

BİYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN POLİSAKKARİT ESASLI NANOLİFLİ YÜZEY ÜRETİMİ VE ÇAPRAZ BAĞLANMASI

*Serife ŞAFAK**
*Esra KARACA***

Alınma: 28.04.2017; düzeltme: 29.09.2017; kabul: 05.10.2017

Öz: Polisakkarit esaslı polimerler, biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada; polisakkarit hyaluronik asit, karboksimetil selüloz ve sodyum alginat polimerleri kullanılarak elektro çekim yöntemiyle nanolifli yüzey üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen nanolifli yüzeye, suya dayanımını geliştirmek amacıyla, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorit ve N-hidroksisülfosüksinimit karışımı ile çapraz bağlama işlemi uygulanmıştır. Nanolifli yüzey, çapraz bağlama işlemi öncesi ve sonrasında, taramalı elektron mikroskobu, fourier transform infrared spektrometresi, atomik kuvvet mikroskobu, BET analizi ve suya dayanım testi ile karakterize edilmiştir. Sonuçlar; çapraz bağlama işlemi ile lifli yapının deformasyona uğramadan nanolifli yüzeyin suya dayanıklı hale geldiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Hyaluronik asit, karboksimetil selüloz, sodyum alginat, nanolif, elektro çekim, çapraz bağlama

Production and Crosslinking of Polysaccharide Based Nanofibrous Mat for Biomedical Applications

Abstract: Polysaccharide based polymers are widely used in biomedical applications. In this study, nanofibrous mat was produced from hyaluronic acid, carboxymethyl cellulose and sodium alginate polysaccharide polymers via electrospinning method. Resultant nanofibrous mat was crosslinked with 1-etil-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride and N-hydroxysulfosuccinimide solution to develop its water resistance. Before and after the crosslinking process, nanofibrous mat was characterized by scanning electron microscope, fourier transform infrared spectrometry, atomic force microscope, BET analysis and water resistance test. The results indicated that the nanofibrous mat was become resistant to water without any deformation of nanofibrous structure with the crosslinking application.

Keywords: Hyaluronic acid, carboxymethyl cellulose, alginate, nanofiber, electrospinning, crosslinking

1. GİRİŞ

Nanolifler genel olarak, çapı 1000 nanometrenin altında olan lifler olarak tanımlanmaktadır (Deitzel ve diğ., 2001; Zhang ve diğ., 2009). Biyomedikal uygulamalar, nanoliflerin en fazla kullanıldığı alanlardan biridir. Tıbbi protezler, suni damar ve organ uygulamaları, yara örtüleri, ilaç dağıtım sistemleri, doku iskeleleri, cilt bakım ürünleri gibi birçok kullanım alanında nanolif esaslı malzemeler tercih edilmektedir. Nanoliflerden oluşan yüzeylerin sahip olduğu geniş spesifik yüzey alanı ve nano gözenekli yapısı; oksijen ve hava geçirgenliği sağlarken,

* Namık Kemal Üniversitesi, Çorlu Mühendislik Fakültesi, Tekstil Mühendisliği Bölümü, 59860, Çorlu, Tekirdağ

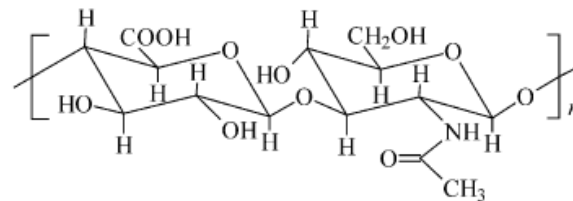
** Uludağ Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Tekstil Mühendisliği Bölümü, 16059, Görükle, Bursa

İletişim Yazarı: Esra Karaca (ekaraca@uludag.edu.tr)

bakterilere karşı bariyer özelliği sergilemektedir. Elektro çekim yöntemi, son yıllarda üzerine en çok araştırma yapılan nanolifli yüzey üretim tekniğidir. Elektro çekim yöntemiyle elde edilen nanolifli yüzeyler; doğal insan ekstraselüler matriksine (ECM) çok benzer, bu yüzden hücre kültürü ve doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi olarak kullanılabilir. Ayrıca, hücre gelişiminde ve üç boyutlu hücresel kolonilerin oluşumunda etkinlikleri kanıtlanmıştır. Böylece herhangi bir hastalık, yaralanma veya doğuştan gelen hasarlar nedeniyle zarar gören hücreler yerine yeni hücresel yapıların oluşumlarını hızlandırmak amacıyla, çeşitli polimerlerden üretilen nanolifli yüzeyler; yara örtüsü, ilaç salınım sistemi ve doku iskelesi olarak kullanılmıştır (Ramakrishna ve diğ., 2005; Kriegel ve diğ., 2008; Amiralıyan ve diğ., 2009; Kumar, 2010; Şafak, 2016)

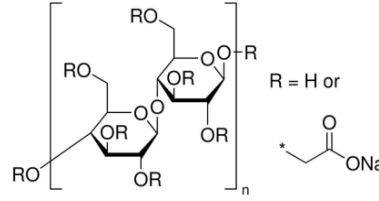
Günümüzde hayvansal (protein) ve bitkisel (polisakkarit) kaynaklı doğal polimerler; biyokimyasal yapıları sayesinde vücut tarafından sorunsuz bir şekilde tanınıp kabul edilebilmeleri nedeniyle, özellikle ilaç salınımı, tedavi ve rejenerasyona yönelik biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Polisakkaritler genellikle bitkisel, hayvansal ve mikroorganizmalar gibi yenilenebilir kaynaklardan elde edilir. Karbonhidratların yapı taşları olan monosakkaritler, birbirlerine O-glikozidik bağlar vasıtasıyla bağlanarak polisakkarit zinciri oluştururlar. Polisakkaritlerin fizikokimyasal özellikleri; polisakkarit zincirini oluşturan monosakkaritlerin oluşturduğu zincir yapısına, kompozisyonuna ve kaynağına bağlı olarak değişir. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan polisakkarit polimerler; selüloz, kitin/kitosan, nişasta, alginat, hyaluronik asit, karboksimetil selüloz, pullulan, glikoz aminoglikandır. Bu çok fonksiyonlu biyopolimerler, farklı elektriksel yüklere, monomer kompozisyonlarına ve geniş bir molekül ağırlığı aralığına sahiptirler. Dolayısıyla; bu polimerlerin hidrofilitesi, suda çözünürlüğü, biyolojik aktivitesi, biyoyuymuluğu ve bozunma özellikleri birbirinden farklıdır (Shelke ve diğ., 2014).

Hyaluronik asit (HA), ilk defa gözdeki retinanın saydam sıvısından izole edilmiş uzun zincirli bir polisakkarittir. N-asetil-D-glikozamin ve D-glukoronik asitin β -1,3 ve β -1,4 glikozidik bağıyla bağlanmasıyla meydana gelen disakkarit birimlerinin tekrarlarından oluşmaktadır (Şekil 1). HA, yaşayan bütün organizmalarda; kıkırdak, eklem sıvısı, deri ve göbek kordonu gibi çeşitli bölgelerde hücreler arasındaki ekstraselüler alanın ana komponentlerinden biridir. HA, horoz ibiği, bebek kordonu ve diğer bazı hayvani kaynaklardan saflaştırılabilir. Ayrıca, bakteriden fermentasyon ve izolasyon metotlarıyla elde edilebilir (Price ve diğ., 2007; Frenot ve diğ., 2007; Dıraçoğlu, 2007). Yüksek molekül ağırlıklı ve negatif yüklü oluşu nedeniyle sahip olduğu suyu absorbe etme yeteneği, yüksek viskoelastikyeti ve toksik olmama özellikleri HA'nın kozmetik, biyomedikal ve gıda endüstrisinde kullanılmasını sağlamaktadır. Biyoyumlu ve biyobozunur yapısı nedeniyle HA polimeri, jel ve/veya film halinde özellikle doku mühendisliği uygulamalarında yer bulmuştur (Frenot ve diğ., 2007; Aytar ve diğ., 2013; Collins ve Birkinshaw, 2013). Literatürde elektro çekim yöntemiyle üretilen HA nanolifli yüzeylerin doku iskelesi ve yara örtüsü olarak kullanılabilirliğine ilişkin çeşitli çalışmalar mevcuttur (Uppal ve diğ., 2011; Ji ve diğ., 2006a; Ji ve diğ., 2006b; Kim ve diğ., 2008a; Yao ve diğ., 2007).



Şekil 1:
Hyaluronik asitin moleküler yapısı (Dıraçoğlu, 2007)

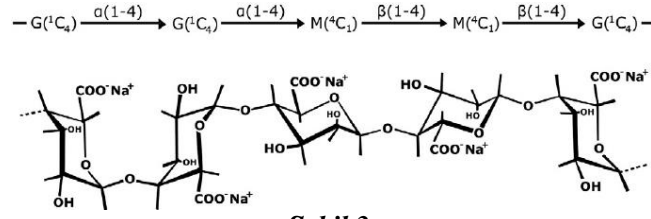
Anyonik, suda çözünebilir karboksimetil selüloz (CMC) polimeri, selülozun karboksile edilmesiyle üretilir ve selüloz eterleri grubuna girer. Beyaz ile sarımsı arası renkte ve lifli yapıdadır. CMC, alkali grupların ve kloroasetik asidin reaksiyonu sonucu selüloz zincirini oluşturan glukopiranoz monomerlerinin hidroksil gruplarına, karboksimetil gruplarının bağlanması ile oluşan bir selüloz türevidir. CMC molekül zincirlerini oluşturan tekrar ünitesi, selüloz grubuna bağlı β -(1-4)-D-glukopiranozdan ibarettir (Şekil 2). CMC polimeri; iyonlanmış karboksil grupları nedeniyle, negatif yüklü, uzun ve bükülmez özellikte moleküllere sahiptir ve bu moleküller çözelti içinde birbirlerini iter. Bu nedenle CMC çözeltileri, yüksek viskoziteli stabil bir yapı gösterirler. CMC'nin fizyolojik olarak inert olması, sudaki çözünürlüğü, belli pH'a dayanıklılığı, su tutma kapasitesinin yüksek olması, diğer kolloidlerle olan geçimliliği ve düşük miktarlarda kullanımının yeterli olması, kullanım alanlarında tercih edilmesinin başta gelen sebeplerindendir. Bu polimer özellikle tekstil, kağıt, ilaç, seramik, kozmetik ve gıda sanayinde; bağlayıcı, şişirici, jelleştirici, yapıştırıcı ve stabilizatör ajanı olarak kullanılmaktadır (Kırcı, 2001). Sulu çözeltilerinin kararlı jet oluşturmaması nedeniyle CMC polimerinin elektro çekimi oldukça güçtür. Literatürde yer alan çalışmalarda (Zhang ve diğ., 2013; Qiu ve Hu, 2013; Qiu ve diğ., 2014a; Qiu ve diğ., 2014b; Qiu ve diğ., 2014c; Qiu ve diğ., 2014d; Qiu ve diğ., 2014e; Frenot ve diğ., 2007); yardımcı polimerler kullanılarak veya çeşitli katkıları ilave edilerek üretilen CMC nanolifli yüzeyler, lityum iyon bataryalarda ve ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmıştır.



Şekil 2:

Karboksimetil selülozun moleküler yapısı (Sigma-Aldrich, 2016)

Alginat, kahverengi deniz yosunlarından elde edilen doğal bir polisakarittir ve bu yosunların hücre duvarlarında alginik asidin kalsiyum, magnezyum ve sodyum tuzları olarak bulunmaktadır. Alginatın kalsiyum ve magnezyum tuzları suda çözünmezken, sodyum tuzu suda çözünmektedir. Polimerik yapısının; α -L-guluronik asit (G) ve β -D-mannuronik asit (M) olmak üzere iki tip monomer asitin bloklar halinde birleşmesiyle oluşması dolayısı ile sodyum alginat, blok kopolimer olarak tanımlanmaktadır (Şekil 3). Selülozla yapısal olarak benzerlik gösteren alginik asidin kimyasal formülünde, selülozdan farklı olarak sadece, $-\text{CH}_2\text{OH}$ grubu yerine $-\text{COOH}$ grubu yer almaktadır (Qin, 2008). Alginatlar; gıda, ecza, medikal, tekstil ve kağıt endüstrisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Son zamanlarda ise özellikle biyomedikal ve medikal alanlarda kullanımı artmıştır. Sodyum alginatın yara iyileşmesini kolaylaştıran spesifik özellikleri, yüksek nem emme ve iyon değişimi yetenekleri, mükemmel biyoyumluluğu ve kanamayı durdurucu özellikleri, yüksek absorbent yara örtülerinin üretiminde eşsiz bir hammadde olmasını sağlamaktadır (Coşkun Üstündağ, 2009). Alginat polimeri uzun ve rijit bir zincir yapısına sahiptir. Rijit zincir yapısı ve yüksek elektrik iletkenliği nedeniyle sulu sodyum alginat çözeltilerinin tek başına elektro çekime tabi tutulması oldukça zordur. Literatürde, yardımcı polimerler varlığında elektro çekim yöntemiyle üretilen alginat nanolifli yüzeylerin yara örtüsü (Shalumon ve diğ., 2011; Tarun ve Gobi, 2012; Coşkun ve diğ., 2014), doku iskelesi (Jeong ve diğ., 2010a; Jeong ve diğ., 2010b; Ma ve diğ., 2012) ve ilaç salınım sistemi (Yang ve diğ., 2007) olarak kullanımına yönelik çalışmalar yer almıştır.



Şekil 3:

Sodyum alginatın moleküler yapısı (Steele ve diğ., 2014)

Çapraz bağlama işlemi, kimyasal metotla iki veya daha fazla molekülün kovalent bağ ile birbirine eklenme işlemidir. Literatürde (Frenot ve diğ., 2007; Qiu ve Hu, 2013) CMC, HA ve NaAlg polimerleri için kullanılan çapraz bağlayıcı ajanlar; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorit, N-hidroksisülfosüksinimit, divinil sülfon, etilenglikoldiglisit eter, kalsiyum klorür, sitrik asit ve glutraldehit olarak belirtilmiştir.

Bu çalışmada biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere CMC, HA ve NaAlg polimerlerinden elektro çekim yöntemi ile nanolifli yüzey üretimi yapılmıştır. Kullanılan polimerler suda çözünme özelliğine sahip olduğu için, üretilen nanolifli yüzeyin suya ve su buharına dayanımı düşüktür. Biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere önerilen nanolifli yüzeye, fiziksel bütünlüğünü koruması ve böylece pratikteki uygulamalarını kolaylaştırmak amacıyla çapraz bağlama işlemi uygulanmıştır. Üretilen yüzeyin kalınlığı ve yüzeyi oluşturan lif çapları tayin edilmiştir. Çapraz bağlama işleminin nanolifli yüzeyin morfolojik ve kimyasal özellikleri üzerindeki etkisi, taramalı elektron mikroskobu, fourier transform infrared spektrometresi, atomik kuvvet mikroskobu ve yüzey alanı/mikro gözenek boyutu cihazı ile analiz edilmiştir. Ayrıca, çapraz bağlama işleminin etkinliği suya dayanım testi ile belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

Bu çalışmada elektro çekim yöntemiyle nanolifli yüzey üretimi için, HA (Sigma Aldrich, 1.500.000-2.000.000 g/mol), CMC (Sigma Aldrich, 250.000 g/mol) ve NaAlg (Cargill Cicalgum S1300, 700-900 cps) polimerleri kullanılmıştır. Polimer çözeltilerinin hazırlanmasında çözücü olarak; saf su, sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma Aldrich) ve dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck) temin edilmiştir. Çapraz bağlama işleminde ise; Sigma Aldrich firmasına ait 191,70 g/mol molekül ağırlığında 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) ve 115,09 g/mol molekül ağırlığında N-hidroksisülfosüksinimid (NHS) kullanılmıştır.

2.2. Metod

2.2.1. Polimer Çözeltisinin Hazırlanması ve Elektro Çekim İşlemi

Sulu CMC ve NaAlg çözeltileri; CMC ve NaAlg polimerlerinin saf su içerisinde %2'lik konsantrasyonda, 80°C sıcaklıkta 8 saat süre ile manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmasıyla elde edilmişlerdir. HA polimerinin %12'lik konsantrasyonu ise, hacimce 4/1 oranda 0,5 M NaOH/DMSO çözücü sisteminde HA polimerinin, 8 saat süreyle oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmasıyla elde edilmiştir. HA/CMC/NaAlg çözeltisi ise, hacimce 3/1/1 oranında %12 HA / %2 CMC / %2 NaAlg polimerleri karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden nanolifli yüzey üretimi, Uludağ Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Laboratuvarı'nda kurulu olan INOVENSO Elektro Çekim Ünitesi'nde (Şekil 4) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4:
Üretim çalışmalarında kullanılan Elektro Çekim Ünitesi

HA/CMC/NaAlg çözeltisinden elektro çekim yöntemi ile nanolifli yüzeyler elde edilirken; besleyici olarak 530 μ iç çapa sahip şırınga iğnesi, toplayıcı olarak 200 d/d hızla dönen alüminyum silindir kullanılmıştır. Üretim esnasında; çözelti besleme hızı 0,5 ml/saat, uygulanan voltaj değeri 22 kV, iğne ucu ile toplayıcı plaka arasındaki mesafe 8,5 cm olarak ayarlanmıştır.

2.2.2. Nanolifli Yüzeyin Çapraz Bağlama İşlemi

Literatür bilgileri ve gerçekleştirilen ön çalışmalar ışığında; üretilen nanolifli yüzeyin, toksik etkileri olmadan ve morfolojik özelliklerine zarar vermeden suya dayanımını geliştirmek üzere EDC ve NHS çapraz bağlama ajanları kullanılmıştır.

Bu amaçla; EDC ve NHS'nin etanol içerisinde 1 saat süreyle oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmasıyla 80 mM EDC ve 100 mM NHS çözeltileri elde edilmiştir. Hacimce 1/1 oranında karıştırılan EDC ve NHS çözeltileri, 1 saat süreyle oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda işlem görmüş ve nihai çapraz bağlama çözeltisi elde edilmiştir. Nanolifli yüzey, hazırlanan EDC/NHS çözeltisi içerisinde daldırılarak 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda herhangi bir yapısal bozunmaya, jelleşmeye ya da çözünmeye uğramaksızın çapraz bağlanan nanolifli yüzey, çözeltilerden çıkarılmış, etanol içerisinde çalkalanarak inkübatörde 37 °C'de 12 saat kurumaya bırakılmıştır.

2.2.3. Nanolifli Yüzeyin Karakterizasyonu

Üretilen nanolifli yüzeyin çapraz bağlama öncesi ve sonrasında yüzey morfolojisinin karakterize edilmesi için; altın-palladyum kaplama yapılarak Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü'nde bulunan Carl Zeiss AG-EVO 40 XVP Taramalı Elektron Mikroskobu'nda (SEM) analizi yapılmış ve fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen fotoğraflar üzerinde ImageJ (National Institute of Health, USA) programı kullanılarak on adet lifin çapı (inceliği) ölçülmüş, ortalama ve standart sapma değerleri elde edilmiştir. Ayrıca, SEM cihazına bağlı Enerji Dağılım Spektrometresi (EDS) ile yüzeydeki elementlerin tayini yapılarak grafiksel olarak dağılımları elde edilmiştir.

Üretilen nanolifli yüzeyin kalınlığı; çapraz bağlama öncesi ve sonrasında, elektronik dijital mikrometre ile on noktadan ölçülerek, ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

Yüzey morfolojisindeki değişimler; Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan NT-MDT AFM NTEGRA Solaris Atomik Kuvvet Mikroskobu'nda (AFM) incelenmiştir. AFM ölçümleri esnasında, yarı kontakt modda tarama probu kullanılarak, hava ortamında iki ve üç boyutlu görüntüler alınmıştır. Çapraz bağlama yapılmamış ve yapılmış nanolifli yüzey için ortalama yüzey pürüzlülüğü, yüzey çarpıklığı, yüzey basıklığı ve maksimum yükseklik değerleri Image Analysis programı ile hesaplanmıştır.

Üretilen nanolifli yüzeyin çapraz bağlama öncesi ve sonrasında, Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan Micromeritics TriStar II PLUS BET Yüzey Alanı ve Mikro Gözenek Boyutu Analiz Cihazı kullanılarak spesifik yüzey alanı, ortalama gözenek boyutu ve toplam gözenek hacmi değerleri tespit edilmiştir.

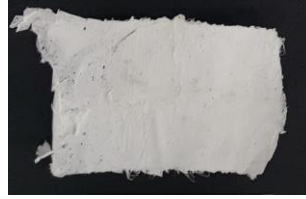
Çapraz bağlama işleminin kimyasal etkilerini görmek amacıyla; Bursa Teknik Üniversitesi Lif Polimer Mühendisliği Bölüm Laboratuvarı'nda bulunan Thermo-Nicolet-IS50 Fourier Transform Infrared Spektrometresi (FTIR) kullanılmıştır. Analizler 350–4000 cm^{-1} aralığında gerçekleştirilmiştir.

Uygulanan suya dayanım testinde; 2x2 cm^2 boyutlarında çapraz bağlama yapılmamış ve yapılmış yüzey 24 saat boyunca oda sıcaklığında saf su içerisinde bekletilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Nanolifli Yüzey Üretimi ve Çapraz Bağlama Mekanizması

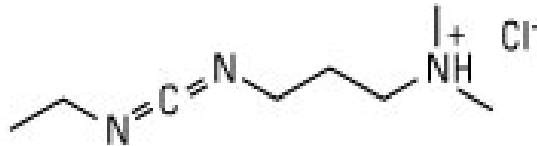
Literatürde (Fang ve diğ., 2011; Bhattarai ve diğ., 2006; Lu ve diğ., 2006; Safi ve diğ., 2007; Zhang ve diğ., 2013; Xie ve diğ., 2012; Qiu ve diğ., 2014a; Stijnman ve diğ., 2011; Li ve diğ., 2006; Liu ve diğ., 2011), HA, CMC ve NaAlg polimerlerinin tek başlarına elektro çekime tabi tutulduğunda; viskozite, yüzey gerilimi ve elektriksel iletkenlik değerlerinin yüksekliği, yetersiz zincir karmaşıklığı gibi nedenlerden dolayı çeşitli sorunlarla karşılaşıldığı bildirilmiştir. Bu polimerlerin elektro çekim verimliliği, polivinil alkol (PVA) ve polietilen oksit (PEO) gibi yardımcı polimerler sayesinde artırılarak etkin nanolifli yüzey üretimi yapılabilmektedir. Bu çalışmada; %12 HA, %2 CMC ve %2 NaAlg polimer çözeltilerinin hacimce 3/1/1 oranında karışımından, yardımcı bir polimer kullanılmadan, nanolifli yüzey (Şekil 5) üretimini gerçekleştirmek mümkün olmuştur.



Şekil 5:
Üretilen HA/CMC/NaAlg nanolifli yüzey

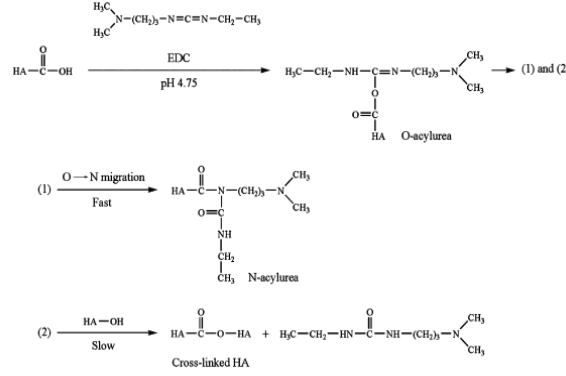
Nanolifli yüzeyin üretiminde kullanılan HA, CMC ve NaAlg suda çözünen polimerlerdir. Bu nedenle, elde edilen nanolifli yüzeyin suya ve su buharına dayanımı düşüktür. Bu durum; biyomedikal uygulamalarda kullanılması planlanan nanolifli yüzeyin, suya dayanımının artırılması için, uygun bir çapraz bağlama işlemine tabi tutulmasını gerektirmektedir. HA/CMC/NaAlg nanolifli yüzeyin çapraz bağlanmasında, EDC ve NHS çapraz bağlama ajanları kullanılmıştır.

EDC (Şekil 6); karboksil grupları primer aminlere birleştirmek üzere kullanılan, suda çözünebilir, biyouyumlu ve toksik olmayan bir çapraz bağlama ajanıdır. EDC'nin çapraz bağlanmış yapı içerisine dahil olmaması yani polimer moleküllerine bağlanmaması, özellikle biyomedikal alanda kullanılan malzemeler için önerilmesini sağlamaktadır (Lu ve diğ., 2008; Xu ve diğ., 2009; Collins ve Birkinshaw, 2007).



Şekil 6:
EDC'nin kimyasal yapısı (G-Biosciences, 2016)

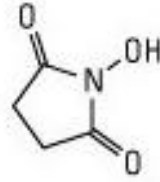
EDC, polisakkarit moleküllerindeki karboksil gruplarını aktive edip, hidroksil ve karboksil grupları arasında ester bağı oluşturarak bağlama yapar. Şekil 7'de örnek olarak verilen reaksiyon mekanizmasında; HA polimerinin karboksil grupları, karbodiimid ile aktive edilmekte ve O-açilüre kararsız ara ürünü oluşmaktadır. Bu kararsız ara ürün kısa ömürlü olup parçalanarak, HA polimerinin hidroksil ve karboksil gruplarının birbirine bağlanmasını sağlamaktadır (Lu ve diğ., 2008; Tomihata ve Ikada, 1997).



Şekil 7:

EDC'nin HA'yı çapraz bağlama reaksiyon mekanizması (Lu ve diğ., 2008)

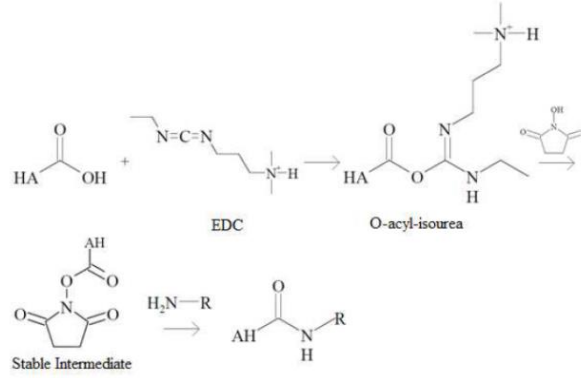
NHS (Şekil 8); karboksilik asit gruplarını aktifleştirmek amacıyla kullanılan bir çapraz bağlama ajanıdır. Normal bir karboksilik asit, aminlerle tuz oluştururken; NHS varlığında aktif hale gelen asitler, amidleri vermek üzere aminlerle reaksiyona girerler (Tomihata ve Ikada, 1997).



Şekil 8:

NHS'nin kimyasal yapısı (ThermoFisher Scientific, 2016)

EDC'nin verimliliği NHS varlığında artar. NHS, homo bifonksiyonel çapraz bağlayıcıdır. Bu çapraz bağlayıcı tersinmez N-açilüre bileşiklerinin oluşumunu engellemek için EDC ile beraber kullanılır. EDC ve NHS'nin birlikte kullanımı, hidrolize dayanıklı ve tekrar düzenlenemeyen ara ürün oluşumlarını sağlar. NHS de toksik özellik göstermez ve malzemeye biyouyumluluk, enzimatik bozunmaya karşı direnç gibi özellikler kazandırır. NHS, HA polimerinde bulunan glukuronik asit kısmının esterlerini aktif hale getirerek, çapraz bağlamayı gerçekleştirir (Svidronova, 2014) (Şekil 9).



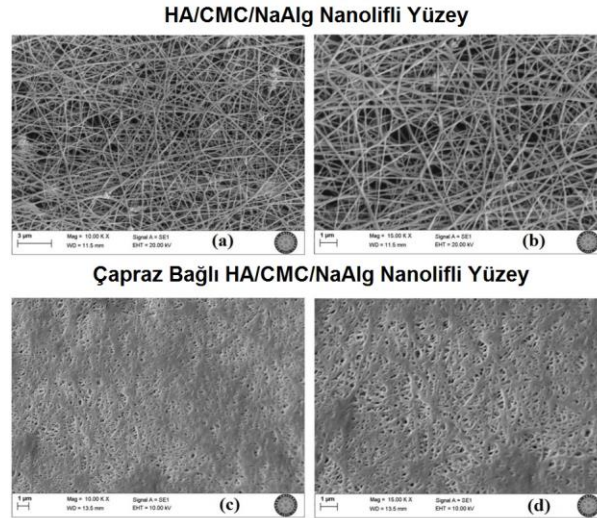
Şekil 9:

EDC/NHS'nin HA'yı çapraz bağlama reaksiyon mekanizması (Svidronova, 2014)

3.2. Karakterizasyon Sonuçları

3.2.1. SEM ve EDS Analiz Sonuçları

Nanolifli yüzeyin morfolojik yapısı üzerine çapraz bağlama işleminin etkisini gözlemlemek amacı ile nanolifli yüzeyin çapraz bağlama işlemi öncesinde ve sonrasında SEM fotoğrafları alınmış (Şekil 10), ortalama lif çapı (inceliği) ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 10:

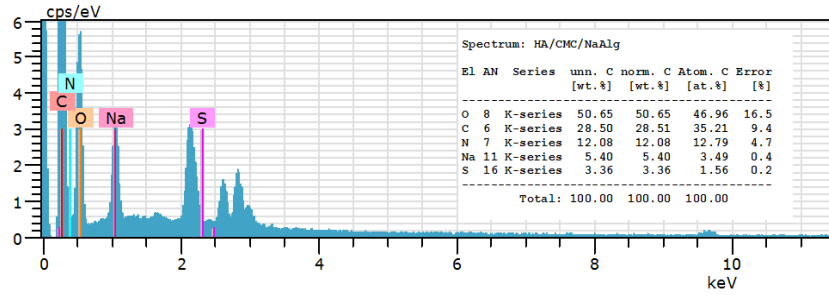
HA/CMC/NaAlg nanolifli yüzeyin SEM görüntüleri

- (a) çapraz bağlama öncesi (X 10.000), (b) çapraz bağlama öncesi (X 15.000),
(c) çapraz bağlama sonrası (X 10.000), (d) çapraz bağlama sonrası (X 15.000)

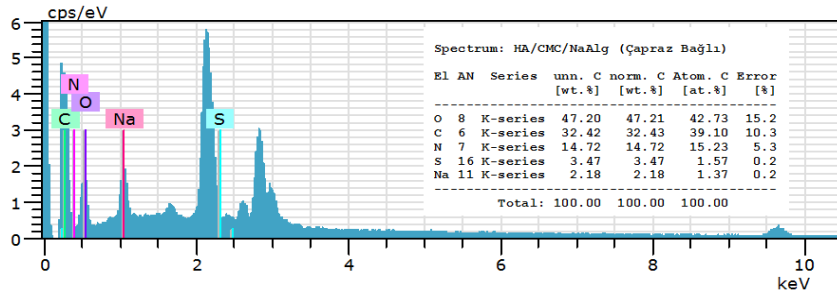
Çapraz bağlama öncesi çekilen SEM fotoğrafları incelendiğinde; üretilen yüzeyin boncuk hatası içermeyen, düzgün bir yapıya sahip olduğu ve üniform, sürekli nanoliflerden oluştuğu belirlenmiştir. Ancak, liflerin temas noktalarında yapışmalar olduğu görülmüştür. Yüzeyi oluşturan liflerin ortalama çap (incelik) değeri, 116 ± 33 nm olarak hesaplanmıştır. Çapraz bağlama işlemi sonrasında elde edilen SEM fotoğraflarında ise; nanolifli yüzeyin lifli yapısını kaybetmediği ancak, liflerin yassılaştığı ve temas noktalarındaki yapışmaların daha belirgin hale geldiği fark edilmiştir. Çapraz bağlama işleminde kullanılan EDC/NHS çapraz bağlayıcı ajan, nanolifli yüzeyi oluşturan polimer moleküllerindeki karboksil gruplarını aktive ederek, hidroksil

ve karboksil gruplarını birbirine bağlamaktadır (Tomihata ve Ikada, 1997). Çapraz bağlama esnasında oluşan yeni çapraz bağlar ise, lifli yapının sıkışmasına yol açmaktadır (Sinha ve diğ., 2013). Ayrıca; nanolifli yüzeylerde çözücünün hızla buharlaşması yassı lif bantlarının oluşmasına sebep olmaktadır. Lifler içerisine sıkışan bir miktar çözücü buharlaştığında lifler çökerek yassı bantlar haline dönüşür (Baji ve diğ., 2010) Böylece; çapraz bağlama sonrasındaki yassılaştırmanın, oluşan yeni çapraz bağların etkisiyle nanolifli yapının sıkışması ve bu esnada yapıda bulunan su moleküllerinin uzaklaşması nedeniyle oluşmuş olabileceği sonucuna varılmıştır. Yassılaştırmanın bir sonucu olarak; çapraz bağlama işlemi ile yüzeydeki liflerin ortalama çap (incelik) değeri, 164 ± 71 nm seviyesine çıkarak yaklaşık %43 oranında artış göstermiştir. Ayrıca; elde edilen yüzeyin çapraz bağlama öncesi ve sonrasında ölçülen kalınlık değerlerinin sırasıyla, 111 ± 34 ve 53 ± 10 μ olduğu ve çapraz bağlama işlemi ile yüzeyin yaklaşık %52 oranında incelendiği tespit edilmiştir. Bu durum; çapraz bağlama işlemi sonrasında, nanolifli yüzeydeki liflerin yassılaştırılmış olması ile ilişkilendirilmiştir.

Çapraz bağlama işleminin nanolifli yüzeydeki kimyasal etkilerini incelemek için EDS analizi yapılmıştır. Elde edilen elementel analiz sonuçları Şekil 11 ve 12'deki grafiklerde verilmektedir.



Şekil 11:
HA/CMC/NaAlg nanolifli yüzeyin EDS grafiği

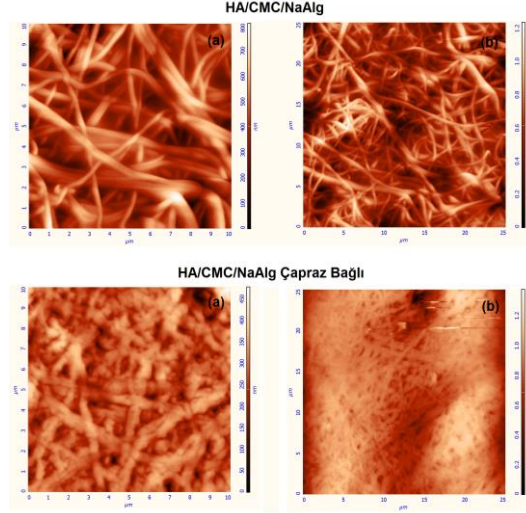


Şekil 12:
Çapraz bağlı HA/CMC/NaAlg nanolifli yüzeyin EDS grafiği

Yapılan EDS analizi sonuçları incelendiğinde; çapraz bağlama öncesi ve sonrasında dikkat çekici bir elementel değişim olmadığı görülmüştür. Çapraz bağlı olmayan yüzey ile çapraz bağlı yüzeydeki elementel analizin farklı olmaması; çapraz bağlayıcı ajanlar EDC ve NHS'nin, polimer yapıya bağlanmadan polimerlerin hidroksil ve karboksil grupları arasında ester bağı oluşturarak çapraz bağlama yaptığı şeklinde açıklanmıştır. EDS analizinde; nanolifli yüzeyin üretiminde kullanılan polimerleri oluşturan, karbon (C), oksijen (O), azot (N) ve sodyum (Na) gibi temel elementlerin dışında farklı olarak kükürt (S) elementi tespit edilmiştir. Bu durumun; liflerin temas noktalarındaki yapışma da dikkate alındığında, nanolifli yüzeyin üretiminde kullanılan DMSO çözücüsünün tam olarak buharlaşmamasından kaynaklanabileceği tahmin edilmiştir.

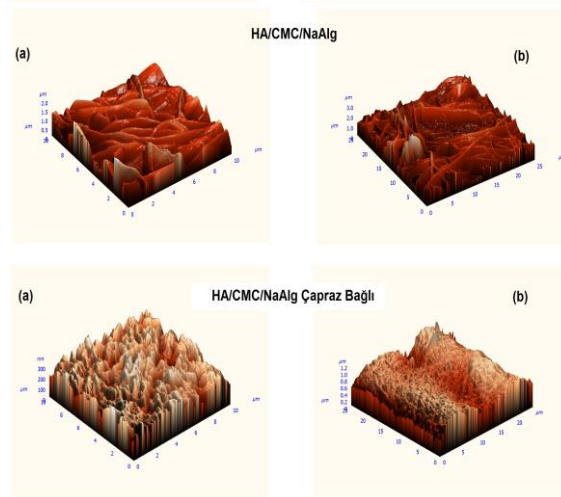
3.2.2. AFM Analiz Sonuçları

AFM analizi, malzemenin yüzey topografisini nanometre seviyesinde görüntüleyebilen ve moleküller arası kuvvetleri ölçebilen bir yöntemdir (Koral Koç ve Hockenberger, 2009). Nanolifli yüzeyin çapraz bağlama işlemi öncesinde ve sonrasında, AFM analizinde elde edilen iki ve üç boyutlu görüntüleri Şekil 13 ve 14’de verilmektedir.



Şekil 13:

HA/CMC/NaAlg nanolifli yüzeyin çapraz bağlama öncesi ve sonrası iki boyutlu AFM görüntüleri (a) $10\mu \times 10\mu^2$, (b) $25 \times 25\mu^2$



Şekil 14:

HA/CMC/NaAlg nanolifli yüzeyin çapraz bağlama öncesi ve sonrası üç boyutlu AFM görüntüleri (a) $10\mu \times 10\mu^2$, (b) $25 \times 25\mu^2$

AFM fotoğrafları incelendiğinde; çapraz bağlama işlemi ile nanolifli yapının bozulmadığı ancak, liflerin yassılaştığı ve kısmi çözünme etkisiyle temas noktalarındaki yapışmaların belirgin hale geldiği anlaşılmıştır. Çapraz bağlama işlemiyle yassılaşma nedeniyle gerçekleşen lif çapındaki artış, yüzeydeki gözenek boyutlarının azalmasına ve maksimum yükseklik değerlerinin düşmesine sebep olmuştur. Yassılaşma ve gözenek boyutlarının azalmasıyla beraber pürüzlülük değeri de azalmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. HA/CMC/NaAlg nanolifli yüzeyin çapraz bağlama öncesi ve sonrası AFM parametreleri

Parametre	HA/CMC/NaAlg		Çapraz bağlı HA/CMC/NaAlg	
	10 μ ×10 μ	25 μ ×25 μ	10 μ ×10 μ	25 μ ×25 μ
Yüzey pürüzlülüğü (nm)	194,63	312,80	39,32	124,62
Yüzey çarpıklığı (nm)	0,0609	0,2208	-0,8966	-0,5731
Yüzey basıklığı (nm)	0,5763	0,5444	1,1013	0,2862
Max. yükseklik (nm)	2076,64	3935,43	387,18	1374,96

AFM analizlerinde yüzey çarpıklığı değerinin 0'dan büyük olması; tepecikli düz bir yüzeyi ifade ederken, 0'dan küçük olması; gözenekli düz bir yüzeyi ifade etmektedir (Wysocka ve diğ., 2008). Çapraz bağlı yüzeylerde yüzey çarpıklığının 0'dan küçük olması, daha küçük ancak sayıca daha çok gözenekli bir yapıyı işaret etmektedir. Çapraz bağlı nanolifli yüzeyde gözenek boyutunun azaldığı ve gözenek hacminin arttığı BET analizi ile doğrulanmıştır (Tablo 2). BET analizi sonuçları incelendiğinde; çapraz bağlı yüzeyde yassılaşıma dolayısıyla pürüzlülüğün azalmasına paralel olarak yüzey alanının önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Çapraz bağlama sonrasında lif çaplarının artışına rağmen yüzey alanının artması, çapraz bağlama işlemi esnasında liflerin yassılaşmasına bağlanmıştır. Bunun sonucunda da, çapraz bağlı yüzeyde gözenek boyutu azalmıştır. Ayrıca, çapraz bağlama sonrasında gözenek boyutu küçülürken gözenek hacmi artmıştır. Yüzeylerin kalınlığı azalırken beklenmeyen şekilde ortaya çıkan gözenek hacmi artışı; çapraz bağlama esnasında, lif içinde sıkışan bir miktar çözücünün buharlaşması ile, liflerin kısmen çözünmesinden dolayı yeni gözeneklerin oluştuğu şeklinde yorumlanmıştır.

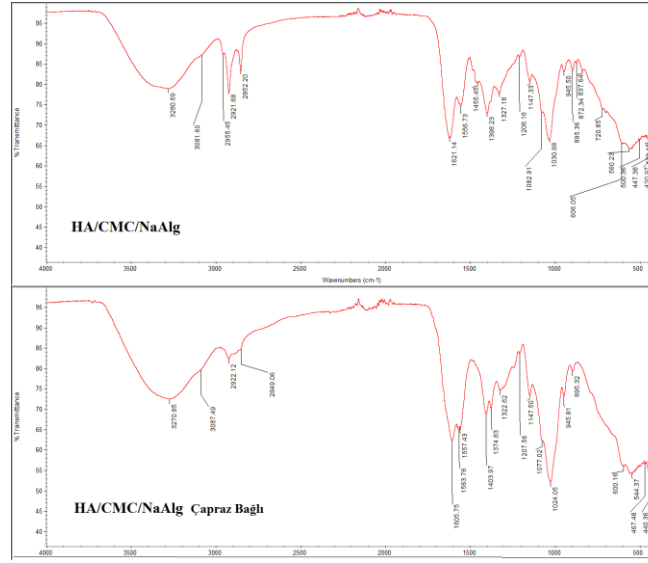
Tablo 2. HA/CMC/NaAlg nanolifli yüzeyin çapraz bağlama öncesi ve sonrası BET analizi sonuçları

Yüzey	Yüzey alanı (m ² /g)	Gözenek boyutu (nm)	Gözenek hacmi (cm ³ /g)
HA/CMC/NaAlg	0,90	16,99	0,0045
Çapraz bağlı HA/CMC/NaAlg	18,81	10,56	0,0596

Yüzey basıklığı değeri ise, yüzeyde yer alan zirve ve vadilerin dağılımına göre yükseklik dağılımını ve yüzey yapısını tanımlamaktadır. Yüzey basıklığı değeri 3 ise, yüzey normal yükseklik dağılımına sahipken; 3'ten küçük ise, tepecikler ve vadilerin arasında yumuşak geçişlerin olduğu daha geniş bir yükseklik dağılımından söz edilmektedir (Singh ve diğ., 2011). Buna göre, ham ve çapraz bağlı nanolifli yüzeyin geniş yükseklik dağılımına sahip olduğu anlaşılmıştır.

3.2.3. FTIR Analizi Sonuçları

Üretilen nanolifli yüzey, çapraz bağlama öncesi ve sonrasında FTIR analizi ile karakterize edilerek; çapraz bağlamanın etkinliği ve çapraz bağlayıcıların kimyasal yapıya etkisi incelenmiştir. Elde edilen FTIR spektrumları Şekil 15'de verilmektedir.



Şekil 15:

HA/CMC/NaAlg ve çapraz bağlı HA/CMC/NaAlg nanolifli yüzeyin FTIR spektrumları

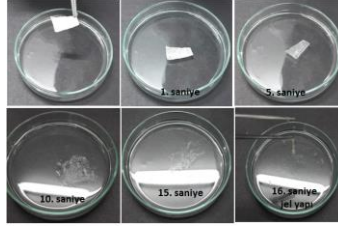
Literatürde (Kim ve diğ., 2008b; Ji ve diğ., 2006a; Tong ve diğ., 2008; Xiao ve diğ., 2002) yer alan bilgiler ışığında HA/CMC/NaAlg ve çapraz bağlı HA/CMC/NaAlg nanolifli yüzeylerin spektrumları incelendiğinde; HA'ya ait karboksil grubu (ham:1621,14 cm^{-1} , çapraz bağlı:1605,75 cm^{-1}), C-H gerilmesi (ham:2955,45 cm^{-1} , çapraz bağlı:2922,12 cm^{-1}), C-H eğilmesi (ham:1327,18 cm^{-1} , çapraz bağlı:1322,62 cm^{-1}), C-O-C grubu (ham:1147,33 cm^{-1} , çapraz bağlı:1147,50 cm^{-1}), N-H gerilmesi (ham:3280,69 cm^{-1} , çapraz bağlı:3270,85 cm^{-1}) ve C-O eğilmesi (ham:1030,68 cm^{-1} , çapraz bağlı:1024,05 cm^{-1}) pikleri görülmektedir. Her iki yüzeyde FTIR spektrumundaki 750-950 cm^{-1} arasındaki bantlar, NaAlg yapısındaki sırasıyla guluronik asit ve mannuronik asit varlığını göstermektedir. HA/CMC/NaAlg'nin FTIR spektrumundaki 2800 ile 3500 cm^{-1} deki pikler ise, CMC polimerinin hidroksil grubundan kaynaklanmaktadır ve çapraz bağlama sonrasında bu piklerin şiddeti azalmıştır.

Sonuç olarak, üretilen nanolifli yüzeyin çapraz bağlama öncesi ve sonrası FTIR grafiklerinde; çapraz bağlı yüzeyde ester bağlarının varlığını gösteren piklerin bulunması ve ham yüzeydeki hidroksil gruplarının yer aldığı piklerin çapraz bağlama sonrası şiddetinin azalması, çapraz bağlamanın kimyasal olarak başarılı bir şekilde yapıldığını ortaya koymuştur.

3.2.4. Suya Dayanım Test Sonuçları

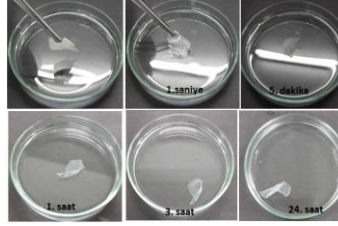
Nanolifli yüzeye uygulanan çapraz bağlama ve kurutma işlemlerinden sonra; kullanılan çapraz bağlayıcı ajanın etkinliğini tespit etmek için, yüzeyler oda sıcaklığında saf su içerisine daldırılmıştır. Çapraz bağlama yapılmamış numune için suya atıldığı andan çözünmenin tamamlandığı ana kadar geçen süre belirlenmiştir. Çapraz bağlama işleminden geçen nanolifli yüzey ise, 24 saat saf su içerisinde bekletilmiştir.

Çapraz bağlama yapılmamış yüzeyin, suya atıldığı ilk saniyelerden itibaren hızla dağılarak jelleşme sürecine girdiği görülmüştür. Suya atıldığı anı takip eden 15. saniyede yüzey, tamamen jel haline gelmiştir (Şekil 16). Çapraz bağlı yüzeyin ise; suda çözünmediği ve boyutsal stabilitesini koruduğu gözlemlenmiştir (Şekil 17). Böylece, uygulanan çapraz bağlama işleminin başarılı olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 16:

Çapraz bağlama öncesinde HA/CMC/NaAlg nanolifli yüzeyin suya dayanım testi



Şekil 17:

Çapraz bağlama sonrasında HA/CMC/NaAlg nanolifli yüzeyin suya dayanım testi

4. SONUÇ

Bu çalışmada; biyomedikal uygulamalar için polisakkarit esaslı polimerlerden elektro çekim yöntemi ile nanolifli yüzey üretimi amaçlanmıştır. %12 HA, %2 CMC ve %2 NaAlg polimer çözeltilerinin hacimce 3/1/1 oranında karışımından düzgün, boncuksuz ve oldukça ince lif çaplarına sahip nanolifli yüzey üretimi gerçekleştirilmiştir.

Üretilen nanolifli yüzeyin suya dayanımı, hedeflenen biyomedikal uygulamalar için yeterli olmadığından; çapraz bağlama işleminin uygulanması gerekmiştir. Bu amaçla; üretilen nanolifli yüzeyin morfolojik özelliklerine zarar vermeyen ve toksik etkileri olmayan 80 mM/100 mM EDC/NHS ajanı kullanılarak, yüzey üzerinde çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yüzeyin morfolojik özelliklerinin tayini için elde edilen SEM görüntülerinde; çapraz bağlama işleminin üretilen yüzeyin lifli yapısını bozmadığı ancak, liflerin yassılaştığı ve temas noktalarında yapışmaların olduğu görülmüştür. Liflerin yassılaşması nedeniyle; çapraz bağlı yüzeylerde ortalama lif çapı yaklaşık %43 oranında artarken, yüzey kalınlığı yaklaşık %52 oranında azalmıştır.

AFM ve BET analizi sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; çapraz bağlanmış nanolifli yüzeyde; yüzey pürüzlülüğü ve max. yükseklik değerlerinin azaldığı, buna paralel olarak yüzey alanı ve gözenek hacminin arttığı, gözenek boyutlarının ise küçüldüğü tespit edilmiştir.

EDS ile yapılan elementel analiz sonuçlarına göre; nanolifli yüzeyin üretiminde kullanılan polimerleri oluşturan C, O, N ve Na gibi temel elementlerin dışında farklı olarak S elementi tespit edilmiştir. Bu durum; HA polimeri için çözücü olarak kullanılan DMSO'nun, üretim esnasında tamamen buharlaşmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Nanolifli yüzeye ait FTIR grafiklerinde; çapraz bağlı yüzeyde ester bağlarının varlığını gösteren piklerin bulunması ve ham yüzeydeki hidroksil gruplara ait piklerin çapraz bağlama sonrası şiddetinin azalması, kullanılan çapraz bağlama ajanının polimerdeki hidroksil grupları arasında ester bağı oluşturduğuna dair literatür bilgisi ışığında, çapraz bağlama işleminin başarılı bir şekilde yapıldığını ortaya koymuştur.

Suya dayanım testinde; çapraz bağlı olmayan yüzey ilk saniyelerde jelleşerek dağılmaya başlarken, çapraz bağlı yüzeyin suda çözünmediği ve 24 saat boyunca boyutsal stabilitesini koruduğu gözlemlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar; çapraz bağlanmış HA/CMC/NaAlg nanolifli yüzeyin biyomedikal alanda kullanımı için, performansının değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiş sonraki çalışmalara bir temel oluşturmuştur.

5. TEŞEKKÜR

Bu çalışma; TÜBİTAK tarafından desteklenen 214M415 no'lu “Biyobozunur Polimerlerden Elektro Çekim Yöntemiyle Üretilmiş Nanolifli Yüzeylerin Abdominal Dokuda Adezyon Bariyeri Olarak Kullanım Performansının *in Vitro* ve *in Vivo* Çalışmalarla Değerlendirilmesi” adlı proje kapsamında hazırlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Amiralıyan, N., Nouri, M. ve Kish, M. H. (2009) Effects of some electrospinning parameters on morphology of natural silk-based nanofibers, *Journal of Applied Polymer Science*, 113(1), 226-234. doi:10.1002/app.29808
2. Aytar, P., Buruk, Y. ve Çabuk, A. (2013) Streptococcus equi ile hyaluronik asit üretiminde optimum koşulların plackett-burman yöntemi ile belirlenmesi, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 11(1), 28-35.
3. Baji, A., Mai, Y. W., Wong, S. C., Abtahi, M. ve Chen, P. (2010) Electrospinning of polymer nanofibers: effects on oriented morphology, structures and tensile properties, *Composites Science and Technology*, 70, 703-718. doi: 10.1016/j.compscitech.2010.01.010
4. Bhattarai, N., Li, Z., Edmondson, D. ve Zhang, M. (2006) Alginate based nanofibrous scaffolds: structural, mechanical, and biological properties. *Advanced Materials*, 18(11), 1463-1467. doi: 10.1002/adma.200502537
5. Collins, M. N. ve Birkinshaw, C. (2007) Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications, *Journal of Applied Polymer Science*, 104(5), 3183-3191. doi: 10.1002/app.25993
6. Collins, M. N. ve Birkinshaw, C. (2013) Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering-a review, *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1262-1279. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.10.028
7. Coşkun, G., Karaca, E., Özyurtlu, M., Özbek, S., Yermezler, A. ve Çavuşoğlu, İ. (2014) Histological evaluation of wound healing performance of electrospun poly(vinyl alcohol)/sodium alginate as wound dressing in vivo, *Bio-medical Materials and Engineering*, 24(2), 1527-1536. doi: 10.3233/BME-130956
8. Coşkun Üstündağ, G. (2009). Elektrospinning yöntemi ile biyomedikal kullanıma yönelik nanolif yüzey üretimi ve uygulaması, *Yüksek Lisans Tezi*, U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
9. Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J., Harris, D. E. A. ve Tan, N. B. (2001) The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer*, 42(1), 261-272. doi: 10.1016/S0032-3861(00)00250-0
10. Dıraçoğlu, D. (2007) Osteoartritte intraartiküler hyalüronik asit tedavisi-eğitim, *Türkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 53, 154-159.
11. Fang, D., Liu, Y., Jiang, S., Nie, J. ve Ma, G. (2011) Effect of intermolecular interaction on electrospinning of sodium alginate, *Carbohydrate Polymers*, 85(1), 276-279. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.01.054

12. Frenot, A., Henriksson, M. W. ve Walkenström, P. (2007) Electrospinning of cellulose based nanofibers, *Journal of Applied Polymer Science*, 103(3), 1473-1482. doi: 10.1002/app.24912
13. G-Biosciences, (2016). Protein Cross-Linkers. Erişim adresi: <http://www.gbiosciences.com/Protein-Research/Cross-Linking-Modification/Protein-Cross-Linkers> (Erişim tarihi: 19.07.2016).
14. Jeong, S. I., Krebs, M. D., Bonino, C. A., Khan, S. A. ve Alsberg, E. (2010a) Electrospun alginate nanofibers with controlled cell adhesion for tissue engineering, *Macromolecular Bioscience*, 10(8), 934-943. doi: 10.1002/mabi.201000046
15. Jeong, S. I., Krebs, M. D., Bonino, C. A., Samorezov, J. E., Khan, S. A. ve Alsberg, E. (2010b) Electrospun chitosan-alginate nanofibers with in situ polyelectrolyte complexation for use as tissue engineering scaffolds, *Tissue Engineering Part A*, 17(1-2), 59-70. doi: 10.1089/ten.tea.2010.0086
16. Ji, Y., Ghosh, K., Li, B., Sokolov, J. C., Clark, R. A. ve Rafailovich, M. H. (2006a) Dual-syringe reactive electrospinning of cross-linked hyaluronic acid hydrogel nanofibers for tissue engineering applications, *Macromolecular Bioscience*, 6(10), 811-817. doi: 10.1002/mabi.200600132
17. Ji, Y., Ghosh, K., Shu, X. Z., Li, B., Sokolov, J. C., Prestwich, G. D. ve Rafailovich, M. H. (2006b) Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds, *Biomaterials*, 27(20), 3782-3792. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.037
18. Kırıcı, H. (2001) Selüloz türevleri ve kullanım yerleri, *Fen ve Mühendislik Dergisi*, 4(2), 119-130.
19. Kim, T. G., Chung, H. J. ve Park, T. G. (2008a) Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles, *Acta Biomaterialia*, 4(6), 1611-1619. doi: 10.1016/j.actbio.2008.06.008
20. Kim, J. K., Srinivasan, P., Kim, J. H., Choi, J. I., Park, H. J., Byun, M. W., Lee, J. W. (2008b) Structural and antioxidant properties of gamma irradiated hyaluronic acid, *Food Chemistry*, 109(4), 763-770. doi:10.1016/j.foodchem.2008.01.038
21. Koral Koç, S. ve Hockenberger, A. (2009) Bazı tekstil liflerinin yüzeylerinin atomik kuvvet mikroskobu ile nano boyutta incelenmesi, *Tekstil ve Mühendis Dergisi*, 15(69-70), 1-6.
22. Kriegel, C., Arrechi, A., Kit, K., McClements, D.J. ve Weiss, J. (2008) Fabrication, functionalization, and application of electrospun biopolymer nanofibers, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(8), 775-797. doi: 10.1080/10408390802241325
23. Kumar, A. (2010) *Nanofibers*, Intech, Croatia.
24. Li, J., He, A., Zheng, J. ve Han, C. C. (2006) Gelatin and gelatin-hyaluronic acid nanofibrous membranes produced by electrospinning of their aqueous solutions, *Biomacromolecules*, 7(7), 2243-2247. doi: 10.1021/bm0603342
25. Liu, Y., Ma, G., Fang, D., Xu, J., Zhang, H. ve Nie, J. (2011) Effects of solution properties and electric field on the electrospinning of hyaluronic acid, *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 1011-1015. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.08.061
26. Lu, J. W., Zhu, Y. L., Guo, Z. X., Hu, P. ve Yu, J. (2006) Electrospinning of sodium alginate with poly(ethylene oxide), *Polymer*, 47(23), 8026-8031. doi: 10.1016/j.polymer.2006.09.027

27. Lu, P. L., Lai, J. Y., Ma, D. H. K., Hsiue, G. H. (2008) Carbodiimide cross-linked hyaluronic acid hydrogels as cell sheet delivery vehicles: characterization and interaction with corneal endothelial cells, *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*, 19(1), 1-18. doi: 10.1163/156856208783227695
28. Ma, G., Fang, D., Liu, Y., Zhu, X. ve Nie, J. (2012) Electrospun sodium alginate/poly(ethylene oxide) core-shell nanofibers scaffolds potential for tissue engineering applications, *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 737-743. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.08.055
29. Price, R. D., Berry, M. G. ve Navsaria, H. A. (2007) Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 60(10), 1110-1119. doi: 10.1016/j.bjps.2007.03.005
30. Qin, Y. (2008) Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management, *Polymer International*, 57(2), 171-180. doi: 10.1002/pi.2296
31. Qiu, X. ve Hu, S. (2013) Smart materials based on cellulose: a review of the preparations, properties and applications, *Materials*, 6(3), 738-781. doi: 10.3390/ma6030738
32. Qiu, L., Shao, Z. Q., Liu, M. L. ve Liu, Y. H. (2014a) Electrospinning carboxymethyl cellulose lithium (CMC-Li) nano composite material for high-rate lithium-ion battery, *Advanced Materials Research*, 924, 69-72. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.924.69
33. Qiu, L., Shao, Z., Liu, M., Wang, J., Li, P. ve Zhao, M. (2014b) Synthesis and electrospinning carboxymethyl cellulose lithium (CMC-Li) modified 9, 10-anthraquinone (AQ) high-rate lithium-ion battery, *Carbohydrate Polymers*, 102, 986-992. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.09.105
34. Qiu, L., Shao, Z., Wang, D., Wang, F., Wang, W. ve Wang, J. (2014c) Carboxymethyl cellulose lithium (CMC-Li) as a novel binder and its electrochemical performance in lithium-ion batteries, *Cellulose*, 21(4), 2789-2796. doi: 10.1007/s10570-014-0274-7
35. Qiu, L., Shao, Z., Xiang, P., Wang, D., Zhou, Z., Wang, F. ve Wang, J. (2014d) Study on novel functional materials carboxymethyl cellulose lithium (CMC-Li) improve high-performance lithium-ion battery, *Carbohydrate Polymers*, 110, 121-127. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.03.052
36. Qiu, L., Shao, Z., Yang, M., Wang, W., Wang, F., Wan, J. ve Duan, H. (2014e) Study on effects of carboxymethyl cellulose lithium (CMC-Li) synthesis and electrospinning on high-rate lithium ion batteries, *Cellulose*, 21(1), 615-626. doi: 10.1007/s10570-013-0108-z
37. Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W. E., Lim, T. C. ve Ma, Z. (2005) *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*, World Scientific Publishing Co., Singapore.
38. Safi, S., Morshed, M., Hosseini Ravandi, S. A. ve Ghiaci, M. (2007) Study of electrospinning of sodium alginate, blended solutions of sodium alginate/poly(vinyl alcohol) and sodium alginate/poly(ethylene oxide), *Journal of Applied Polymer Science*, 104(5), 3245-3255. doi: 10.1002/app.25696
39. Shalumon, K. T., Anulekha, K. H., Nair, S. V., Nair, S. V., Chennazhi, K. P. ve Jayakumar, R. (2011) Sodium alginate/poly(vinyl alcohol)/nano ZNO composite nanofibers for antibacterial wound dressings, *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(3), 247-254. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.04.005
40. Shelke, N. B., James, R., Laurencin, C. T. ve Kumbar, S. G. (2014) Polysaccharide biomaterials for drug delivery and regenerative engineering, *Polymers for Advanced Technologies*, 25(5), 448-460. doi: 10.1002/pat.3266

41. Sigma-Aldrich, (2016). Carboxymethylcellulose sodium salt. Erişim adresi: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c5678> (Erişim tarihi: 27.01.2016).
42. Singh, A. V., Vyas, V., Patil, R., Sharma, V., Scopelliti, P. E., Bongiorno, G. ve Milani, P. (2011) Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation, *PLoS One*, 6(9), e25029. doi: 10.1371/journal.pone.0025029
43. Sinha, M. K., Das, B. R., Srivastava, A. ve Saxena, A. K. (2013) Needleless electrospinning and coating of poly vinyl alcohol with cross-linking agent via in-situ technique, *International Journal of Textile and Fashion Technology*, 3(5), 29-38.
44. Steele, J. A. M., Halle, J. P., Poncelet, D. ve Neufeld, R. J. (2014) Therapeutic cell encapsulation techniques and applications in diabetes, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 67-68, 74-83. doi: 10.1016/j.addr.2013.09.015
45. Stijnman, A. C., Bodnar, I. ve Tromp, R. H. (2011) Electrospinning of food-grade polysaccharides, *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1393-1398. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.01.005
46. Svidronova, B. (2014). Crosslinking of polysaccharide microfibers, *MSc Thesis*, Brno University of Technology, Brno.
47. Şafak, Ş. (2016). Biyobozunur polimerlerden elektro çekim yöntemiyle üretilen nanolifli yüzeylerin cerrahi adezyon bariyeri olarak kullanımlarının araştırılması, *Doktora Tezi*, U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
48. Tarun, K. ve Gobi, N. (2012) Calcium alginate/PVA blended nano fibre matrix for wound dressing, *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 37, 127-132.
49. ThermoFisher Scientific, (2016). NHS (N-hydroxysuccinimide). Erişim adresi: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/24500> (Erişim tarihi: 12.04.2016).
50. Tomihata, K. ve Ikada, Y. (1997) Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide, *Journal of Biomedical Materials Research*, 37(2), 243-251. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199711)37:23.0.CO;2-F
51. Tong, Q., Xiao, Q., Lim, L. T. (2008) Preparation and properties of pullulan–alginate–carboxymethylcellulose blend films, *Food Research International*, 41(10), 1007-1014. doi: 10.1016/j.foodres.2008.08.005
52. Uppal, R., Ramaswamy, G. N., Arnold, C., Goodband, R. ve Wang, Y. (2011) Hyaluronic acid nanofiber wound dressing-production, characterization, and in vivo behavior, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 97(1), 20-29. doi: 10.1002/jbm.b.31776
53. Wysocka, K., Ulatowska-Jarza, A., Bauer, J., Holowacz, I., Savu, B., Stanciu, G. ve Podbielska, H. (2008) AFM examination of sol-gel matrices doped with photosensitizers, *Optica Applicata*, 38(1), 127-136.
54. Xiao, C., Weng, L., Zhang, L. (2002) Improvement of physical properties of crosslinked alginate and carboxymethyl konjac glucomannan blend films, *Journal of Applied Polymer Science*, 84(13), 2554-2560. doi: 10.1002/app.10582
55. Xie, L., Shao, Z. Q. ve Lu, S. Y. (2012) Preparation of AlNPs/CMCN composite nanofibers by electrospinning, *Applied Mechanics and Materials*, 130-134, 1266-1269. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMM.130-134.1266

56. Xu, S., Li, J., He, A., Liu, W., Jiang, X., Zheng, J., Han, C. C., Hsiao, B. S., Chu, B. ve Fang, D. (2009) Chemical crosslinking and biophysical properties of electrospun hyaluronic acid based ultra-thin fibrous membranes, *Polymer*, 50(15), 3762-3769. doi: 10.1016/j.polymer.2009.06.009
57. Yang, D., Li, Y. ve Nie, J. (2007) Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs, *Carbohydrate Polymers*, 69(3), 538-543. doi: 10.1016/j.carbpol.2007.01.008
58. Yao, C., Li, X. ve Song, T. (2007) Fabrication of zein/hyaluronic acid fibrous membranes by electrospinning, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18(6), 731-742. doi: 10.1163/156856207781034070
59. Zhang, X., Reagan, R. M. ve Kaplan, D. L. (2009) Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(12), 988-1006. doi: 10.1016/j.addr.2009.07.005
60. Zhang, X. X., Sun, J., Wang, J. J. ve Dai, L. X. (2013) Preparation and characterization of pH-responsive poly(vinyl-alcohol)/sodium carboxymethyl cellulose nanofibers, *Advanced Materials Research*, 796, 132-135. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.796.132