz halinde kollajenin, ticari kollajen ile arasındaki benzerlik oranıdır. Kollajene ait karakteristik özellik olan üç boyutlu yapının korunup korunmaması kollajen ekstraksiyon işleminde büyük önem taşımaktadır. Bu yöntem ile üretilen kollajenin üç boyutlu yapısının ticari kollajen ile ne de örtüştüğü ve üretimin ne denli verimli olduğu hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Kullanılan protokol daha önceleri açıklanmıştır (Aras & Kazanci, 2015).

5.5 Diferansiyel Taramali Kalorimetre (DSC)

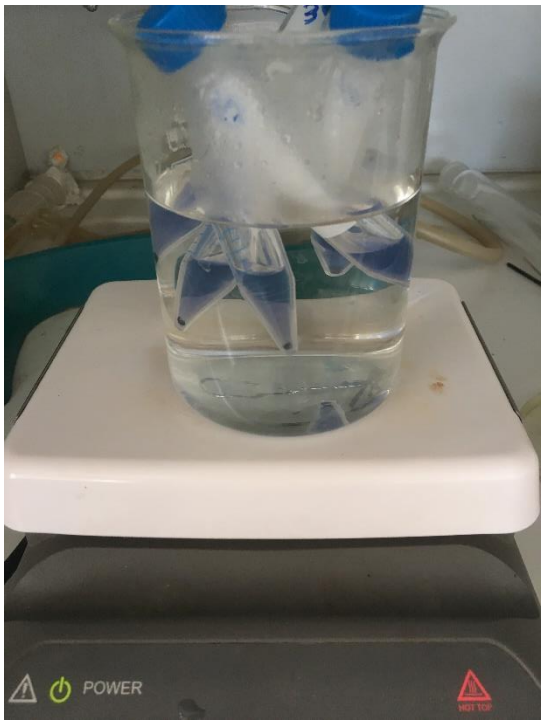
Termal analiz testleri, bir malzemenin karakterizasyonunda kullanılan temel analitik tekniklerdendir. Bu testler, fiziksel stabilite, çözünme kaybı, bozunma, ayrışma gibi konularda ve faz değişimi gibi diğer karmaşık konularda fikir sahibi olmamızı sağlamaktadır. Literatüde birçok termal analiz testi bulunmasının yanı sıra DSC en yaygın olanlardan bir tanesidir (Lin & Wang, 2012).

Bu çalışmada, DSC testi, üretilen ve çapraz-bağlama işlemi görmüş nanofiberlerin termal olarak dayanıklılarının artıp artmadığını göstermek ve göreceli olarak çapraz-bağlama işleminin başarısını göstermek için kullanılmıştır. DSC testleri 0 ºC'den 220 ºC'ye kadar dakikada 10ºC'lik bir artışla ölçülmüştür.

5.6 UV Spektrofotometre

UV spektrofotometre cihazı kullanılarak serbest amin gruplarının miktarlarının tayininde ninhidrin testi kullanılmıştır. Ninhidrin test protokolü Wang ve diğerleri tarafından daha önce açıklanmıştır (Wang, 2004). Ninhidrin testi kullanılarak numunelerde, çapraz-bağlama sonrasında serbest kalan amin grupları tayin edilecek ve crooslink miktarı hakkında fikir sahibi olunacaktır (Sung, Huang, Huang, & Tsai, 1999).

Ninhidrin solüsyonu protokole uygun olarak hazırlanmıştır. Referans eğrisini oluşturmak için bilinen miktarlarda toz jelatin kullanılarak ölçüm numuneleri hazırlanmıştır. Bu çalışmada referans eğrisinin 4 numuneden oluşması tercih edilmiştir. 1'den 4'e kadar numaralandırılan deney tüplerine, ölçülerek sırasıyla 2-3-4-5 mg toz jelatin doldurulmuştur. Daha sonra üstlerine 1 ml distile su eklenmiştir. Su eklendikten sonra 90 ºC sıcak su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonrasında ise deney tüplerine 1 ml ninhidrin solüsyonu eklenmiş ve tekrar 15 dakika boyunca 90 ºC sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Böylelikle deney tüplerindeki son konsantrasyonlar sırasıyla 1 - 1,5 – 2 – 2,5 mg/ml olmuştur. 15 dakika bekledikten sonra numune tüpleri 5 dakika soğutularak oda sıcaklığına getirilmiştir. Nanofiber numunleri de ayrı ayrı 2'şer mg tartılmış aynı prosedür uygulanarak sırasıyla 1 ml distile su ve 1 ml ninhidrin solüsyonu eklenmiştir. Ninhidrin testinde, serbest amin gruplarının ninhidrin solüsyonu ile tepkimesi sonucu oluşan belirleyici mavi renk oluşumu Şekil 7' de gösterilmiştir. Mavi renk oluşumunun sonrasında ise ninhidrin testi için belirleyici olan 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Aynı prosedür, ilk çözücü olan su yerine etanol kullanılarak da tekrarlanmıştır.



Şekil 7. Ninhidrin solüsyonu ile mavi renk olulturuan numuneler

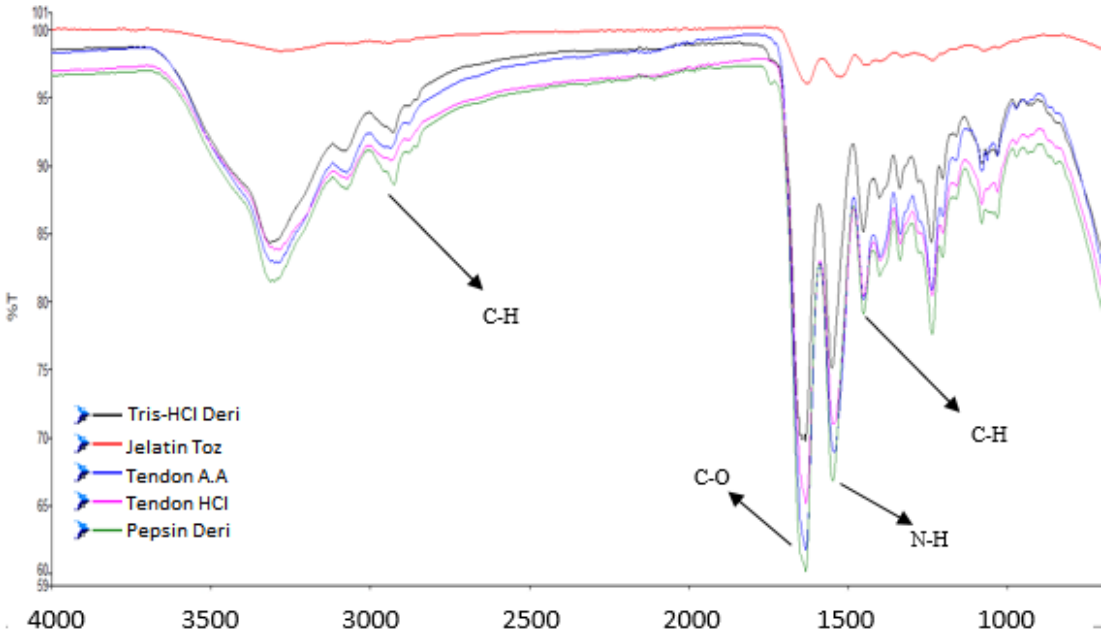
6. DENEYSEL KISIM SONUÇLARI

Bölüm 5'de verilen "Deneysel Kısım" sonuçları bu bölümde başlıklar halinde incelenmiştir.

6.1 Kollajen Ekstraksiyon Sonuçları

Kollajen ektraksiyon işlemlerinin sonuçları aşağıda verilmiştir.

6.1.1 FT-IR Sonuçları

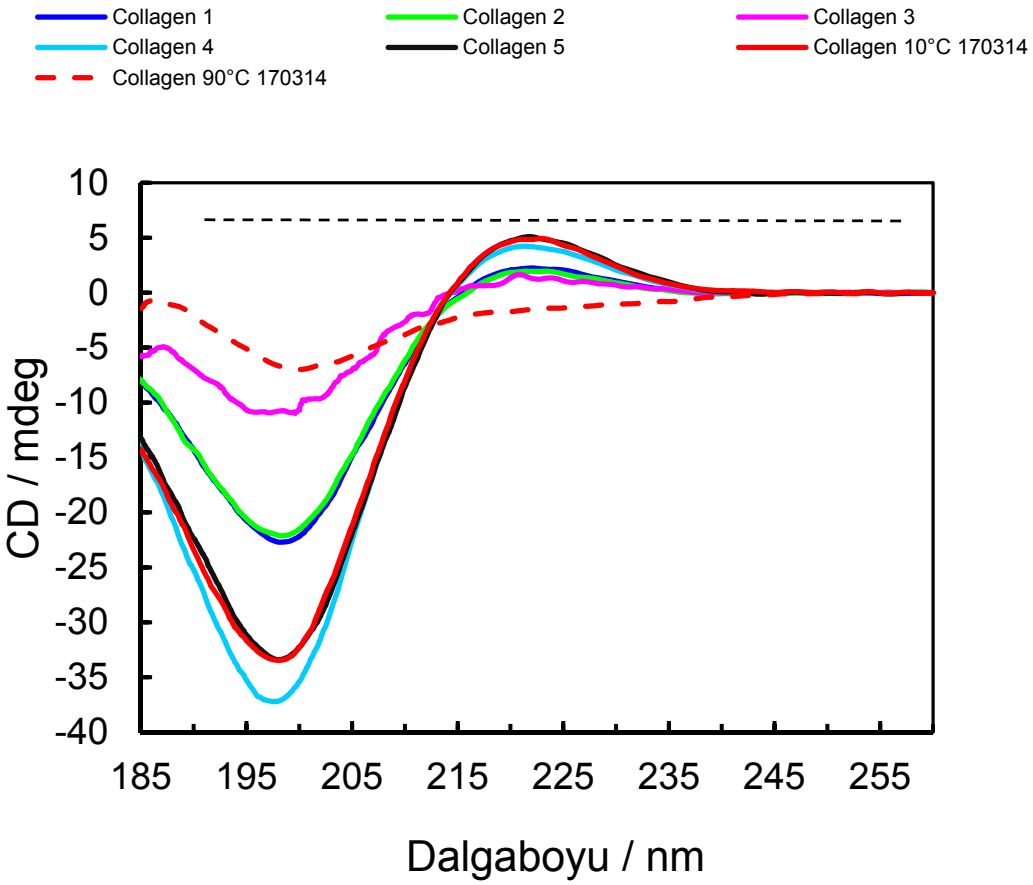


Şekil 8. Kollajen ekstraksiyon FT-IR grafiği

Şekil 8'de gösterilen grafiklerden siyah renkte olan Tris-HCl çözeltisiyle deriden elde edilen kollajene, yeşil renkte olan pepsin enzimi ile elde edilen kollajene, mavi renkte olan AA içerisinde çözülen sıçan kuyruğu tendonundan elde edilen kollajene, pembe

renkte olan HCl içerisindeki sıçan kuyruğu tendonundan elde edilen kollajene, kırmızı olan ise verimli bir karşılaştırma yapılması açısından ticari jelatine aittir. Burada gösterilen pikler, elde edilen ürünün yapısı hakkında bilgi vermektedir. Kollajen amide I adı verilen C-O titreşimi 1680 cm^{-1} dalga boyunda gözlemlenmekte olup, bu kollajen için belirleyici pik pozisyonudur. Yine kollajen için amide II adı verilen N-H titreşimi 1542-1544 cm^{-1} dalga boyunda görülüp kollajen proteinine aittir. Amide III C-N titreşimi 1256 cm^{-1} dalga boyunda gözlemlenmektedir. Diğer irili ufaklı bantlar ise kollajen proteinine ait olup farklı moleküler titreşimleri göstermektedir. C-H titreşimine ait iki farklı bant pozisyonu bulunmaktadır. Bunlardan düşük dalga boyunda olan 1458 cm^{-1} daha yüksek dalga boyunda olan ise 2937 cm^{-1}'dir. Bu bandın yüksekliğinin azalıp çoğalması organik maddenin ortamda bulunan hidrojenle olan etkileşimi hakkında bilgi vermektedir. Buradan yola çıkarak bu bandın şiddetinin azalması, numunenin kuruma düzeyi ve ikincil yapının bozulması veya açılması hakkında bize bilgi vermektedir. Özellikle kollajenin üçlü yapısının şeklini sağlayan aradaki hidrojen bağlarıdır. Yapının açılması için hidrojen bağlarının tamamen yıkılması gerekmektedir. C-H şiddetinin azalması yapının denatüre olduğunu kanıtlayan önemli bir etmendir.

6.1.2 CD Sonuçları



Şekil 9. Kollajen ekstraksiyon işleminin CD grafiği

193 dalga boyundaki negatif pik ve 218 dalga boyundaki pozitif pik ppII yapısına karşı hassastır. PpII yapısı ise direkt olarak kollajenin üçlü katlanması hakkında bilgi verir. Bu pozisyonlardi pikler ne kadar kuvvetli ise, ölçülen yapıdaki kollajenin üç boyutlu yapısı o derece kuvvetlidir. Buna göre kırmızı kesik çizgili grafik, kollajen 90 ºC'de tamamen denatüre olup yapısı bozulduktan sonra elde edilen grafiktir. Kesiksiz kırmızı grafik ise kollsjenin 10 ºC'de yapısı hiç bozulmadan elde edilen grafiğidir. Bu iki grafik kollajenin elimizdeki ticari kollajenin, yapısının tamamen bozulmuş ve tamamen korunmuş halinin grafikleridir. Bu grafikler esas alınarak, bizim elde ettiğimiz ve saflaştırdığımız kollajenin yapısının ne derece korunduğu hakkında bilgi sahibi olunmaktadır. Mavi ve yeşil renkteki grafikler iki farklı yöntem kullanılarak sıçan kuyruğu tendonundan elde edilen kollajenlerdir. CD sonuçları, üretilen bu iki

kollajen için yapının %60 korunduğunu göstermektedir. Tendondan kollajen elde edilmesinde kullanılan iki yöntem arasında herhangi bir fark gözlemlenmemiştir. Pembe renkli grafik ise sığır derisinden Tris-HCl yöntemi ile elde edilen kollajendir. CD testleri için çözelti numuneler çözelti halinde hazırlandığı için, bu numune asit içinde çözülme işlemi sırasında problem yaşanmış ve çözünürlüğün çok düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle elde edilen grafik çoğunlukla gürültüden oluşmakta olduğundan dolayı sağlıklı bir sonuç elde edilememiştir. Açık mavi renkte olan grafik is sığır derisinden pepsin enzimi ile elde edilen kollajen örneğine ait olmaktadır. Elde edilen sonuç göstermektedir ki, kollajen yapısı tamamen korunmuş olup hatta negatif pik değerleri, 10 ºC 'de ticari kollajenin pik değerlerinden daha iyidir. Siyah renkteki grafik ise ticari kollajene ait olup farklı zamanlarda elde edilen grafikler arasında fark olmadığını ölçümlerin sağlıklı ve tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

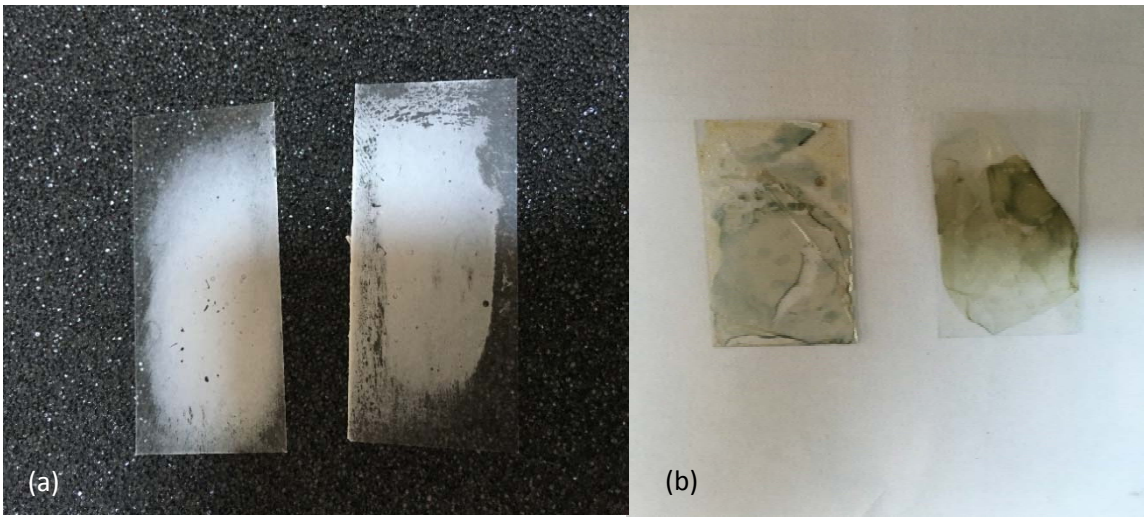
6.2 Çapraz-Bağlama Sonuçları

Çapraz-bağlama işlemi için yapılan deneylerin sonuçları aşağıda verilmiştir.

6.2.1 Klasik Yöntem Çapraz-Bağlama

Yapılan literatür taramasının ardından, "Deneysel Kısımlar" başlığı altında açıklanan klasik yöntem çapraz-bağlama işlemleri uygulanmıştır. Uygulanan prosedürler sonrasında ne yazık ki verimli sonuçlar elde edilememiştir. Klasik yöntem için kullanılan üç ajan içerisinden sadece genipin ajanı ile nispeten olumlu sonuç alınmıştır. Diğerlerine oranla biraz daha olumlu olmasına rağmen genipinden de verimli sonuç elde edilememiştir. Çapraz-bağlama işlemi gerçeklemiş fakat fiber morfolojileri neredeyse tamamen tahrip olmuştur. Klasik yöntem sonrasında elde edilen yapıda sonrasında hiçbir uygulama, test veya karakterizasyon işlemi yapılması mümkün değildir. Lameller üzerine toplanan nanofiberlerin çapraz-bağlama işlemi uygulanmadan önceki ve sonraki hali Şekil 10' da verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi klasik yöntem çapraz-bağlama işlemi nanofiberleri neredeyse tamamen eritmiştir. Bilimsel olarak işlem gerçekleşebiliyor olsa da nanofiberler ile sonraki aşamalarda

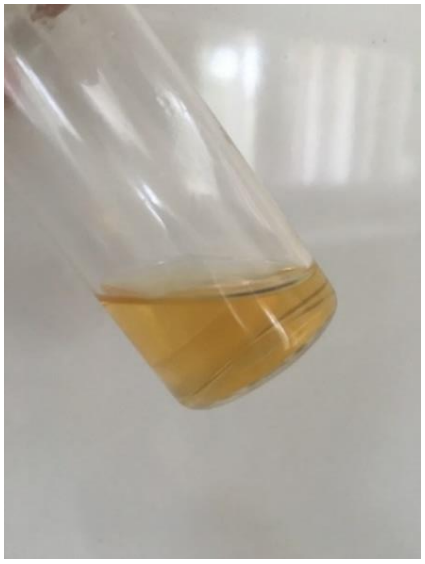
herhangi bir uygulama yapmak mümkün değildir. Tüm bu sebeplerden dolayı in-situ çapraz-bağlama yöntemi daha cazip bir yöntem haline gelmektedir.



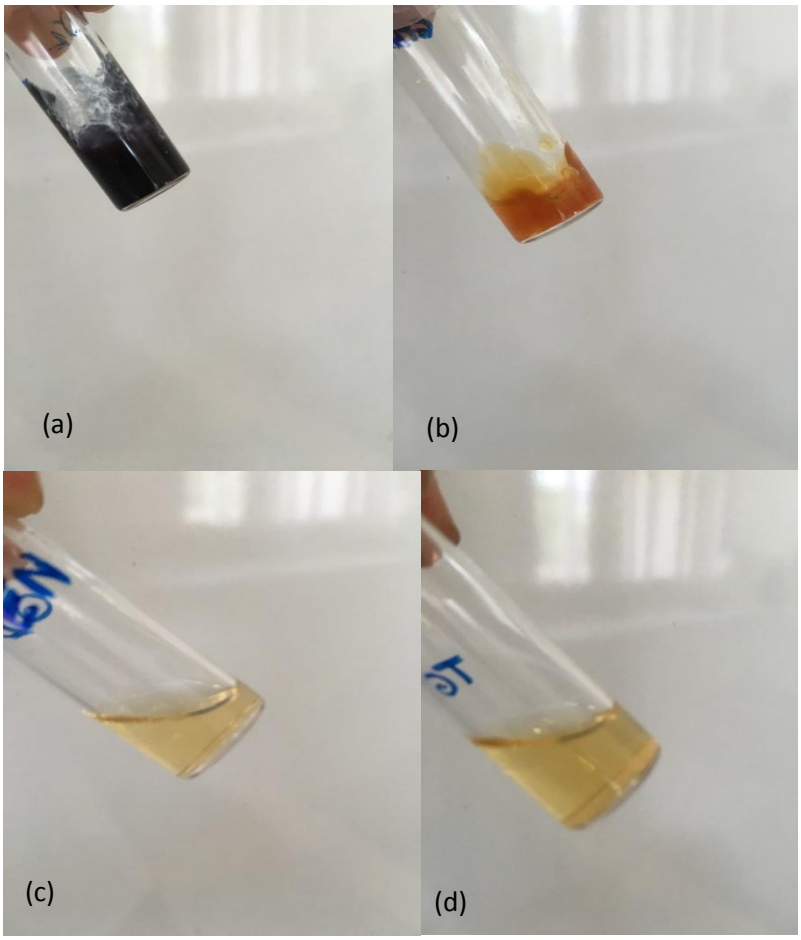
Şekil 10. Klasik yöntem uygunlanmış nanofiberlerin (a) önceki ve (b) sonraki halleri

6.2.2 Bulk Çapraz-Bağlama

Klasik yöntemden alınan verimsiz sonuçlar doğrultusunda in-situ crosslink daha cazip hale gelmiştir. Bulk çapraz-bağlama işlemi ise tamamen in-situ çapraz-bağlama işlemini kanıtlaması açısından yapılan bir işlemdir. Yaptığımız çalışmalarda transglutaminaz ve EDC-NHS kombinasyonundan verimli bir sonuç alamazken bu ajanların katıldığı jelatin çözeltisinde jelleşme işlemi gerçekleşmemiştir (Şekil 12 (c) ve (d)). Bu iki ajanın aksine genipin ve gluteraldehit ajanlarının içine katıldığı jelatin çözeltilerinde, bu ajanların çapraz-bağlama işlemleri için belirleyici olan renk değişimleri ve tamamen jelleşme görülmüştür. Jelleşen çözeltiler Şekil 12 (a) ve (b)'de verilmiştir. Bu iki ajanın asidik ortamda başarılı bir şekilde yapıyı bağlamasından dolayı çalışmanın devamına bu iki ajan kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 11. Çapraz-bağlama ajanı katılmamış jelatin çözeltisi



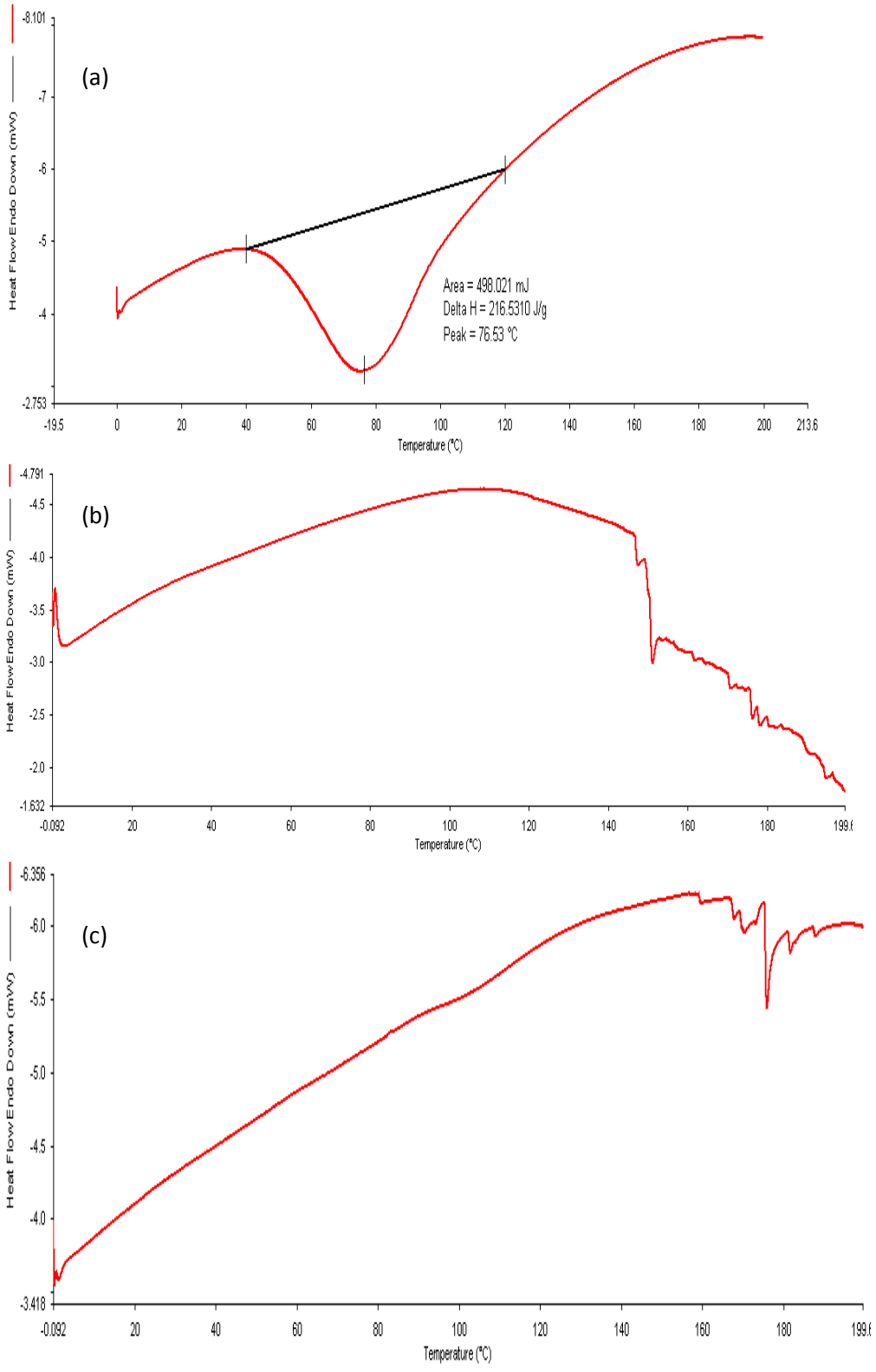
Şekil 12. (a) Genipin (b) gluteraldehit (c) EDC-NHS kombinasyonu (d) transglutaminaz enzimi ile hazırlanan jelatin solüsyonları

6.3 DSC Sonuçları

Yapılan DSC ölçümlerinin sonuçları aşağıda verilmiştir.

6.3.1 Bulk Çapraz-Bağlama Sonuçları

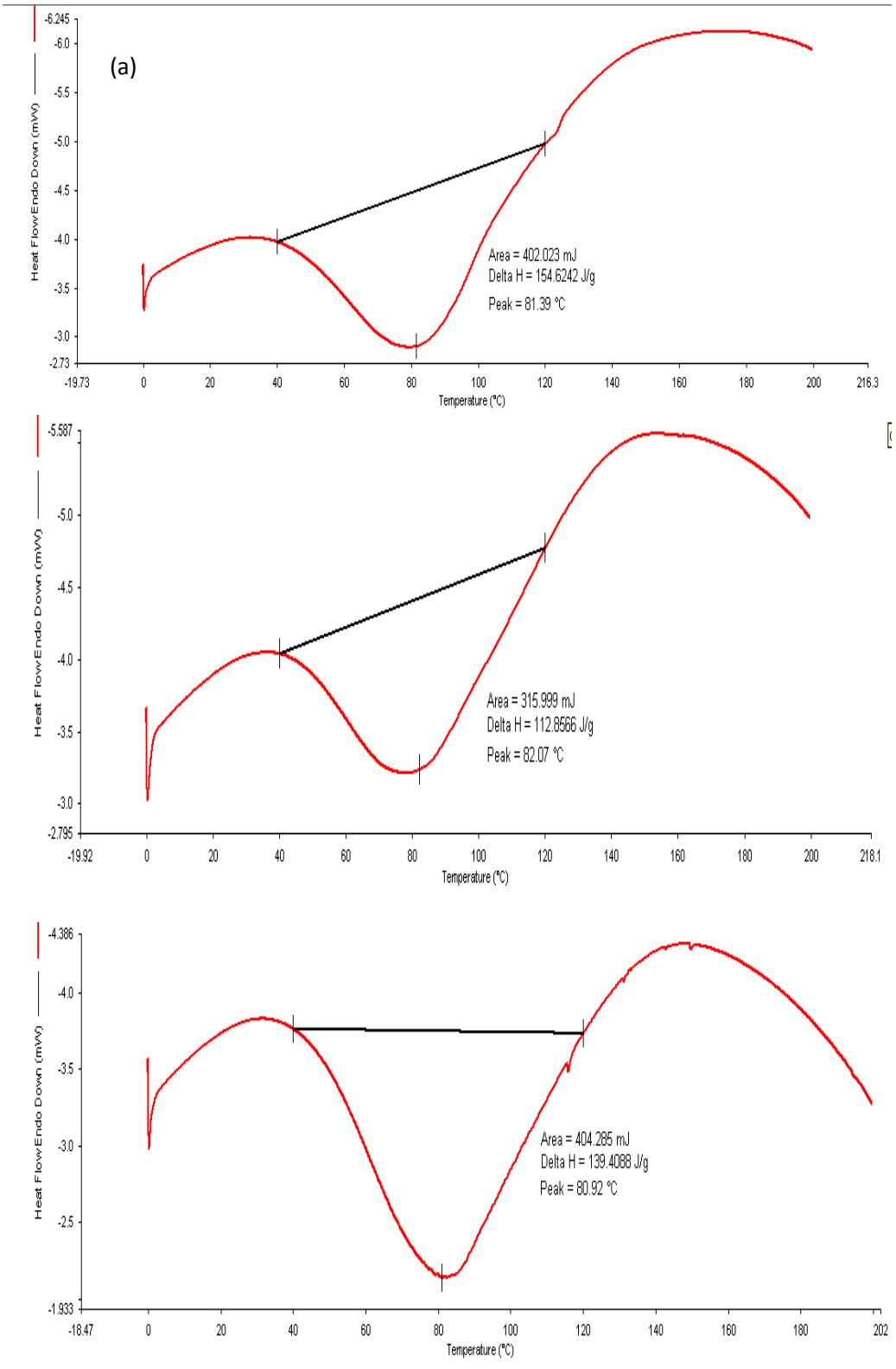
Bulk crosslink için DSC sonuçları ayrı ayrı grafikler halinde verilmiştir. Yapılan testlerde, 40-120 ºC aralığında pik değerleri ve DH değerleri hesaplanmıştır. Bu sıcaklık aralığında, toz jelatin için pik değeri 76 ºC olarak ölçülürken DH değeri, 216 J/g olarak hesaplanmıştır (Şekil 11(a)). Yapılan çapraz-bağlama işleminin verimi değerlendirilirken bu değerler göz önünde bulundurulacaktır. Genipin ve gluteraldehit ajanları kullanılarak oluşturulan bulk malzemede, toz jelatinde görülen 76 ºC'deki pikin kaybolması, ajanların yapıyı bağlayarak tamamen farklı bir malzeme oluştuğunun kanıtıdır. Aynı zamanda pik değerlerinin belirlenen aralıkların oldukça üzerine çıkması, bulk çapraz-bağlama işlemi sonucu oluşturulan ürünlerde termal dayanıklılığın bir hayli arttığını göstermektedir (Şekil 11(b) ve 11(c)). Bunun yanında, toz jelatin için 216 J/g olan DH değeri, bulk çapraz-bağlama ile üretilen malzemelerde, 76 ºC'deki pik noktası kaybolduğu için, aynı aralıklarda azaldığı görülmektedir. Burdan yola çıkarak DH değerinin azalması çapraz-bağlama işleminin başarısını göstermekte olduğu görülmektedir.



Şekil 13. (a) Toz jelatin için DSC grafiği (b) genipin bulk çapraz-bağlama için DSC grafiği (c) gluteraldehit bulk çapraz-bağlama için DSC grafiği

6.3.2 In-situ Çapraz-Bağlama Sonuçları

In-situ çapraz-bağlanan nanofiberler için DSC sonuçları ayrı ayrı grafikler halinde verilmiştir. Yapılan testlerde, 40-120 ºC aralığında pik değerleri ve DH değerleri hesaplanmıştır. Bu sıcaklık aralığında, crosslink işlemi görmemiş kontrol jelatin nanofiberler için pik değeri 81 ºC olarak ölçülürken DH değeri, 154 J/g olarak hesaplanmıştır (Şekil 12(a)). Bu değerler genipin ajanı ile in-situ olarak çapraz-bağlanan nanofiberler için 82 ºC ve 112 J/g iken (Şekil 12 (b)) gluteraldehit ajanı ile üretilen nanofiberlerde 80 ºC ve 139 J/g olarak ölçülmüştür (Şekil 12(c)). Yapılan testler sonucunda, 40-120 ºC aralığındaki pik değerlerinin birbirine çok yakın olmasından dolayı in-situ çapraz-bağlama işleminin nanofiberler üzerinde bariz bir termal dayanıklılık katmadığı görülmüştür. Bunun yanında çapraz-bağlama yapılan her iki ajan için DH değerleri kontrol nanofiberlere göre daha düşük çıkmıştır. İki ajan arasında kıyaslama yapıldığı takdirde, genipin ajanına ait olan daha düşük DH değeri daha verimli bir çapraz-bağlama işleminin göstergesidir.

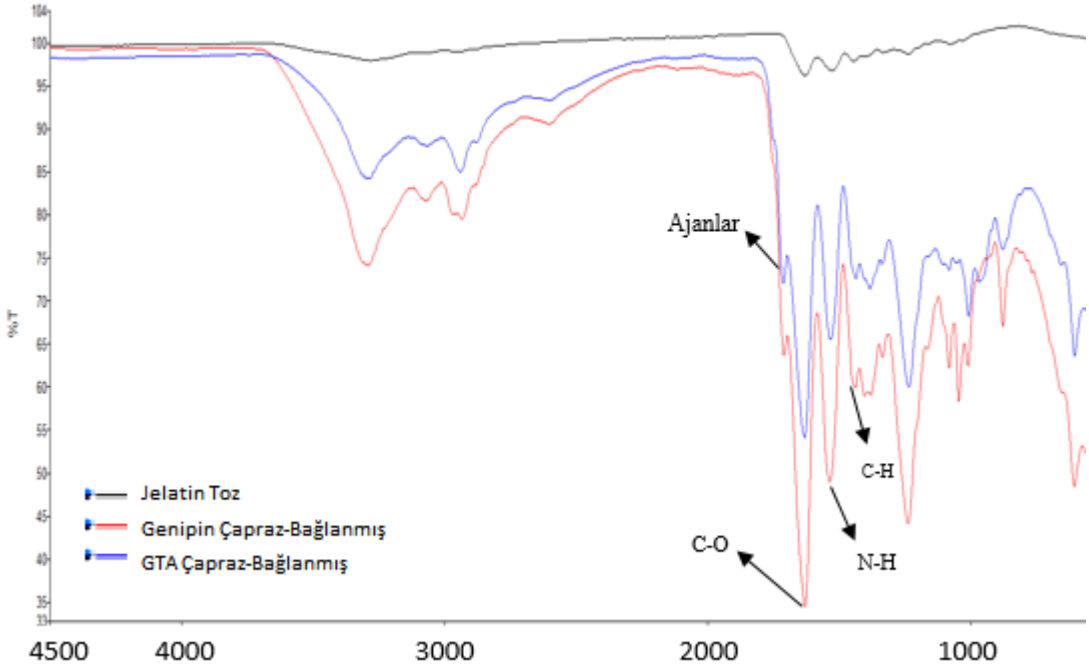


Şekil 14. (a) Kontrol nanofiber için DSC grafiği (b) Genipin ile çapraz-bağlanan nanofiber için DSC grafiği (c) Gluteraldehit ile çapraz-bağlanan nanofiber için DSC grafiği

6.4 FT-IR Sonuçları

Çalışmada yapılan FT-IR sonuçları başlıklar halinde verilmiştir.

6.4.1 Bulk Çapraz-Bağlama Sonuçları

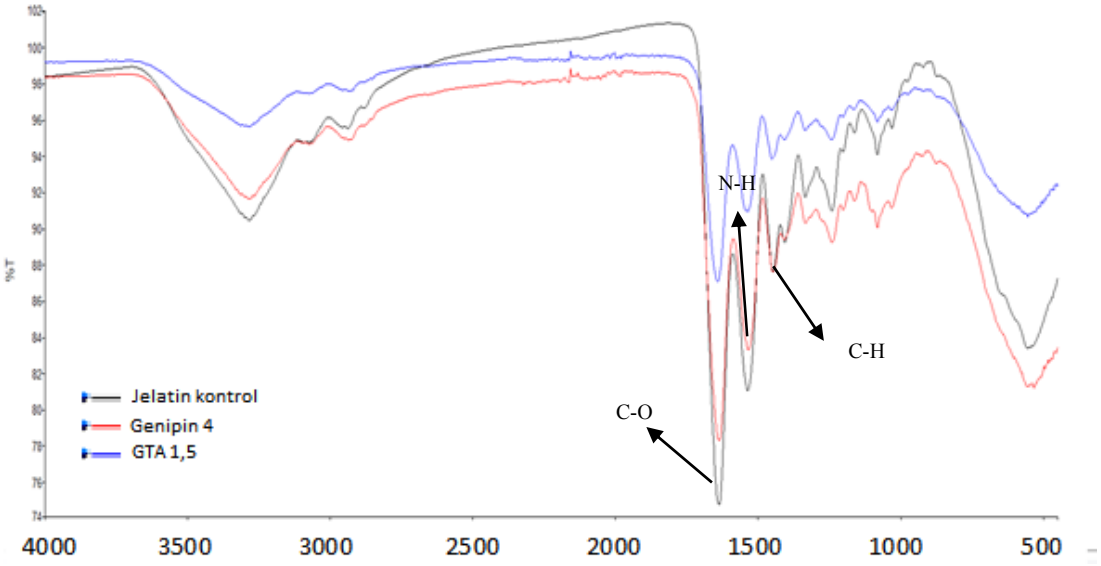


Şekil 15. Bulk çapraz-bağlama için FT-IR grafikleri

Şekil 15' de gösterilen grafiklerden siyah renkte olan toz halinde jelatini, mavi renkte olan gluteraldehit(GTA) ajanı kullanılarak elde edilen bulk jelatin, kırmızı olan ise genipin(GEN) ajanı kullanılarak elde edilen bulk jelatindir. Burada gösterilen pikler, jelatin bulk halinde çapraz-bağlama yapıldıktan sonra yapısında herhangi bir değişiklik olup olmadığı hakkında bilgi vermektedir. Daha önce kollajen hammaddesinde gözlemlediğimiz (şekil) piklerin hemen hemen benzerlerini, pik pozisyonlarında bazı kaymalar ile burada da aynen görmekteyiz. Sırasıyla, amide I adı verilen C-O titreşimi 1680 cm^{-1} dalga boyunda gözlemlenmekte olup, bu kollajen için

belirleyici pik pozisyonudur. Yine kollajen için amide II adı verilen N-H titreşimi 1542-1544 cm^{-1} dalga boyunda görülüp kollajen proteinine aittir. Amide III C-N titreşimi 1256 cm^{-1} dalga boyunda gözlemlenmektedir. Diğer bantlar ise C-H bending 1458 cm^{-1} dalga boyunda ve diğer irili ufaklı bantlar ise kollajen proteinine ait olup farklı moleküler titreşimleri göstermektedir. Daha yüksek dalga boylarında gördüğümüz 2937 cm^{-1} C-H streching titreşimine aittir. Burada ekstra olarak yaklaşık 1700 cm^{-1} dalga boylarında gözlemlenen bant kullanılan ajanlardan kaynaklanmaktadır. Bu da kullanılan ajanlardan bir kısmının elde edilen ürün üzerinde kaldığını tam olarak uzaklaştırılamadığını göstermektedir.

6.4.2 In-situ FT-IR Sonuçları



Şekil 16. In-situ çapraz-bağlanan nanofiberler için FT-IR grafiği

Şekilde gösterilen grafiklerden siyah renkte olan çapraz-bağlama işlemi görmemiş kontrol halinde nanofiberleri, mavi renkte olan gluteraldehit(GTA) ajanı ile çapraz-

bağlama işlemi görmüş nanofiberleri, kırmızı olan ise genipin(GEN) ajanı kullanılarak çapraz-bağlama işlemi görmüş nanofiberleri göstermektedir. Burada gösterilen pikler, in-situ jelatin nanofiberlerin elde edilmesi esnasında yapısında herhangi bir değişiklik meydana gelip gelmediği yani kullanılan ajanların yapısına katılıp katılmadığı ve üzerinde çapraz-bağlama işlemine girmemiş ajan kalıp kalmadığı hakkında bilgi vermektedir. Daha önce jelatin bulk hammaddesinde gözlemlediğimiz (Şekil 15) piklerin hemen hemen benzerlerini, pik pozisyonlarında bazı kaymalar ile burada da aynen görmekteyiz. Sırasıyla, amide I adı verilen C-O titreşimi 1680 cm^{-1} dalga boyunda gözlemlenmekte olup, bu kollajen için belirleyici pik pozisyonudur. Yine kollajen için amide II adı verilen N-H titreşimi 1542-1544 cm^{-1} dalga boyunda görülüp kollajen proteinine aittir. Amide III C-N titreşimi 1256 cm^{-1} dalga boyunda gözlemlenmektedir. Diğer bantlar ise C-H bending 1458 cm^{-1} dalga boyunda ve diğer irili ufaklı bantlar ise kollajen proteinine ait olup farklı moleküler titreşimleri göstermektedir. Daha yüksek dalga boylarında gördüğümüz 2937 cm^{-1} C-H streching titreşimine aittir. Burada bulk jelatinde gördüğümüz yaklaşık 1700 cm^{-1} dalga boylarında gözlemlenen bant artık görünmemektedir. Bunun sebebi de kullanılan ajanların yapıya tamamen katılması ve üretilen nanofiberlerin üzerinde ekstra bir kimyasal kalmadığını göstermektedir.

6.5 UV Spektrofotometre Sonuçları

UV Spektrofotometre sonuçları aşağıda verilmiştir.

6.5.1 Çözücü olarak su ile elde edilen sonuçlar

"Deneysel Kısımlar" başlığında açıklanan protokole bağlı kalarak, serbest amin gruplarının miktarına dair fikir elde edilmek için yapılan, yapılan UV spektrofotometre ölçüm sonuçlar tablo halinde verilmiştir. 2 numaralı tablo ilk çözücü olarak su kullanılan protokolün standart eğrisini oluşturmak için bilinen miktarlarda jelatin kullanılarak yapılan ölçümün sonuçlarıdır. 3 numaralı tablo ise referans eğrisi kullanılarak hesaplanılan, nanofiberlerin sonuçlarıdır. G1 %1'lik G4 ise %4'lük genipinin katılarak üretilen nanofiberleri gösterirken GTA0,5 %0,5'lik, GTA1,5 ise %1,5'luk gluteraldehit katılarak üretilen nanofiberleri göstermektedir.

Tablo 3' de açıkça görüldüğü üzere ilk çözücü olarak su kullanıldığı takdirde serbest amin gruplarının konsantrasyon değerleri birbirine çok yakın çıkmıştır. Bunun yanında genipin ajanı için çelişkili sonuçlar çıkmıştır. Şaibeli bir durum oluşturmaması adına aynı protokol ilk çözücü olarak etanol kullanılarak tekrarlanmıştır.

Tablo 2. Su ile yapılan ölçümün referans eğrisi sonuçları

Örnek Numarası	Örnek Adı	Örnek Tipi	Konsantrasyon	570nm'de Absorbans Değeri
1	Numune 1	Standart	1 mg/ml	0,398
2	Numune 2	Standart	1,5	0,749
3	Numune 3	Standart	2	1,654
4	Numune 4	Standart	2,5	1,950

Tablo 3. Su ile ölçülen UV testinin numune sonuçları

Örnek Numarası	Örnek Adı	Örnek Tipi	Konsantrasyon	570nm'de Absorbans Değeri
1	Kontrol	Nanofiber	0,768	0,096
2	G1	Nanofiber	0,764	0,091
3	G4	Nanofiber	0,809	0,141
4	GTA0,5	Nanofiber	0,741	0,065
5	GTA1,5	Nanofiber	0,727	0,050

6.5.2 Çözücü olarak etanol ile elde edilen sonuçlar

"Deneysel Kısımlar" başlığında açıklanan protokole bağlı kalarak, serbest amin gruplarının miktarına dair fikir elde edilmek için yapılan, yapılan UV spektrofotometre ölçüm sonuçlar tablo halinde verilmiştir. 4 numaralı tablo ilk çözücü olarak etanol

kullanılan protokolün standart eğrisini oluşturmak için bilinen miktarlarda jelatin kullanılarak yapılan ölçümün sonuçlarıdır. 5 numaralı tablo ise referans eğrisi kullanılarak hesaplanılan, nanofiberlerin sonuçlarıdır. G1 %1'lik G4 ise %4'lük genipinin katılarak üretilen nanofiberleri gösterirken GTA0,5 %0,5'lik, GTA1,5 ise %1,5'luk gluteraldehit katılarak üretilen nanofiberleri göstermektedir. Bunlara ek olarak başında "A" harfi olan ölçümler ajanların kendilerinden yapılan ölçüm sonuçlarıdır. İlk çözücü olarak su kullanılan ölçümün aksine, etanol kullanılarak yapılan ölçümler çok daha tutarlı ve mantıklı sonuçlar içermektedir.

Tablo 4. Etanol ile yapılan ölçümün referans eğrisi sonuçları

Örnek Numarası	Örnek Adı	Örnek Tipi	Konsantrasyon	570nm'de Absorbans Değeri
1	Numune 1	Standart	1 mg/ml	0,458
2	Numune 2	Standart	1,5	0,541
3	Numune 3	Standart	2	0,778
4	Numune 4	Standart	2,5	0,781

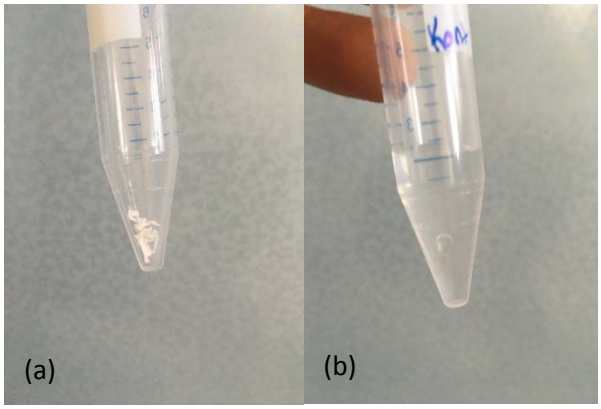
Tablo 5. Etanol kullanılarak yapılan ölçümün numune sonuçları

Örnek Numarası	Örnek Adı	Örnek Tipi	Konsantrasyon	570nm'de Absorbans Değeri
1	Kontrol	Nanofiber	1,333	0,539
2	G1	Nanofiber	2,585	0,833
3	G4	Nanofiber	1,359	0,545
4	GTA0,5	Nanofiber	1,654	0,614
5	GTA1,5	Nanofiber	1,384	0,433
6	AG1	Ajan	0,701	0,021
7	AG4	Ajan	0,709	0,031
8	AGTA0,5	Ajan	0,703	0,024
9	AGTA1,5	Ajan	0,703	0,023

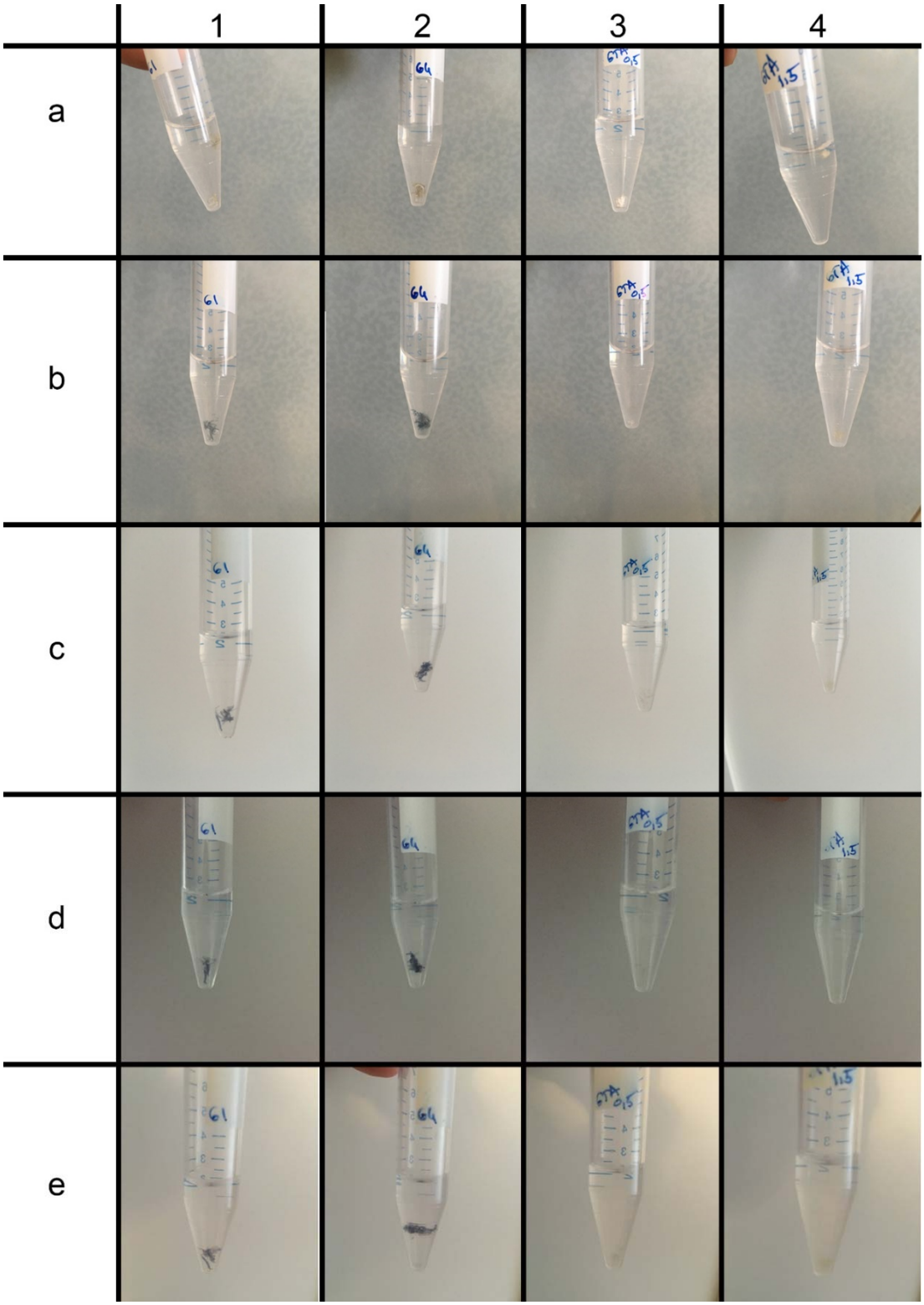
Her bir ajan grubu kendi içerisinde incelendiği takdirde, ajan konsantrasyonlarındaki artışın serbest amin gruplarının konsantrasyonunda bariz bir şekilde azalma sağladığı görülmektedir. Öyle ki genipin ajanı için konsantrasyon neredeyse yarıya düşmüştür. Aynı durum gluteraldehit için de geçerlidir lakin azalma oranı genipine kıyasla daha düşüktür. Tablo 5 incelendiğinde çapraz-bağlama ajanı kullanılarak yapılan ölçümlerin, kontrol ölçümlerinden daha yüksek serbest amin grubu konsantrasyonuna sahip olduğu görülmektedir. İlk etapta bunun sebebi anlaşılmasa da sonra ajanların direkt kendilerinin spektrofotometre ölçümleri yapıldığında anlaşılmıştır ki yapının içindeki ajanlar da serbest amin grubu konsantrasyonuna bir miktar katkıda bulunmaktadır. Bundan dolayı in-situ çapraz-bağlanmış olarak üretilen fiberler kontrol grubundan fazla çıkmaktadır. Fakat burada asıl önemli nokta ajanların kendi içinde ve birbirleriyle olan kıyaslanmasıdır. Ajan konsantrasyonunun artması ile serbest amin grubu konsantrasyonunun azalması çapraz-bağlama işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Tablo 5 sonuçları göz önüne alındığında ise GTA1,5 ile aralarında bariz bir fark olmamasına rağmen, G4 örneği daha verimli sonuçlar sunmaktadır.

6.6 Çözünürlük Deneyi

Fizyolojik şartlara uygun olması için oda sıcaklığında su içerisinde bekletilen nanofiberler gözlemlenmiştir. Bu gözlemler sonucunda, hiçbir çapraz-bağlama işlemi görmeyen kontrol grubunun su içerisine koyulur koyulmaz bozulduğu saptanmıştır(Şekil 17(b)). Buna karşın in-situ olarak üretilen nanofiberlerin dayanımları saat ve günlere göre Şekil 18'de verilmiştir. Harflerle verilen satırlar sırasıyla 0, 6, 12, 24 ve 72 saati göstermektedir. Çapraz-bağlama belirtisi olan renk değişimi her iki ajan için de gözlemlenmiştir. Heriki ajanla üretilen fiberlerde morfolojik olarak bozulmalar gözükmetedir. Buna karşın her iki ajanla üretilen fiberlerin dayanımı, kontrol grubuna oranla neredeyse 1 haftaya yakın uzadığı görülmektedir. Ajanlar arasında kıyaslama yapıldığı takdirde, genipin kullanılarak üretilen nanofiberlerin, gluteraldehit ile üretilen nanofiberlere kıyasla zaman geçtikte yoğunluğunu daha iyi koruduğu ve daha belirgin durduğu alınan görüntülerle kanıtlanmıştır. Bu görüntülerden yola çıkarak genipin ajanının gluteraldehite oranla in-situ çapraz-bağlama açısından daha verimli olduğu sonucunu çıkartmak mümkündür.



Şekil 17. (a) Su eklenmeden önce nanofiberler (b) su eklendikten sonra kontrol nanofiberler



Şekil 18. Su içerisindeki nanofiberlerin zamana göre dayanımları

7.TARTIŞMA

Yaptığımız çalışma aslında iki kısımdan oluşmaktadır. Bunlardan bir tanesi kollajenin farklı hayvansal kaynaklardan ekstraksiyonu ikincisi ise jelatin/kollajen nanofiberlerin elde edilmesi esnasında yapısının sağlamlaştırılması amacına yönelik olarak farklı ajanlarla in-situ çapraz-bağlama yapılmasıdır.

7.1 Kollajen Ekstraksiyon

Kollajen ekstraksiyunu üzerine çalışmamızın başlıca sebepleri arasında kollajenin oldukça kıymetli bir biyomalzeme olması ve ülkemizde bu yönde bir üretim söz konusu olmamasıdır. Aynı zamanda oldukça pahalı bir malzeme olduğu için yurt dışından alımı sırasında oldukça yüklü miktarlar ödenmekte ve yurt dışına aktarılmaktadır. Yapılan bu çalışma yeni bir sektör kurulması ve bu kaynakların ülke içerisinde tutulması açısından önem taşımaktadır. Kollajen ekstraksiyon işlemi için iki farklı kaynak alternatifi tercih edilmiştir. Bu alternatifler sıçan kuyruğu ve sığır derisi olarak belirlenmiştir. Her iki kaynak için farklı ekstraksiyon işlemleri uygulanmıştır. Sıçan kuyruğu ile yapılan ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan yöntem farklılıklarından kaynaklı bir fark gözlemlenmemiştir. Her iki yöntemle de başarılı bir şekilde kollajen elde edilebilmiştir. Sığır derisi için kullanılan Tris-HCl içeren yöntemde, çözünme işlemi sırasında yaşanan problemlerden dolayı başarılı bir sonuç alınamamıştır. Bu yöntemle elde edilen kollajende asit içerisinde beklenen çözülme sağlanamamış bunun yerine yapı tamamen şişerek jelleşmiştir. Deriden pepsin enzimi ile yapılan ekstraksiyon işlemi ise oldukça başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. İki kaynak için avantaj ve dezavantajlar önceki başlıklarda açıklanmıştır. Bunların yanı sıra, elde edilen ürünün başarısı ve kollajenin karakteristik özelliği olan üç boyutlu yapının korunması açısından incelendiğinde, sıçan kuyruğu ile elde edilen yapılarda korunma oranı %60 civarlarında iken deri ile yapılan işlemlerde bu oran neredeyse %100 başarı sağlanmıştır.

7.2 In-situ Çapraz-Bağlama

Elektro-eğirme yöntemi ile elde edilen jelatin/kollajen nanofiberler fizyolojik şartlara dayanıksız olduklarından farklı ajanlar kullanılarak çapraz-bağlama işlemi gerektirmektedir. Ancak bizim de gösterdiğimiz gibi ajanlar kullanılarak sıvı çözeltilerin içine sokulan nanofiberler ya direkt olarak yapıları bozulmakta ya da yeterince bağlanamamaktadırlar. Bu sakıncaların ortadan giderilmesi için üretim esnasında, kullanılan solüsyona belirli ajanların katılmasıyla in-situ çapraz-bağlama alternatif bir yöntem olarak önerilmiştir. Yaptığımız çalışmalarda dört fatklı ajan çapraz-bağlama işlemi için kullanılmıştır. Bunlar GTA, GEN, TGA ve EDC-NHS' dir. Bunlardan sadece iki ajan asidik ortamda başarı ile çapraz-bağlama işlemini gerçekleştirmiştir. Bunlar GEN ve GTA'dır. Yüksek konsantrasyonlarda kullanılması durumlarında yapı kısa sürede bağlanacağından nanofiber oluşumu engellenecek çok düşük konsantrasyonlarda ise etkin bir çapraz-bağlama işlemi meydana gelemeyecektir. Bu nedenle biz GEN için %1-%4 GTA için %0.5 ve %1.5 konsantrasyon değerlerini kullandık. Yaptığımız kimyasal karakterizasyon metodları jelatin/kollajen yapısının bozulmadığını, ajanların yapı içine girmediği gibi yüzeyde de kalmadığını, serbest amin gruplarının ise kullanılan konsantrasyon oranlarına paralel olarak düştüğünü göstermiştir. Termal analiz sonuçları ise in-situ de olduğu gibi düşük konsantrasyonlarda ajanların katılmasının, malzemenin termal özelliklerini fazla etkilememesi ancak bulk malzemede ise termal özelliklerin tamamen değiştiği gözlemlenmiştir. Görsel sonuçlar ise, çapraz-bağlanmamış olmamış nanofiberlerin suya karşı hiçbir dayanım göstermemesine rağmen in-situ olarak çapraz-bağlama yapılmış nanofiberlerin berlirli bir süre yapısının korunduğunu göstermiştir.

Gelecek Çalışmalar

Kollajen ekstraksiyon işlemi için kaynak olarak sıçan kuyruğu kullanılan yöntem için, yapının daha fazla korunması ve verimin arttırılması üzerine çalışılabilir. Aynı şekilde hem kuyruk hem deri kullanılarak yapılan üretim yöntemleri için safsızlık oranına bakılması ve gerektiği takdirde arttırılması ve spesifik olarak belirli kollajen tiplerinin üretilmesi üzerine çalışmalar geliştirilebilir.

In-situ çapraz-bağlanmış olarak üretilen nanofiberler ise daha uygun fizyolojik şartlarda örneğin hücre medyumlarında, dayanıklılıkları test edilebilir. Bunun yanında yapılacak hücre testleri ile biyo-uyumlulukları araştırılmaları gerekmektedir.

KAYNAKÇA

Andrady, A. L. (2008). *Science and Technology of Polymer Nanofibers.* New Jersey: A John Wiley & Sons.

Aras, O., & Kazanci, M. (2015). Production of collagen micro- and nanofibers for potential drug-carrier systems. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 1-4.

Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv*, 325-347.

Biswas, A., Bayer, I. S., Biris, A. S., Wang, T., Dervishi, E., & Faupel, F. (2012). Advances in top–down and bottom–up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2-27.

Bornstein, P., & Sage, H. (1980). Structurally Distinct Collagen Types. *Annual Review of Biochemistry*, 957-1003.

Brinckmann, J., Nothbom, H., & Müller, P. K. (2005). *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly.* Springer.

Bürck, J., Aras, O., Bertinetti, L., İlhan, C. A., Ermeydan, M. A., Schneider, R., . . . Kazanci, M. (2017). Observation of triple helix motif on electrospun collagen nanofibers and its effect on the physical and structural properties. *Journal of Molecular Structure*, 73-80.

Bürck, J., Heissler, S., Geckle, U., Ardakani, M. F., Schneider, R., Ulrich, A. S., & Kazanci, M. (2013). Resemblance of electrospun collagen nanofibers to their native structure. *Langmuir*, 1562-1572.

Doshi, J., & Reneker, D. H. (1995). Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*, 151-160.

Duan, X., & Sheardown, H. (2005). Crosslinking of collagen with dendrimers. *J Biomed Mater Res A*, 50-62.

ElectrospinTech. (2012, Mart). www.electrospintech.com adresinden alındı

Engel, J., & Bachinger, H. P. (2005). Structure, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix. *Topics in Current Chemistry*, 7-33.

Feynman, R. P. (1960). There's Plenty of Room at the Bottom. *Caltech's Engineering and Science*.

Fratzl, P. (2008). Collagen: Structure and Mechanics, an Introduction. *Springer*, 1-13.

Galian, B., & Bowes, J. H. (1977). *The structure and properties of collagen.* London: Academic Press.

Herrera-Herrera, A., Gonzalez, M. A., Borges, J. H., & Rodriguez, M. A. (2012). Carbon nanotubes applications in separation science: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1-30.

Hinterwaldner, R. (1977). Technology of gelatin manufacture [Extraction from skins, hides, bones].

Kozlov, P. V., & Burdygina, G. I. (1983). The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification. *Polymer*, 651-666.

Kumar , S., Ito, T., Yanagihara, Y., Oaki, Y., Nishimura, T., & Kato, T. (2010). Crystallization of unidirectionally oriented fibrous calcium carbonate on thermo-responsive polymer brush matrices. *CrystEngComm*, 2021-2024.

Kumar, P. R., Khan, N., Vivekanandhan, S., Satyanarayana, N., Mohanty, A. K., & Misra, M. (2012). Nanofibers: Effective Generation by Electrospinning and Their Applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 1-25.

Leach, M. K., Feng, Z.-Q., Tuck, S. J., & Corey, J. M. (2011). Electrospinning Fundamentals: Optimizing Solution and Apparatus Parameters. *Journal of Visualized Experiments*.

Lin, S.-Y., & Wang, S.-L. (2012). Advances in simultaneous DSC–FTIR microspectroscopy for rapid solid-state chemical. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 461-468.

Mohanty, A. K., Misra, M., & Drazel, L. T. (2005). *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites.* CRC Press.

Nimni, M. E., Cheung, D. T., Strates, B., Kodama, M., & Sheikkh, K. (1988). Bioprosthesis derived from cross-linked and chemically modified collagenous tissues. *Biotechnology*, 1-37.

OMEGA. (tarih yok). *Equilibrium Relative Humidity Saturated Salt Solutions.*

Rad, M. K., Youzbashi, A. A., & Ghelich, R. (2005). Study on Morphology and Size Distribution of Electrospun NiO-GDC Composite Nanofibers. *Journal of Engineered Materials*.

Rajan, N., Habermehl, J., Cote, M.-F., Doillon, C. J., & Mantovani, D. (2007). Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon fpr tissue engineering applications. *Nature Protocols*, 2753-2758.

Settle, F. A. (1997). Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. F. A. Settle içinde, *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry.* New Jersey: Prentice Hall PTR.

Sheu, M.-T., Huang, J.-C., Yeh, G.-C., & Ho, H.-O. (2001). Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices. *Biomaterials*, 1713-1719.

Sibilla, S., Godfrey, M., Brewer, S., Budh-Raja, A., & Genovese, L. (2015). An Overview of the Beneficial Effects of Hydrolysed Collagen as a Nutraceutical on Skin Properties: Scientific Background and Clinical Studies. *The Open Nutraceuticals Journal*, 29-42.

Son, W. K., Youk, J. H., Lee, T. S., & Park, W. H. (2004). The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*, 2959-2966.

Stone, V., Nowack, B., Baun, A., Brick, N., Dusinska, M., Handy, R., . . . Fernandes, T. F. (2010). Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *Science of The Total Environment*, 1745-1754.

Sung, H.-W., Huang, R.-N., Huang, L., & Tsai, C.-C. (1999). In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* , 63-78.

Taniguchi, N. (1974). On the Basic Concept of “Nano-Technology. *Japan Society of Precision Engineering*.

Wang, H. S. (2004). *Amino acid assay by ninhydrin colorimetric method.*

Wei, Q. (2012). *Functional Nanofibers and their Applications.* Woodhead Publishing .

www.understandingnano.com. (2007). UnderstandingNano: http://www.understandingnano.com/nanotech-applications.html adresinden alındı

Zeng, H., Li, J., Liu, J. P., Sun, S., & Zhong, L. W. (2002). Exchange-coupled nanocomposite magnets by nanoparticle self-assembly. *Nature*, 395-398.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Selçuk Kaan HACIOSMANOĞLU
Uyruğu: T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri: 22 Mart 1993, İstanbul
Elektronik Posta: skh.oglu@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Lisans	İÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2015
Yüksek Lisans	İMU, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanobilim ve Nanomühendislik	2016-

YABANCI DİLLER

İyi düzeyde İngilizce

YAYINLAR

Hacıosmanoğlu, Kaan, Selçuk., Büerck, Jochen., Kazanci, Murat. "Production of Collagen Nanofibers and Unfolding of the Structure" *Biological and Chemical Research,* 25(2018),

HOBİLER

Doğa yürüyüşü, Dalış,