

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Seza Özge GÖNEN¹, Bade ERTÜRK, Ece TÜCCAR, Melek EROL TAYGUN², Sadriye KÜÇÜKBAYRAK

ELEKTROSPİNNİNG PARAMETRELERİNİN JELATİN/BİYOAKTİF CAM NANOLİF YAPISI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZ

Bu çalışmada, malzeme ve proses değişkenlerinin jelatin/biyoyaktif cam (Gt/BG) nanokompozit liflerinin çapı üzerindeki etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla; farklı oranlarda biyoyaktif cam tozu içeren jelatin çözeltilerine elektrospinning işlemi uygulanarak nanokompozit malzemeler üretilmiştir. Biyoyaktif cam içeriğinin, uç ile toplayıcı arasındaki açıklığın ve çözelti akış hızının ortalama lif çapı üzerindeki etkileri yanıt yüzey yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Sonuç olarak; üç değişkenli ve üç seviyeli Box–Behnken tasarım yöntemi kullanılarak ikinci dereceden bir model oluşturulmuş ve geliştirilen bu model aracılığı ile değişkenlerin etkinlikleri değerlendirilerek, hedeflenen lif çapının sağlanması için gerekli proses koşullarının tahmin edilebileceği basit ve etkin bir yöntem geliştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Elektrospinning, Jelatin, Biyoyaktif cam, Lif çapı, Yanıt yüzey yöntemi

EFFECTS OF ELECTROSPINNING PARAMETERS ON GELATIN/BIOACTIVE GLASS NANOFIBER DIAMETER

ABSTRACT

In the present study, an electrospinning procedure was carried out in order to develop a simple and effective tool for fabricating gelatin/bioactive glass (Gt/BG) nanofibers with a controllable and predictable fiber diameter. For this purpose, a quadratic model was obtained within the context of response surface methodology based on a three-level, three-variable Box–Behnken design technique to describe the relationship between the fiber diameter and the electrospinning parameters, namely BG content, tip-to-collector distance, and flow rate. Meanwhile, the quality of fit of the model was evaluated by the coefficients of determination (R-square) and the analysis of variances. Moreover, the adequacy of the model was examined by conducting additional experiments that were not employed in the model generation.

Keywords: Electrospinning, Gelatin, Bioactive glass, Fiber diameter, Response surface methodology

1. GİRİŞ

Kemik; mekanik destek sağlayan, mineral deposu olarak davranan, hareketi sağlayan kas kasılmalarını destekleyen, yük taşıyan ve iç organları koruyan oldukça karmaşık bir doku olup, zarar gördüğünde belirli bir ölçüye kadar kendini yara izi olmaksızın yenileyebilmektedir (Jose et al. 2009). Ancak, hasarın oldukça ciddi olduğu durumlarda, kemiğin onarılması ve yenilenmesi için otojenik ve allojenik kaynakların kullanılmasına bir alternatif oluşturan kemik doku mühendisliği yaklaşımına ihtiyaç duyulmaktadır (Gao et al. 2013). Bu yaklaşım; hücre dışı matrisi taklit eden, üzerinde hücrelerin tutunduğu ve çoğaldığı geçici bir destek görevi gören yapı iskelelerinin kullanımına dayanmaktadır (Allo et al. 2010).

Yapı iskelesi hazırlanması için en önemli hususlar; üretim teknolojisi ve malzeme seçimi olup bugüne kadar, sinterlenmiş mikroküreler, çözücü döküm, parçacık yıkama ekstraksiyonu, ısının uyardığı faz ayrılması, öztoplanma ve 3D baskı gibi geniş bir yelpazedeki üretim teknikleri araştırılmıştır (Andric et al. 2011; Chang et al. 2013; Jaiswal et al. 2013). Bu teknikler arasında, elektrospinning yöntemi, her biri çapı birkaç mikron ile birkaç nanometre arasında liflerden oluşan bir yapı iskelesi oluşturmak için basit ve etkili bir araç olup temel olarak hücre dışı matrisine yapısal benzerliği, geniş bir malzeme yelpazesi ile çalışılabilirliği, cihazın kurulmasının basit ve ucuz olması gibi özellikleri nedeniyle son zamanlarda kemik doku mühendisliği uygulamalarında ilgi görmektedir (Andric et al. 2011; Frohbergh et al. 2012; Ren et al. 2010; Shao et al. 2011; Yang et al. 2008).

Hücre dışı matrisin lifli yapısını taklit etmek amacıyla en uygun malzeme seçilirken, malzemenin özelliklerinin yapı iskelesinin özelliklerini belirleyeceği de dikkate alınmalıdır (Paşçu et al. 2013). Şimdiye kadar, sentetik veya doğal olanlar dahil olmak üzere birçok polimerden elektrospinning yöntemi kullanılarak ayarlanabilir mekanik özelliğe, esnekliğe ve şekle sahip nanolifli yapılar üretilmiştir (Brun et al. 2011; Chen and Chang 2011; Rim et al. 2012). Ancak, ideal bir yapı iskelesi için gerekli tüm özelliklerin tek bir malzeme ile sağlanması mümkün değildir.

Kemiğin hücre dışı matrisi, organik ve inorganik maddelerden oluşan bir nanokompozit olduğundan; polimerlerin ve biyoaktif seramiklerin birlikte kullanılması ile daha iyi mekanik özelliğe, hidrofiliğe, osteoiletkenliğe, osteoendüktiviteye ve hücrel afiniteye sahip yapı iskelelerinin üretilmesi beklenmektedir (Kharaziha et al. 2013). Bununla birlikte; tek bir malzeme içerisinde her iki bileşen de içerildiğinden, organik kısmın esnekliğine ve iyi şekillendirilme yeteneğine; inorganik kısmın ise, ısıl kararlılığına, yüksek mukavemetine ve kimyasal direncine sahip olunacaktır (Toskas et al. 2013). Bu amaçla kullanılan yaklaşımlar; polimerik nanoliflerin yüzeyinde inorganik malzemelerinin biriktirilmesi yoluyla tekdüze kaplamalar oluşturulması ve inorganik maddelerin polimerik nanolifler içerisine kapsüllenmesidir (Xie et al. 2013). In vitro ve in vivo çalışmalar, organik/inorganik kompozit yapı iskelelerinin, osteoblastların ve mezenkimal kök hücrelerinin tutunmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklediğini ve kemik iyileşmesini kolaylaştırdığını göstermiştir (Chen and Chang 2011).

Kemiğin organik matrisinin çoğu (>90%), kemiğe esnekliğini ve sertliğini veren tip I kolajen liflerinden oluşurken; inorganik fazı ise, kemiğe tokluk ve dayanıklılık veren hidratlanmış kalsiyum fosfattan (hidroksiapatit) oluşur (Andric et al. 2011; Asran et al. 2010). Bu nedenle; bu çalışmada, jelatin ve biyoaktif cam içeren nanokompozit yapı iskelelerinin hazırlanması hedeflenmiştir. Jelatin, kolajenin kontrollü hidrolizinden elde edilen doğal bir biyopolimer olup, biyolojik kökeni, biyobozunurluğu, biyoyumluluğu, mükemmel hücrel benzerliği ve nispeten düşük maliyetle ticari kullanılabilirliği gibi birçok avantajı nedeniyle biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Chong et al. 2007; Heydarkhan-Hagvall et al. 2008). Biyoaktif camlar ise, 1960'ların sonlarında Larry Hench tarafından keşfedilmiş amorf silika temelli malzemeler olup, yumuşak ve sert dokulara bağlanabilmesine olanak sağlayan yüksek biyoaktivitesi nedeniyle şimdiye kadar pek çok farklı biçim ve şekilde çalışılmıştır (Nadeem et al. 2013).

Üretilen lif çapı; proses değişkenleri (uygulanan gerilim, polimer çözeltisinin akış hızı, iğne ucu ve toplayıcı arasındaki açıklık, iğnenin çapı, kolektör tipi), çözelti değişkenleri (polimerin molekül ağırlığı, polimer çözeltisinin derişimi, çözücü tipi) ve çevre koşulları (sıcaklık ve bağıl nem) gibi faktörlerden

farklı ölçülerde etkilenmektedir. Elde edilen malzemenin mekanik, elektrik, optik, vb. gibi özellikleri, ortalama lif çapına bağlı olarak değişiklik gösterdiğinden, bu faktörlerin ortalama lif çapı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle; bu çalışmada, kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılma potansiyeline sahip nanokompozit yapıda bir malzemenin elektrospinning yöntemi kullanılarak hedeflenen lif çapına sahip olarak üretilmesini sağlayacak ampirik bir model oluşturulması için iki farklı proses değişkeni (uç ile toplayıcı arasındaki açıklık ve çözelti akış hızı) ile bir çözelti değişkeninin (biyoaktif cam içeriği) ortalama lif çapı üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

İstatistiksel bir deney tasarım yönteminin (yanıt yüzey yöntemi gibi) kullanılması; sayısal modellerin oluşturulmasına, değişkenlerin etkilerinin değerlendirilmesine ve değişkenlerin en uygun kombinasyonlarının belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Ray et al. 2011). Yanıt yüzey yöntemi; istatistiksel yöntemlerden yararlanarak, bağımsız değişkenler ile yanıt değişkenleri arasındaki ilişkiyi belirleyen ve deneysel veriyi ampirik bir modele dönüştüren grafiksel bir yöntemdir (Padmanabhan et al. 2011). Üç ya da daha fazla faktöre sahip ikinci dereceden yanıt yüzey modeli için Box–Benkhen tasarım yöntemi, merkezi kompozit tasarım yöntemine kıyasla daha üstündür (Ray et al. 2011). Bu nedenle; bu çalışmada, biyoaktif cam içeriğinin, uç ile toplayıcı arasındaki açıklığın ve çözelti akış hızının ortalama lif çapı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla Box–Benkhen tasarım yönteminin kullanılması yoluyla ikinci dereceden bir model oluşturulması hedeflenmiştir.

2. MATERYAL – YÖNTEM

Biyoaktif Cam Tozlarının Hazırlanması

Bileşimi ağırlıkça; %45 SiO₂, %24.5 Na₂O, %6 P₂O₅, %0.5 CuO ve %24 CaO olan biyoaktif cam (BG) klasik ergitme yöntemi ile üretilmiştir. Bu amaçla; ilk olarak, silikon dioksit (SiO₂, Sigma–Aldrich), di-sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄, Merck), kalsiyum karbonat (CaCO₃, Merck), sodyum karbonat (Na₂CO₃, Merck) ve bakır(II) nitrat trihidrat (Cu(NO₃)₂.3H₂O, Sigma–Aldrich) uygun miktarlarda tartılarak bir karışım hazırlanmıştır. Elde edilen karışım platin bir pota içerisine konulmuş ve 1450°C’de 2 saat süresince ergitilmiştir. Ardından, eriyik saf su içerisine dökülerek granül halindeki cam parçacıkları elde edilmiştir. Elde edilen cam parçacıkları, agat havanda öğütüldükten sonra homojenliğin artırılması amacıyla tekrar 1450°C’de 2 saat süresince ergitilmiş ve eriyik ürün ikinci kez saf su içerisine dökülmüştür. Üretilen ikinci döküm ürünleri 45 µm’lik elekten geçecek şekilde agat havanda öğütülmüştür.

Nanokompozit Liflerin Hazırlanması

Jelatin (Gt, A tipi, domuz derisinden elde edilmiş, Sigma–Aldrich) asetik asit/su hacimsel oranı 3/2 olan bir çözücü içerisinde derişimi %20 (ağ./hacim) olacak şekilde çözülmüştür. Elde edilen çözeltiye cam içeriği ağırlıkça %5, %6 ve %7 olacak şekilde BG tozları ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 2 saat karıştırılarak Gt/BG çözeltileri elde edilmiştir. Hazırlanan Gt/BG çözeltilerine 19–21 kV’luk bir gerilim altında elektrospinning işlemi uygulanarak nanokompozit liflerin üretimi sağlanmıştır.

Lif Çaplarının Hesaplanması

Üretilen Gt/BG nanokompozit liflerinin morfolojik özelliklerinin ve lif çaplarının belirlenebilmesi amacıyla SEM cihazı (Jeol JSM-5410) kullanılmıştır. SEM ölçümleri öncesinde, nanokompozit liflerden kesilen numuneler iletken bir yüzey elde edilmesi amacıyla 2 dakika süresince platin ile kaplanmıştır. Her bir numuneye ilişkin SEM görüntülerinden rastgele seçilen 50 farklı life ait çap değerleri Image J yazılımı (Ulusal Sağlık Enstitüleri, ABD) kullanılarak tespit edilmiş ve ortalama lif çapı değerleri standart sapma değerleri ile birlikte istatistiksel olarak hesaplanmıştır.

Deneysel Tasarım ve İstatistiksel Analizi

Ortalama lif çapı ile elektrospinning parametreleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla, bir yanıt yüzey yöntemi olan üç değişkenli ve üç seviyeli Box–Behnken tasarımı kullanılmıştır. Değişkenler ve seviyeleri, ön denemeler (sonuçlara burada yer verilmemiştir) ışığında Çizelge 1’de özetlendiği gibi belirlenmiştir.

Çizelge 1. Değişkenler ve seviyeleri.

Değişken	Sembol	Değişken seviyesi		
		-1	0	1
Biyoaktif cam içeriği (% ağı.)	X ₁	5	6	7
Çözelti akış hızı (ml/saat)	X ₂	1	2	3
Uç ile toplayıcı arasındaki açıklık (cm)	X ₃	7	8.5	10

Bütün deneyler; dış faktörlere bağlı olarak gözlemlenebilecek etkileri en aza indirmek için rastgele bir sıra ile gerçekleştirilmiştir. Tüm istatistiksel hesaplamalar için MINITAB istatistiksel yazılımı (16. Sürüm, Minitab Inc, State College, PA) kullanılmıştır.

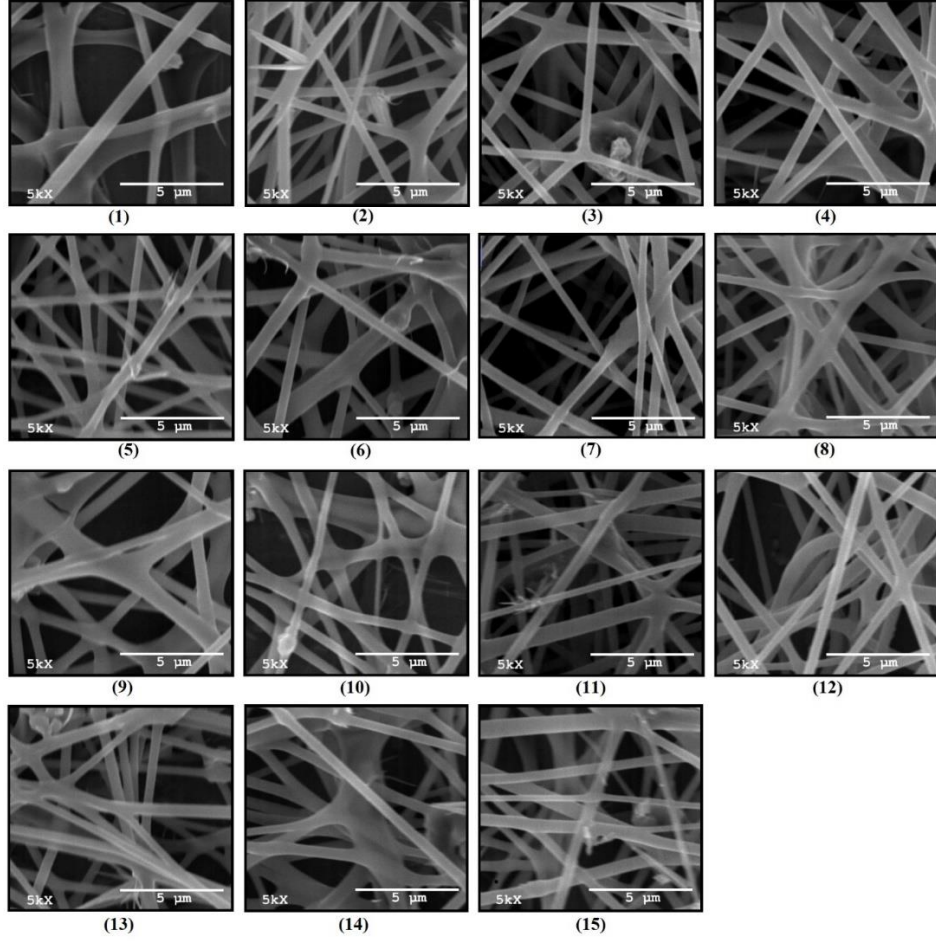
Ortalama lif çapı ile elektrospinning parametreleri arasındaki ilişki, (1) no’lu eşitlikte gösterilen üç değişkenli ikinci dereceden bir polinom olarak kabul edilmiştir.

$$y = C_0 + \sum_{i=1}^3 C_i X_i + \sum_{i=1}^3 C_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 C_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Burada; “y”, tahmin edilen cevap değeri (ortalama lif çapı); “X_i”, i’inci bağımsız faktör; “C₀”, “C_i”, “C_{ii}”, ve “C_{ij}” ise, regresyon katsayılarıdır. “C₀”, sabit terimi; “C_i”, lineer etki terimini; “C_{ii}”, karesel etki terimini; “C_{ij}” ise etkileşim etkisi terimini göstermektedir. Modelin uyum kalitesi, belirleme katsayısı (R²) ve varyans analizi (ANOVA) aracılığı ile değerlendirilmiş; önemsiz olduğu tespit edilen terimler elenerek model yeniden belirlenmiştir. Ayrıca, yanıt yüzey modelinin geçerliliği ve doğruluğu, gerçekleştirilen ek deneyler aracılığı ile incelenmiştir.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

İstatistik teorisine göre; üç değişkenli Box-Behnken tasarımı 15 deneyden oluşmakta olup, her bir tasarım noktasına ilişkin SEM görüntüleri Şekil 1’de verilmiştir. SEM görüntülerinden hesaplanan ortalama lif çapı sonuçları ise, Çizelge 2’de özetlenmiştir. Buna göre; elektrospinning koşullarına bağlı olarak ortalama lif çapının 465 ile 658 nm arasında değiştiği görülmektedir.



Şekil 1. Her bir tasarım noktasına ilişkin SEM görüntüleri.

Çizelge 2. Deneysel tasarım matrisi ve deney sonuçları.

Tasarım noktası	X ₁	X ₂	X ₃	Ortalama lif çapı (nm)	
				Deneysel	Tahmin edilen
1	5	1	8.5	658 ± 191	641
2	7	1	8.5	508 ± 96	539
3	5	3	8.5	491 ± 81	470
4	7	3	8.5	625 ± 168	652
5	5	2	7.0	465 ± 69	482
6	7	2	7.0	616 ± 157	585
7	5	2	10.0	489 ± 110	534
8	7	2	10.0	516 ± 103	512
9	6	1	7.0	610 ± 128	617
10	6	3	7.0	534 ± 114	545
11	6	1	10.0	585 ± 144	564
12	6	3	10.0	594 ± 111	577
13	6	2	8.5	523 ± 84	528
14	6	2	8.5	527 ± 87	528
15	6	2	8.5	561 ± 134	528

Deneysel tasarım matrisindeki deneysel veriler kullanılarak oluşturulan ikinci dereceden yanıt yüzey modelinin sonuçları Çizelge 3'te özetlenmiştir. Çizelge incelendiğinde, belirleme katsayısının (R^2), yaklaşık %85 olduğu görülmektedir. Bu durum; elde edilen model ile ortalama lif çapına ait değişkenliğin %85'ini açıklamanın mümkün olduğunu göstermektedir. Ancak, modele ilişkin p değeri 0.112 olup bu değer, 0.05'in üzerindedir. Buradan; elde edilen modelin %95 güven seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmadığı anlaşılmaktadır.

%95 güven seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir model elde edilmesi için, ortalama lif çapı üzerinde önemli bir etkisi bulunmadığı belirlenen bazı terimler ($p > 0.05$), modelden çıkarılmıştır. Oluşturulan yeni modelin sonuçları Çizelge 4'te verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, yeni belirleme katsayısının (R^2), yaklaşık %84 olduğu görülmektedir. Bu durum; elde edilen model ile ortalama lif çapına ait değişkenliğin %84'ini açıklamanın mümkün olduğunu göstermektedir. Ayrıca, yeni modele ilişkin p değeri 0.024 olup bu değer, 0.05'in altında olduğundan; yeni modelin %95 güven seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu anlaşılmaktadır. Bunun yanısıra; tekrar deneylerden kaynaklanan saf hata ile model hatalarından kaynaklanan artık hatayı karşılaştıran uyum eksikliğine ait p değeri 0.257 olup bu değer, 0.05'ten fazla olması uyum eksikliğinin önemsiz olduğunu göstermektedir (Roso et al. 2011).

Çizelge 3. Yanıt yüzey modelinin sonuçlarının özeti.

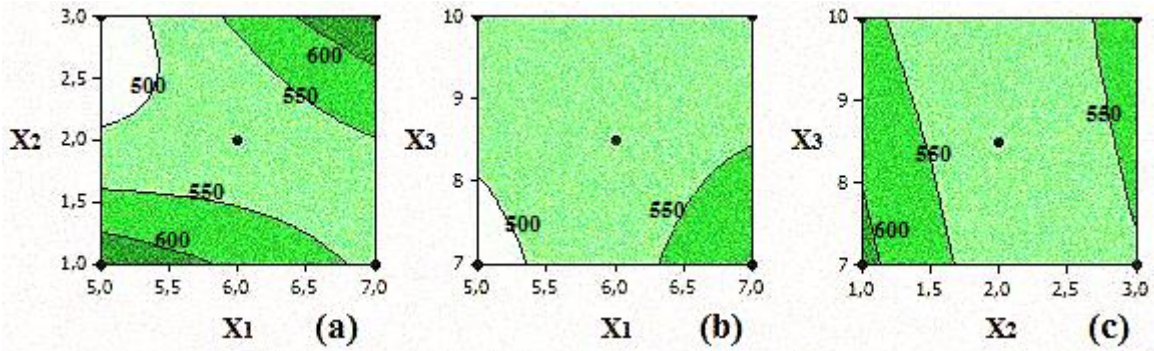
Terim	Katsayı		P değeri	Uyum özeti	
	Kodlu	Kodsuz			
Sabit terim	537.000	150.333	0.000	R^2	%85
X_1	20.250	208.417	0.190	Model	
X_2	-14.625	-746.542	0.324		
X_3	-5.125	112.083	0.717	P değeri	0.112
X_1^2	-12.875	-12.875	0.542	F değeri	3.11
X_2^2	46.375	46.375	0.065	Uyum eksikliği	
X_3^2	-2.625	-1.167	0.899		
$X_1.X_2$	71.000	71.000	0.013		
$X_1.X_3$	-31.000	-20.667	0.162	F değeri	4.80
$X_2.X_3$	21.250	14.167	0.312		

Çizelge 4. Yeni modelin sonuçlarının özeti.

Terim	Katsayı		P değeri	Uyum özeti	
	Kodlu	Kodsuz			
Sabit terim	528.143	693.6960	0.000	R^2	%84
X_1	20.250	53.9167	0.129	Model	
X_2	-14.625	-750.9700	0.255		
X_3	-5.125	92.2500	0.677	P değeri	0.024
X_2^2	47.482	47.4821	0.028	F değeri	5.07
$X_1.X_2$	71.000	71.000	0.004	Uyum eksikliği	
$X_1.X_3$	-31.000	-20.6667	0.105		
$X_2.X_3$	21.250	14.1667	0.243		
				F değeri	3.17

Yanıt yüzey grafiği; yanıt ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi gösteren üç boyutlu teorik bir çizim olup bu grafiğin iki boyutlu görünümüne eş yükselti eğrileri denir (Sarlak et al. 2012). Eş yükselti eğrileri, bağımsız değişkenler düzleminde sabit yanıt çizgilerinin çizildiği bir grafik olup model hakkında yararlı bilgiler verir. Elde edilen modele ilişkin eş yükselti eğrileri Şekil 1’de görülmekte olup her bir şekil, üçüncü parametrenin orta seviyesi için diğer iki parametre arasındaki ilişkiyi görselleştirmektedir.

Şekil 2 incelendiğinde; düşük biyoaktif cam içeriğinde, çözeltinin akış hızının azaltılması ya da açıklığın artırılması yoluyla ortalama lif çapının arttığı; buna karşın, yüksek biyoaktif cam içeriğinde, tam tersi bir eğilimin meydana geldiği gözlenmiştir. Öte yandan, orta biyoaktif cam içeriğinde ise, çözeltinin akış hızının artmasının belirli bir eşik değerine kadar ortalama lif çapını azalttığı; bu değer üzerine çıkıldığında ise, ortalama lif çapının çözelti akış hızındaki artışla birlikte arttığı belirlenmiştir. Buna ek olarak, orta biyoaktif cam içeriğinde açıklıkta meydana gelen değişimlerin ortalama lif çapını pek fazla etkilemediği de gözlenmiştir.



Şekil 2. Modele ilişkin eş yükselti eğrileri.

Benzer şekilde, düşük bir akış hızı seçildiğinde, çözeltinin biyoaktif cam içeriğinin ya da açıklığın artırılması, ortalama lif çapını azaltırken; yüksek bir akış hızında çalışıldığında, ortalama lif çapında tam ters bir eğilim gözlenmiştir. Öte yandan, orta bir akış hızı uygulandığında, biyoaktif cam içeriğindeki ya da açıklıktaki değişimler, ortalama lif çapı üzerinde önemli bir etki oluşturmamıştır.

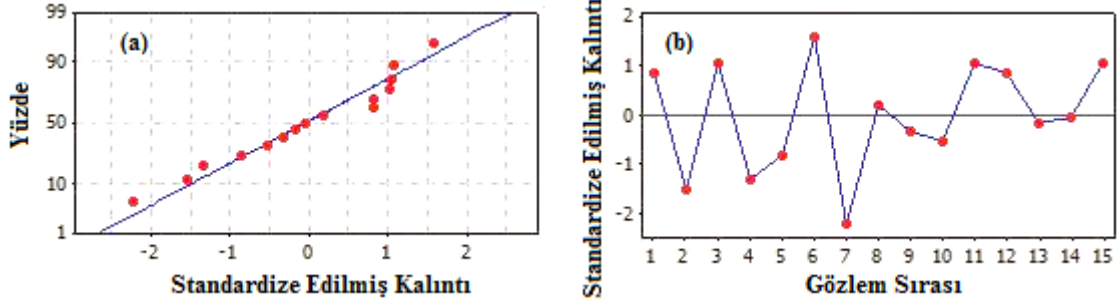
Ayrıca, düşük bir açıklık değeri seçildiğinde, çözeltinin biyoaktif cam içeriğinin artırılması ortalama lif çapını artırırken; yüksek bir açıklık değeri ile çalışıldığında, biyoaktif cam içeriğindeki değişim, ortalama lif çapı üzerinde önemli bir etki oluşturmamıştır. Buna karşın, herhangi bir açıklık değeri kullanılırken çözelti akış hızının artırılması, ortalama lif çapını belirli bir kritik değere kadar önce azaltmış; ardından ise, artırmıştır.

Doustgani et al. (2012) açıklık arttıkça ortalama lif çapının arttığını belirlemiştir. Bu durum, açıklık arttıkça elektriksel alan kuvvetinin azalması ile açıklanmıştır. Elektriksel alanın kuvvetinde meydana gelen azalmanın jetin daha az gerilmesine yol açtığı ve bu nedenle, daha kalın çaplı liflerin oluştuğu bildirilmiştir. Buna karşın, Ray et al. (2011) açıklık arttıkça ortalama lif çapının azaldığını tespit etmiştir. Bu durum, açıklık artışına bağlı olarak yüklü jetin daha uzun sürede toplayıcıya ulaşmasına ve bu sayede, daha uzun ve daha küçük çaplı liflerin oluşmasına bağlanmıştır. Ray et al. (2011), ayrıca, düşük açıklık ve yüksek elektrostatik gradyen değerleri için, akış hızı değişimi etkisinin çok açık olmadığını; ancak, yüksek açıklık ve düşük akış hızı değerlerinde daha küçük çaplı liflerin üretildiğini bildirmiştir. Benzer şekilde, Aliabadi et al. (2014) da, düşük açıklık ve yüksek akış hızı değerlerinde çalışmanın ortalama lif çapını artırdığını ortaya koymuştur. Ayrıca, açıklığı artırmanın ortalama lif çapını önce düşürdüğü ve ardından, yükselttiği de gözlenmiştir (Aliabadi et al. 2014).

Oluşturulan modelin geçerliliğinin onaylanması amacıyla, normal dağılım grafiği (Şekil 3a) ve kalıntı grafiği (Şekil 3b) kullanılmıştır. Normal dağılım grafiği incelendiğinde, tüm noktaların çizgiye

yakın olarak konumlandığı görülmektedir. Bu da, hataların normal dağılım gösterdiğini kanıtlamaktadır. Buna ek olarak, model aracılığıyla tahmin edilen değerler ile deneysel çıktılar arasındaki fark olarak

tanımlanan kalıntıların gözlem sırasına karşılık grafiğe geçirilmesi yoluyla oluşturulan kalıntı grafiği incelendiğinde; kalıntıların belirli bir desen izlemediği ve oluşumlarının rastgele meydana geldiği gözlenmiştir. Bu sonuca göre; verilerin bağımsızlığı doğrulanmıştır.



Şekil 3. Normal dağılım grafiği (a) ve kalıntı grafiği (b).

Son olarak modelin doğruluğunun onaylanması amacıyla, modelin oluşturulması sırasında kullanılmayan ek deneyler gerçekleştirilmiş ve deney sonucu elde edilen sonuçlar ile model kullanılarak tahmin edilen sonuçlar kıyaslanmıştır. Yapılan ek deneyler ve sonuçları Çizelge 5'te verilmiş olup tahmin edilen değerler ile deneysel değerlerin örtüştüğü görülmektedir.

Çizelge 5. Doğrulama deneylerinin sonuçları.

Doğrulama noktası	X ₁	X ₂	X ₃	Ortalama lif çapı (nm)	
				Deneysel	Tahmin edilen
1	7	1	10	526 ± 127	482
2	7	3	10	514 ± 109	637
3	5	1	7	599 ± 146	636
4	5	3	7	527 ± 182	423

4. SONUÇ

Bu çalışmada, kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere hedeflenen lif çapına sahip jelatin/biyoaktif cam (Gt/BG) nanokompozit liflerin üretilmesi için gerekli proses koşullarının tahmin edilebileceği basit ve etkin bir yöntem geliştirilmiştir. Bu amaçla; üç değişkenli ve üç seviyeli Box–Benkhen tasarım yöntemine dayalı yanıt yüzey yöntemi kullanılarak ikinci dereceden bir model oluşturulmuş ve geliştirilen bu model aracılığı ile lif çapı ile elektrospinning değişkenleri arasındaki nicel ilişki tanımlanmıştır. Modelin uyum kalitesi; belirleme katsayısı ve varyans analizi aracılığı ile değerlendirilerek %95 güven seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir model elde edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, modelin geçerliliği normal dağılım ve kalıntı grafikleri yardımıyla onaylanırken; doğruluğu da, gerçekleştirilen ek deneyler aracılığı ile kanıtlanmıştır.

KAYNAKLAR

Aliabadi, M. Irani, M., Ismaeili, J. and Najafzadeh, S. (2014). Design and Evaluation of Chitosan/Hydroxyapatite Composite Nanofiber Membrane for the Removal of Heavy Metal Ions from Aqueous Solution. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 45(2), 518–526.

- Allo, B.A., Rizkalla, A.S. and Mequanint, K. (2010). Synthesis and Electrospinning of ϵ -Polycaprolactone-Bioactive Glass Hybrid Biomaterials Via a Sol-Gel Process. *Langmuir* 26(23), 18340–18348.
- Andric, T., Sampson, A.C. and Freeman, J.W. (2011). Fabrication and Characterization of Electrospun Osteon Mimicking Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering C* 31(1), 2–8.
- Asran, A.S., Henning, S. and Michler, G.H. (2010). Polyvinyl Alcohol–Collagen–Hydroxyapatite Biocomposite Nanofibrous Scaffold: Mimicking the Key Features of Natural Bone at the Nanoscale Level. *Polymer* 51(4), 868–876.
- Brun, P., Ghezzi, F., Roso, M., Danesin, R., Palù, G., Bagno, A., Modesti, M., Castagliuolo, I. and Dettin, M. (2011). Electrospun Scaffolds of Self-Assembling Peptides with Poly(ethylene oxide) for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomaterialia* 7(6), 2526–2532.
- Chang, W., Mu, X., Zhu, X., Ma, G., Li, C., Xu, F. and Nie, J. (2013). Biomimetic Composite Scaffolds Based Mineralization of Hydroxyapatite on Electrospun Calcium-Containing Poly(vinyl alcohol) Nanofibers. *Materials Science and Engineering C* 33(7), 4369–4376.
- Chen, J.P. and Chang, Y.S. (2011). Preparation and Characterization of Composite Nanofibers of Polycaprolactone and Nanohydroxyapatite for Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 86(1), 169–175.
- Chong, E.J., Phan, T.T., Lim, I.J., Zhang, Y.Z., Bay, B.H., Ramakrishna, S. and Lim, C.T. (2007). Evaluation of Electrospun PCL/Gelatin Nanofibrous Scaffold for Wound Healing and Layered Dermal Reconstitution. *Acta Biomaterialia* 3(3), 321–330.
- Doustgani, A., Vasheghani-Farahani, E., Soleimani, M. and Hashemi-Najafabadi, S. (2012). Optimizing the Mechanical Properties of Electrospun Polycaprolactone and Nanohydroxyapatite Composite Nanofibers. *Composites Part B: Engineering* 43(4), 1830–1836.
- Frohbergh, M.E., Katsman, A., Botta, G.P., Lazarovici, P., Schauer, C.L., Wegst, U.G.K. and Lelkes, P.I. (2012). Electrospun Hydroxyapatite-Containing Chitosan Nanofibers Crosslinked with Genipin for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* 33(36), 9167–9178.
- Gao, C., Gao, Q., Li, Y., Rahaman, M.N., Teramoto, A., Abe, K. (2013). In Vitro Evaluation of Electrospun Gelatin-Bioactive Glass Hybrid Scaffolds for Bone Regeneration. *Journal of Applied Polymer Science* 127(4), 2588–2599.
- Heydarkhan-Hagvall, S., Schenke-Layland, K., Dhanasopon, A.P., Rofail, F., Smith, H., Wu, B.M., Shemin, R., Beygui, R.E. and MacLellan, W.R. (2008). Three-Dimensional Electrospun ECM-Based Hybrid Scaffolds for Cardiovascular Tissue Engineering. *Biomaterials* 29(19), 2907–2914.
- Jaiswal, A.K., Chhabra, H., Kadam, S.S., Londhe, K., Soni, V.P. and Bellare, J.R. (2013). Hardystonite Improves Biocompatibility and Strength of Electrospun Polycaprolactone Nanofibers Over Hydroxyapatite: A Comparative Study. *Materials Science and Engineering C* 33(5), 2926–2936.
- Jose, M.V., Thomas, V., Johnson, K.T., Dean, D.R. and Nyairo, E. (2009). Aligned PLGA/HA Nanofibrous Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomaterialia* 5(1), 305–315.

- Kharaziha, M., Fathi, M.H. and Edris, H. (2013). Effects of Surface Modification on the Mechanical and Structural Properties of Nanofibrous Poly(ϵ -caprolactone)/Forsterite Scaffold for Tissue Engineering Applications. *Materials Science and Engineering C* 33(8), 4512–4519.
- Nadeem, D., Mostafa Kiamehr, M., Yang, X. and Su, B. (2013). Fabrication and in Vitro Evaluation of a Sponge-Like Bioactive-Glass/Gelatin Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering C* 33(5), 2669–2678.
- Padmanabhan, T., Kamaraj, V., Magwood Jr., L. and Starly, B. (2011). Experimental Investigation on the Operating Variables of a Near-Field Electrospinning Process Via Response Surface Methodology. *Journal of Manufacturing Processes* 13(2), 104–112.
- Paşcu, E.I., Stokes, J. and McGuinness, G.B. (2013). Electrospun Composites of PHBV, Silk Fibroin and Nano-Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering C* 33(8), 4905–4916.
- Ray, S. and Lalman, J.A. (2011). Using the Box–Benkhen Design (BBD) to Minimize the Diameter of Electrospun Titanium Dioxide Nanofibers. *Chemical Engineering Journal* 169(1–3), 116–125.
- Ren, L., Wang, J., Yang, F.Y., Wang, L., Wang, D., Wang, T.X. and Tian, M.M. (2010). Fabrication of Gelatin–Siloxane Fibrous Mats Via Sol–gel and Electrospinning Procedure and its Application for Bone Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering C* 30(3), 437–444.
- Rim, N.G., Kim, S.J., Shin, Y.M., Jun, I., Lim, D.W., Park, J.H. and Shin, H. (2012). Mussel-Inspired Surface Modification of poly(L-lactide) Electrospun Fibers for Modulation of Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 91, 189–197.
- Roso, M., Lorenzetti, A., Besco, S., Monti, M., Berti, G. and Modesti, M. (2011). Application of Empirical Modelling in Multi-Layers Membrane Manufacturing. *Computers & Chemical Engineering* 35(11), 2248–2256.
- Sarlak, N., Nejad, M.A.F., Shakhesi, S. and Shabani, K. (2012). Effects of Electrospinning Parameters on Titanium Dioxide Nanofibers Diameter and Morphology: An Investigation by Box–Wilson Central Composite Design (CCD). *Chemical Engineering Journal* 210, 410–416.
- Shao, S., Zhou, S., Li, L., Li, J., Luo, C., Wang, J., Li, X. and Weng, J. (2011). Osteoblast Function on Electrically Conductive Electrospun PLA/MWCNTs Nanofibers. *Biomaterials* 32(11), 2821–2833.
- Toskas, G., Cherif, C., Hund, R.D., Laourine, E., Mahltig, B., Fahmi, A., Heinemann, C. and Hanked, T. (2013). Chitosan (PEO)/Silica Hybrid Nanofibers as a Potential Biomaterial for Bone Regeneration. *Carbohydrate Polymers* 94(2), 713–722.
- Xie, J., Zhong, S., Ma, B., Shuler, F.D. and Lim, C.T. (2013). Controlled Biomineralization of Electrospun poly(ϵ -caprolactone) Fibers to Enhance Their Mechanical Properties. *Acta Biomaterialia* 9(3), 5698–5707.
- Yang, F., Wolke, J.G.C. and Jansen, J.A. (2008). Biomimetic Calcium Phosphate Coating on Electrospun poly(ϵ -caprolactone) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Chemical Engineering Journal* 137 (1), 154–161.