

Deri Doku Mühendisliği: İki Katmanlı Nanoaltın Yüklü Deri Yedeklerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu

Proje No: 111M810

Doç. Dr. Dilek Keskin

Dr. Nusret Taheri

NİSAN 2013

ANKARA

Önsöz

Bu projede, yanık ve kronik ülserlere bağlı gelişen deri yaralanmalarının tedavisinde kullanılmak üzere derin yapısına benzer, biyoyumlu, iyileşme sürecini hızlandırıcı özellikte ve antibakteriyel olan, altın nanoparçacıkları yüklü dermal ve epidermal iki katmandan oluşan deri eşlenikleri geliştirilmiştir. Dermal katman liyofilize kollajen köpük veya elektro-eğrilmiş kollajen nanofiberli matriks olarak, epidermal katman ise serisin/kollajen film olarak tasarlanmıştır. Bu biyomazlemelerin deri doku mühendisliğine uygunluğu laboratuvar testleri yapılarak karşılaştırılmıştır. Bu iki katmanlı yapılara benzer deri eşlenikleri ticari yara bakım ürünleri pazarında veya literatürdeki çalışmalarda yoktur. Ayrıca, altın nanoparçacıkların deri doku mühendisliğinde kullanılmak üzere üretilen köpüklere ve nanofibröz matrikslere eklenmesi yeni bir yaklaşımdır. Kollajen gibi biyolojik polimerlerden elektroegirme ile nanofiberli yapılar oluşturulmasında altın nanoparçacıklarının etkisini araştıran çalışmalar çok kısıtlıdır. Bu nedenlerle, proje literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır. Bundan sonraki süreçte, in vivo hayvan deneyleri ve önklirik çalışmaları yapıldıktan sonra bu biyomalzemelerin uzun vadede piyasadaki benzer ürünlere rakip alternatif birer ürün olabilme potansiyeli yüksektir.

İki katmanlı deri eşleniklerinin epidermal ve dermal katmanları olan film ve köpükler ODTÜ Mühendislik Bilimleri Biyomalzeme ve Biyomekanik laboratuvarlarında hazırlanmıştır, diğerk dermal katman olan elektroegrilmiş nanofiberli matriksler ise ODTÜ MODSİMMER Koza Araştırma laboratuvarında kurulmuş olan elektro-egirme cihazı ile üretilmiştir. Üretilen bütün biyomalzemelerin laboratuvar karakterizasyonları, in vitro hücre kültür deneyleri, biyoyumluluk ve biyoetkinliklerinin incelenmesi temelde ODTÜ Mühendislik Bilimleri Bölümü Laboratuvarları'nda ve kısmen ODTÜ Merkez Laboratuvar'ı ve ODTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü'nde hizmet alımı karşılığında yapılmıştır. Üretilen nanoaltın parçacıklarının antibakteriyellik özelliğini araştırmak için yapılan antimiyogram testleri, ODTÜ Mediko Mikrobiyoloji ve Biyokimya Laboratuvarları'nda yapılmıştır. Projenin tamamı TUBİTAK-TBAG tarafından desteklenmiştir.

İçindekiler

Özet	13
Abstract	15
Giriş.....	17
Genel Bilgiler	18
Projede Hedeflenen Amaçlar	23
Gereç ve Yöntem	24
Aşama 1: İki Katmanlı Doku İskelelerinin (BLCS) Üretilmesi ve Optimizasyonu	24
1.1. Serisin/Kollajen Filmlerin Hazırlanması	24
1.2. Köpük Hazırlanması	24
1.3. İki Katmanlı İskele (BLCS) Hazırlanması	24
1.4. Nanofiberli Matriks Hazırlanması	24
1.4. Deri İskelelerinin Çapraz Bağlanması (BLCS-X)	26
1.5. Altın Nanoparçacıklarının Sentezi ve Karakterizasyonu.....	27
1.5.1. Altın Nanoparçacıklarının Sentezi.....	27
1.5.2. Altın Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu.....	28
1.5.3. Altın Nanoparçacıklarının İskelelere Yüklenmesi.....	28
1.6. İskelelerin In vitro Karakterizasyonu.....	29
1.6.1. Hidrolitik Bozunum Testleri	29
1.6.2. Su Tutma Deneyleleri.....	29
1.6.3. Enzimatik Bozunum Testleri	29
1.6.4. Biyomekanik Testler.....	30
1.6.5. Gözeneklilik ve Gözenek Boyutunun Belirlenmesi	30
1.7. Altın Nanoparçacıkların In Vitro Biyouyumluluk Deneyleleri	30

1.7.1. Hücre Kültürü Deneyleri	30
1.7.2. Altın Nanoparçacık Süspansiyonlarının Sitotoksite Testleri (MTT Analizi)	31
Aşama 2: İki Katmanlı Doku İskelelerinin (BECM) Üretilmesi ve Optimizasyonu	32
2.1. Serisin/Kollajen Filmlerin Hazırlanması	32
2.2. Nanofiberli Matriks Hazırlanması	32
2.3. İki Katmanlı İskele (BECM) Hazırlanması.....	33
2.4. Deri iskelelerinin Çapraz Bağlanması (BECM-X).....	33
2.5 Altın Nanoparçacıklarının Sentezi ve Karakterizasyonu	35
2.5.1. Altın Nanoparçacıklarının Sentezi.....	35
2.5.2. Altın Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu.....	36
2.5.3. Altın Nanoparçacıklarının İskelelere Yüklenmesi.....	36
2.6. İskelelerin In vitro Karakterizasyonu.....	36
2.6.1. Hidrolitik Bozunum Testleri	36
2.6.2. Su Tutma Deneyleri.....	37
2.6.3. Enzimatik Bozunum Testleri	37
2.6.4. Biyomekanik Testler.....	37
2.6.5. Gözeneklilik ve Gözenek Boyutunun Belirlenmesi	38
2.7. Nanoaltın In Vitro Biyoyumluluk Deneyleri	38
2.7.1. Hücre Kültürü Deneyleri	38
2.7.2. Altın Nanoparçacık Süspansiyonlarının Sitotoksite Testleri (MTT Analizi)	38
2.7.3. Altın Nanoparçacık ile Yüklü İskelelerin Sitotoksite Testleri (MTT Analizi).....	39
2.8. Nanoaltın Antibakteriyellik Testleri	39
2.8. Deri İskelelerine Hücre Ekimi Çalışmaları (Ko-Kültür).....	40
Bulgular ve Tartışma.....	41

Aşama 1. İki Katmanlı Doku İskelelerinin (BLCS) Üretilmesi ve Optimizasyonu ile İlgili Bulgular.....	41
1.1. Köpük ile İki Katmanlı İskele Hazırlanması.....	41
1.2. Nanofiberli Matriks Hazırlanması	42
1.3. Altın Nanoparçacıklarının Sentezi ve Karakterizasyonu ile İlgili Bulgular	46
1.4. Altın Nanoparçacıklarının İskelelere Yüklenmesi.....	48
1.5. İskelelerin In vitro Karakterizasyonu ile İlgili Bulgular	50
1.5.1. Hidrolitik Bozunum Testleri	50
1.5.2. Su Tutma Deneyleri.....	52
1.5.3. Su Buharı Geçirgenliği Hızı	53
1.5.4. Enzimatik Bozunum Testleri	54
1.5.5. Biyomekanik Testler.....	55
1.5.6. Gözeneklilik Ölçüm Sonuçları.....	57
1.6. Nanoaltın In vitro Biyouyumluluk Testleri ile İlgili Bulgular.....	58
1.6.1. Altın Nanoparçacıklarının Keratinositler Üstündeki Sitotoksik Etkisi	58
1.6.2. Altın Nanoparçacıklarının 3T3 Fibroblastlar Üstündeki Sitotoksik Etkisi	60
Aşama 2. İki Katmanlı Doku İskelelerinin Üretilmesi (BECM) ve Optimizasyonu ile İlgili Bulgular.....	63
2.1. Nanofiberli Matriks Hazırlanması	63
2.2. Deri iskelelerinin Çapraz Bağlanması (BECM-X).....	71
2.3. Altın Nanoparçacıklarının Sentezi ve Karakterizasyonu ile İlgili Bulgular	73
2.3.1. Altın Nanoparçacıklarının İskelelere Yüklenmesi.....	76
2.4. İskelelerin In Vitro Karakterizasyonu ile İlgili Bulgular.....	77
2.4.1. Enzimatik Bozunum Testleri	79
2.4.2. Su Tutma Deneyleri.....	81
2.4.3. Su Buharı Geçirgenliği Hızı Deneyleri.....	81

2.4.4. Biyomekanik Testler.....	81
2.4.5. Gözeneklilik Ölçüm Sonuçları.....	82
2.5. Nanoaltın In Vitro Biyouyumluluk Testleri ile İlgili Bulgular	83
2.5.1. Altın Nanoparçacıklarının Keratinositler Üstündeki Sitotoksik Etkisi	83
2.5.2. Altın Nanoparçacıklarının 3T3 Fibroblastlar Üstündeki Sitotoksik Etkisi	85
2.5.3. Altın Nanoparçacık ile Yüklü İskelelerin Sitotoksik Testleri (MTT Analizi).....	87
2.6. Altın Nanoparçacık Antibakteriyellik Testleri.....	88
2.7. Deri İskelelerine Hücre Ekimi Çalışmaları (Ko-Kültür).....	89
Sonuç ve Öneriler	91
Kaynaklar	93

Tablo Listesi

Tablo 1. Elektro-eğirme optimizasyonu için hazırlanan gruplar	26
Tablo 2. Elektroēğirme optimizasyonu için hazırlanan tuz veya altın içeren gruplar	34
Tablo 3. Altın nanoparçacık konsantrasyonunun elektroēğirmeye etkisini deēerlendirmek için hazırlanan gruplar.....	35
Tablo 4. Oluşturulan gruplarla elde edilen nanofiberlerin özellikleri.....	45
Tablo 5. Oluşturulan gruplarla elde edilen nanofiberlerin özellikleri.....	63
Tablo 6. Çözeltilere altın nanoparçacıkları eklenmesiyle elde edilen nanofiberlerin özellikleri	65
Tablo 7. İskelelerin in vitro karakterizasyon testleri sonuçları.....	82

Şekil Listesi

Şekil 1. İki katmanlı deri eşleniği (BLCS) fotoğrafı	24
Şekil 2. Modsimmer Koza Araştırma laboratuvarı'nda bulunan elektro-eğirme düzeneği fotoğrafı	25
Şekil 3. Nanoaltın yüklü köpük fotoğrafı	28
Şekil 4. Nanofibröz matriks fotoğrafı	33
Şekil 5. Nanofibröz matriksin çapraz bağlama işleminden sonraki fotoğrafı.....	34
Şekil 6. İki katmanlı iskelelerin film tabakalarının SEM mikrografileri A) çapraz bağlanmamış, B) çapraz bağlanmış	41
Şekil 7. İki katmanlı iskelelerin köpük tabakalarının A) yandan ve C) üstten çekilmiş çapraz bağlanmamış, B) yandan D) üstten çekilmiş çapraz bağlanmış grupların SEM mikrografileri.....	42
Şekil 8. PEO'in (akış hızı= 1 ml/h, voltaj=8.5 kV, mesafe=15 cm). A) % 2.5 konsantrasyondaki ve B) % 2 konsantrasyondaki çözeltileriyle elde edilen nanofiberlerin SEM mikrografileri	43
Şekil 9. Dönen alüminyum disk (D=5 cm) üstünde toplanan sabit hız (2200 rpm) ve akış hızında (1 ml/h), elektro-eğrilmiş A) PCS1 (voltaj=15 kV, mesafe=18.5 cm) B) PCS2 (voltaj=20 kV, mesafe=22 cm) C) PCS3 (voltaj=20 kV, mesafe=15.5 cm) D) P2 (voltaj=8.5 kV, mesafe=15cm) gruplarının SEM mikrografileri	44
Şekil 10. Altın nanoparçacık sentezinin kalorimetrik olarak tespiti (Sayılar eklenen sitratın hacmini göstermektedir).....	46
Şekil 11. Altın nanoparçacıkların CTEM mikrografileri A)1 ml sitrat eklenmiş, B)2 ml sitrat eklenmiş, C) 3 ml sitrat eklenmiş, D) 4 ml sitrat eklenmiş.....	47
Şekil 12. Altın nanoparçacıkların (S1 grubu) CTEM mikrografisi	48
Şekil 13. Altın nanoparçacık yüklenmiş (batırma yolu ile) iskelelerin (A, B çapraz bağlanmamış) ve (C, D çapraz bağlanmış) SEM resimleri.....	49
Şekil 14. Altın nanoparçacık yüklenmiş (çözelti hazırlama sırasında eklenmiş) iskelelerin (A, B çapraz bağlanmamış) ve (C, D çapraz bağlanmış) SEM resimleri	50

Şekil 15. İki katmanlı iskelelerin distile su içinde hidrolitik bozunumlarının gravimetrik analizi	51
Şekil 16. İki katmanlı iskelelerin distile su içinde hidrolitik bozunumlarının BCA analizi	52
Şekil 17. İki katmanlı iskelelerin dengedeki su ile şişme (EDS) analizi. 1, 2, ve 4. günlerde gruplar arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p<0.05$).	53
Şekil 18. Çapraz bağlanmamış (BLCS) ve çapraz bağlanmış (BLCS-X) iki katmanlı iskelelerin su buharı geçirgenliklerinin kıyaslaması	54
Şekil 19. İki katmanlı iskelelerin in vitro-enzimatik bozunumunun BCA yöntemi ile analizi	55
Şekil 20. Çapraz bağlı olmayan (BLCS) ve çapraz bağlı (BLCS-X) iskelelerin çekme dayanımları #: Gruplar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p<0.05$	56
Şekil 21. Çapraz bağlı olmayan (BLCS) ve çapraz bağlı (BLCS-X) iskelelerin kırılma anındaki uzamaları. #: Gruplar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p<0.05$	56
Şekil 22. Çapraz bağlı olmayan (BLCS) ve çapraz bağlı (BLCS-X) iskelelerin elastik modülüsü.....	57
Şekil 23. İskelelerin A) çapraz bağlı olmayan, B) çapraz bağlı olanların gözenek boyut dağılımı	58
Şekil 24. Altın nanoparçacıklarının (S1 grubu) keratinositler üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi #: Aynı konsantrasyonda farklı zamanlar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. *: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p<0.05$	59
Şekil 25. Altın nanoparçacıklarının (S2 grubu) keratinositler üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi. #: Aynı konsantrasyonda farklı zamanlar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. *: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p<0.05$	59
Şekil 26. Altın nanoparçacıklarının (S3 grubu) keratinositler üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi. #: Aynı konsantrasyonda farklı zamanlar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. *: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir $p<0.05$	60
Şekil 27. Altın nanoparçacıklarının (S1 grubu) 3T3 fibroblastlar üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi. #: Aynı konsantrasyonda farklı zamanlar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p<0.05$	61

- Şekil 28.** Altın nanoparçacıklarının (S2 grubu) 3T3 fibroblastlar üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi.
#: Aynı konsantrasyonda farklı zamanlar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p < 0.05$ 61
- Şekil 29.** Altın nanoparçacıklarının (S3 grubu) 3T3 fibroblastlar üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi.
#: Aynı konsantrasyonda farklı zamanlar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. *: Aynı zaman içinde 20 ppm grubu ile arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p < 0.05$ 62
- Şekil 30.** Alüminyum disk üstünde toplanan kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2 % + 10 µl) iskeleler (D= 5 cm, akış hızı= 1 ml/h, voltaj=19 kV, mesafe=23 cm). A, B) Nanofiber boyut dağılımını C, D) iskelelerdeki damlaları göstermektedir..... 66
- Şekil 31.** Alüminyum disk üstünde toplanan kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2 % + 100 µl) iskeleler (D= 5 cm, akış hızı= 1 ml/h, voltaj=19 kV, mesafe=23 cm). A, B) Nanofiber boyut dağılımını C, D) iskelelerdeki damlaları göstermektedir..... 67
- Şekil 32.** Alüminyum disk üstünde toplanan kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2.5 % + 10 µl) iskeleler (D= 5 cm, akış hızı= 1 ml/h, voltaj=19 kV, mesafe=23 cm). A, B) Nanofiber boyut dağılımını C, D) iskelelerdeki damlaları göstermektedir..... 68
- Şekil 33.** Alüminyum disk üstünde toplanan kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2.5 % + 100 µl) iskeleler (D= 5 cm, akış hızı= 1 ml/h, voltaj=19 kV, mesafe=23 cm). A, B) Nanofiber boyut dağılımını C, D) iskelelerdeki damlaları göstermektedir..... 69
- Şekil 34.** Alüminyum disk üstünde Kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2.5 % + 500 µl) iskeleler (D= 5 cm, akış hızı= 0.8 ml/h, voltaj=16 kV, mesafe=23 cm). A, B) Nanofiber boyut dağılımını C, D) iskelelerdeki damlaları göstermektedir..... 70
- Şekil 35.** Alüminyum disk üstünde Kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2.5 % + 1000 µl) iskeleler (D= 5 cm, akış hızı= 0.8 ml/h, voltaj=16 kV, mesafe=23 cm). A, B) Nanofiber boyut dağılımını C, D) iskelelerdeki damlaları göstermektedir..... 71
- Şekil 36.** Alüminyum diskler üstünde toplanan kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2 % + 10 µl) iskelelerin (D= 5 cm, akış hızı= 1 ml/h, voltaj=19 kV, mesafe=23 cm) A, B) 2 saat boyunca, C, D) 4 saat boyunca GTA çözeltisi (3 %) ile çapraz bağlanmasının fiber çapı ve gözenek boyutu üstündeki etkisi 72

- Şekil 37.** Alüminyum diskler üstünde toplanan kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2 % + 100 µl) iskelelerin (D= 5 cm, akış hızı= 1 ml/h, voltaj=19 kV, mesafe=23 cm) A,B) 2 saat boyunca, C,D) 4 saat boyunca GTA çözeltisi (3 %) ile çapraz bağlanmasının fiber çapı ve gözenek boyutu üstündeki etkisi 73
- Şekil 38.** Karbon film kaplı ızgaralar üstünde toplanmış A1-A3) 6 ml, B1-B3) 7 ml, C1-C3) 8 ml D1-D3) 9 ml E1-E3) 10 ml % 0.1'lik sodyum sitrat ile hazırlanan altın nanoparçacıklarının cTEM mikrografileri ve boyut dağılım histogramları..... 75
- Şekil 39.** Karbon film kaplı ızgaralar üstünde toplanmış nanofiberli matris içindeki altın nano parçacıklarının (S9) cTEM mikrografileri..... 76
- Şekil 40.** Karbon film kaplı ızgaralar üstünde toplanmış A)10 µl, B)100 µl, C)500 µl, D)1000 µl altın nano parçacık yüklü (S9) nanofiberli matrislerin (akış hızı= 1 ml/saat, voltaj=19 kV, mesafe=20 cm) cTEM mikrografileri. Kırmızı daireler içinde altın nanoparçacıkları gösterilmiştir..... 77
- Şekil 41.** İki katmanlı iskelelerin 37 °C'de PBS içinde hidrolitik bozunumlarının gravimetrik analizi..... 78
- Şekil 42.** İki katmanlı iskelelerin (BECM-X) 37 °C'de PBS içinde hidrolitik bozunumlarının BCA analizi 79
- Şekil 43.** İki katmanlı iskelelerin in vitro-enzimatik bozunumunun BCA yöntemi ile analizi 80
- Şekil 44.** A) Çapraz bağlı olmayan ve B) GTA buharıyla (3 %) 2 saat boyunca çapraz bağlanan nanofibröz matrislerin gözenek boyutu dağılımı ve gözeneklilik analizleri..... 83
- Şekil 45.** Altın nanoparçacıklarının (S7 grubu) keratinositler üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi. *: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. #: Aynı zaman içinde 5 ppm ile arada anlamlı fark olduğunu göstermektedir p<0.05. 84
- Şekil 46.** Altın nanoparçacıklarının (S8 grubu) keratinositler üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi. *: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. #: Aynı zaman içinde 5 ppm ile arada anlamlı fark olduğunu göstermektedir p<0.05. 85
- Şekil 47.** Altın nanoparçacıklarının (S7 grubu) 3T3 fibroblastlar üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi. *: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. p<0.05..... 86

- Şekil 48.** Altın nanoparçacıklarının (S8 grubu) 3T3 fibroblastlar üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi.
*: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. #: Aynı zaman içinde gruplar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p < 0.05$ 86
- Şekil 49.** Altın nanoparçacıkları ile yüklü (S9 grubu) BLCS-X ve BECM-X iskelelerden farklı zaman periyotlarında (1, 4 ve 7 gün) salınan ürünlerin 3T3 fibroblastlar üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi.
*: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p < 0.05$ 87
- Şekil 50.** Altın nanoparçacıkları ile yüklü (S9 grubu) BLCS-X ve BECM-X iskelelerden farklı zaman periyotlarında (1, 4 ve 7 gün) salınan ürünlerin keratinositler üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi. 88
- Şekil 51.** Altın nanoparçacıkları ile yüklü disklerinin etrafında 1 gün sonra oluşan şeffaf zonun ölçülmesi (A, B, C; S7 grubu nanoaltının farklı dozlarını-5, 10, 20 ppm- içeren diskler. D, E, F; S8 grubu nanoaltının farklı dozlarını-5, 10, 20 ppm- içeren diskler 89
- Şekil 52.** Hücre kültür insertleri içinde bulunan A) nanofibröz matriks, B) köpük fotoğrafları..... 90
- Şekil 53.** Ko-kültür çalışmaları yapılan A) nanofibröz matriks ve B) köpük üstündeki hücrelerin H& E boyaması ile görüntülenmesi. Pembe-kırmızı renk hücre sitoplazmasını ve kollajeni, mor renk ise hücre çekirdeğini göstermektedir..... 90

Özet

Bu projede, kollajen, PEO ve serisin proteinlerinden deri doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere iki katmanlı deri eşlenikleri üretilmesi amaçlanmıştır. Bunun için; iki katmanlı liyofilize kollajen köpük (BLCS) ve iki katmanlı elektroğrılmış kollajen matriks (BECM) geliştirilmiştir. Ayrıca, iskelelere altın nanoparçacıkları ekleyerek, iskelelerin antibakteriyel özellik kazanması, hücre yapışması ve hücre proliferasyonu gibi özelliklerinin nasıl değiştiğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Öncelikle, BLCS, sonra da BECM'in laboratuvar testleri yapılmıştır. Bu testler; dengedeki su tutmaları (EDS), su buharı geçirgenliği hızı (WVTR), mekanik testler, hidrolitik ve in vitro biyobozunum testleri, morfolojik analizler (SEM), altın nanoparçacıklarının karakterizasyonları (CTEM, spektrofotometre) ve in vitro sitotoksosite (MTT assay) ve antibakteriyellik çalışmalarıdır. BLCS ve BECM glutaraldehit ile (3%) 2 saat boyunca çapraz bağlanmıştır (BLCS-X, BECM-X). Çapraz bağlama, iskelelerin hidrolitik ve in vitro biyobozunuma karşı direncini arttırmıştır. BLCS-X 37 °C'de PBS içinde 2 haftada neredeyse hiç bozunmazken, BECM-X 1 hafta içinde büyük oranda bozunmuştur. BLCS ve BECM sırasıyla 1 hafta ve 1 saat içinde tamamen çözülmüştür. BLCS, BECM ve BECM-X iskelesinin dermal katmanının kollajenaz enzimi içinde 2 saat içinde tamamen bozunduğu; BLCS-X'in ise bozunuma 3 gün boyunca dayandığı görülmüştür. Bu testler sonucunda, BECM'in, doku mühendisliği uygulamaları için uygun olmadığı görülmüş ve bundan sonraki deneylerde sadece BECM-X'in testleri yapılmıştır. BLCS ve BLCS-X'in EDS değerleri arasında (10.26 ± 0.54 gr/gr ve 34.28 ± 2.84 gr/gr) anlamlı bir fark bulunmuştur. Ayrıca BECM'in EDS değeri bunlara ($3,58 \pm 0,58$) kıyasla çok düşüktür. BLCS, BLCS-X ve BECM-X'in WVTR değerleri (1300 gr/m²/day civarında) arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Çapraz bağlama işlemi BLCS iskelelerin hem çekme kuvvetini, hem de kırılma anındaki uzama oranını arttırmıştır; ama iskelelerin elastik modulus değerlerini istatistiksel açıdan anlamlı bir biçimde değiştirmemiştir. BECM-X'in mekanik özellikleri deriye benzemektedir. Farklı boyutlarda altın nanoparçacıkları sentezlenmiştir (10-100 nm). 10-50 nm boyutlarında ve 5-20 ppm'lik konsantrasyonlarda gerçekleştirilen ilk sitotoksosite deneylerine göre, düşük konsantrasyonlarda altın nanoparçacıklarının (5-10 ppm) hiçbir boyut grubu üzerinde sitotoksik etkisi yoktur. Ancak, sadece 50 nm boyuttaki grup, control grubuyla (altınsız) yarışabilir düzeyde olumlu sonuçlar vermiştir. Bu sebeple, 20-50 nm arasında boyutları ve düzgün boyut ve şekil dağılımı olan altın nanoparçacıkları sentezlenmiştir. Bu yeni sitotoksosite deneylerine göre, hiçbir konsantrasyon (5,10, 20 ppm) ve boyut grubunun (36, 42 nm) hücreler üstünde sitotoksik etkisi gözlemlenmemiştir ve iki boyut

grubu da kontrol grubu kadar olumlu proliferasyon sonucu vermiştir. Altın nanoparçacıklarının antibakteriyellik etkisi antimiyogram testiyle onaylanmıştır.

Anahtar Kelimeler: İki katmanlı deri eşleneği, yara örtüsü, membran, deri doku mühendisliği, elektro-eğirme, liyofilizasyon, kollajen, serisin, altın nanoparçacık

Abstract

In this project, it was aimed to fabricate bilayered skin substitutes from collagen, PEO, and sericin proteins for skin tissue engineering applications. Therefore, bilayered lyophilized collagen sponge (BLCS) and bilayered electrospun collagen matrix (BECM) was developed. It was also aimed to make the scaffolds gain antibacterial properties and enhance the cell adsorption and cell proliferation of these scaffolds by conjugating gold nanoparticles to them.

Laboratory tests of BLCS and BECM were performed; equilibrium degree of swelling (EDS), water vapor transmission rate (WVTR), mechanical tests, hydrolytic and in vitro biodegradation tests, morphological analysis (SEM), characterization of gold nanoparticles (CTEM, spectrophotometer) and cytotoxicity studies and antibacterial tests. BLCS and BECM were cross-linked with glutaraldehyde (3%) (BLCS-X, BECM-X). The cross-linking enhanced hydrolytic and enzymatic degradation. BLCS-X seemed not to degrade in water at 37 °C during 2 weeks, while BECM-X degraded mostly in 1 week. BLCS and BECM degraded thoroughly in 1 week and 1 hour, respectively. While BLCS and BECM, and BECM-X degraded in 2 hours by collagenase completely, BLCS-X resisted degradation for 3 days. BECM was decided unsuitable for skin tissue engineering applications, and only the tests of BECM-X were conducted hereafter. There was a significant difference between the EDS values of BLCS and BLCS-X (10.26 ± 0.54 , gr/gr and 34.28 ± 2.84 gr/gr, respectively). In comparison, EDS of BECM-X was lower (3.58 ± 0.58). There was no statistical difference between the WVTR values (about $1300 \text{ gr/m}^2/\text{day}$) of BLCS, BLCS-X and BECM-X. Cross-linking treatment increased both the tensile strength and the percent elongation of BLCS, but there was meaningful difference between the elastic modulus of scaffolds. Mechanical properties of BECM-X was similar to skin. Gold nanoparticles (10- 100 nm) were synthesized. With respect to the initial cytotoxicity studies carried out for gold nanoparticles having a size range of 10-50 nm and concentration of 5-20 ppm showed, low concentrations of gold nanoparticles (5-10 ppm) had no cytotoxic effect. Yet, only the group (50 nm size) could compete with the control group (no gold) successfully. Therefore, particles having a size between 20 and 50 nm and uniform size and shape distribution were synthesized. None of the concentration (5,10, 20 ppm) or the size groups (36, 42 nm) had cytotoxic effect on the cells, and the proliferation results of these two size groups were as good as control group. Antibacterial effect of gold nanoparticles were verified with antibiogram tests.

Keywords: Bilayered skin substitutes, wound dressing, membrane, skin tissue engineering, electrospinning, lyophilization, collagen, sericin, gold nanoparticle

Giriş

Özellikle yanık ve kronik ülserlere bağlı gelişen deri yaralanmaları dünyada ve ülkemizde yaygın bir şekilde görülmektedir. Derinin dermal katmanının kaybedilmesine neden olan yaralanmalarda hastanın kendisinden alınan (otogreft) ya da kadavradan (Allogreft) ve domuzdan elde edilen (Xenogreft) greftler kullanılmaktadır. Ancak greftlerin kısıtlı sayıda bulunmaları ve antijenik özellikte olmaları doku mühendisliği yoluyla üretilecek olan deri yedeklerine gereksinim doğurmuştur. Deri doku mühendisliği alanında yapılan araştırmalarda kollajenin deri yedeği matriksi olarak kullanılması yaygındır. Bu araştırmalarda, özellikle derinin dermal ve epidermal tabakalarını büyük ölçüde taklit edebilen iki katmanlı kompozit deri yedeklerinin başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Bu şekilde üretilmiş hücreli ve hücreli ORCel™ ve Integra™ gibi ticari ürünler mevcuttur. Ancak Integra'nın epidermal yedek kısmı sentetik polimer (silikon) filmidir, dermal kısmı da kollajenden yapılmış liyofilize köpüktür. ORCel'in dermal yedek kısmı kollajen köpükten, epidermal kısmı ise kollajen jelden yapılmıştır. Önerilen projede epidermal yedek kısmı biyopolimer-serisin/kollajen-film, dermal yedek ise gözenekli kollajen iskeleli (liyofilize köpük, ya da nanofiberli ağ). Özellikle elektro-eğirme yoluyla oluşturulacak bir nanofiberli ağın deri dermal tabakasını daha iyi taklit edebileceği düşünülmektedir. Kollajen türü ürünler, yaralanmalarda çok da nadir olmayan enfeksiyon oluşumunu engelleyici özellikte değildir. Bu ürünlerin epidermal yedekleri, su buharı ve oksijen geçirgenliğini yeteri kadar kontrollü sağlayamadığı gibi, bazıları da bakteri geçirgendir. Bu nedenlerle, önerilen projede, altın nanoparçacıklarının da dermal yedeklere yüklenmesi ile bu soruna çözüm getirilmesi hedeflenmektedir. Daha önceki projemizde deri örtüsü olarak kullanılmak üzere su buharı, oksijen geçirgenliği, v.b özellikleri optimize edilen serisin/kollajen filmlerin bu projede geliştirilecek olan doku iskelelerinin epidermal yedek kısmı olarak kullanılması ile derin doku hasarları onarımında daha etkin bir deri yedeği üretilmesi amaçlanmıştır. Projede ulaşılmaya istenilen hedefler şunlardır: 1) Dermal yedeğin, derinin dermal tabakası gibi gözenekli olması ve fibroblast hücrelerinin üzerlerine yapışmasını, büyümesini ve göç edebilmesini sağlayabilecek bir mikro/nano yapıya sahip olması, 2) Üretilecek iki tip dermal yedeğin (köpük ve nanofiberli ağ) özellikleri karşılaştırılarak hangi düzeydeki hasarlarda deri doku mühendisliğine daha uygun olduklarının araştırılmasıdır. Dermal yedeğe nanoaltın parçacıkları yüklenerek yapıya antibakteriyel özellik kazandırılması ve nanoaltın parçacıkları sayesinde deri matriks proteinlerinin ve hücrelerin dermal yedek yüzeyindeki yapışma oranlarının artırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, serisin ve kollajen malzemeleri kullanılarak daha önceden üretilmiş olan filmlerin epidermal yedek olarak yarayı ikincil enfeksiyonlardan koruması ve dış ortamla dermal

yedek arasında bir membran görevi görerek hem oksijen ve karbondioksit gibi gaz alışverişini hem de su baharı geçişini kontrollü bir şekilde sağlamasıyla da, hazırlanan doku iskelelerinin biyoetkinliğinin yüksek olması beklenmektedir.

Üretilecek olan iki katmanlı yedeklerin literatürdeki doku mühendisliği amacıyla üretilmiş deri yedeklerine yeni ve farklı bir alternatif olması yanısıra, nanoaltının deri doku mühendisliğinde biyomedikal uygulamalar için potansiyelinin incelenmesi de bu projenin kapsamındadır. Projede kullanılacak olan epidermal katmanın daha önceki çalışmamızda optimize edilmiş olması ve deri için gerekli özellikleri kontrol edebilmesinin gösterilmiş olmasıyla benzer iki katmanlı deri yedeklerine kıyasla bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Uzun vadede, in vivo ve klinik deneyler gerçekleştirildikten sonra, benzer ticari örneklerle yarışabilecek düzeyde ciddi deri yaralanmalarına maruz kalmış ve tedavi için greft bekleyen hastalara uygulanabilecek iyi bir ürün olması beklenmektedir.

Genel Bilgiler

Yanıklar, mekanik travma, basınç ve bacak ülserleri, doğuştan gelen deri hastalıkları ve kanserli dokunun kesilmesi gibi şiddetli akut ve kronik yaralara neden olan durumlar cerrahlar için büyük bir sorun teşkil eder. Özellikle de yanıklar ve deri ülserleri problemlidir. Örneğin Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl 1 milyondan fazla yanık yaralanmaları meydana gelmektedir ve bunlardan 45000 'i hastanelik olup, yıllık 4500 vaka da ölümlerine sonuçlanmaktadır. Kronik yaralara gelince, sadece Amerika'da bu tarz yaralar için yıllık toplam 1 milyar dolar gibi yüksek bir tedavi ücreti harcanmaktadır ve bu durumun 2 milyondan fazla insanı etkilediği tahmin edilmektedir (STASHAK, 2004; SUPP, 2005; BALASUBRAMANI, 2001).

Dermal kayıplar olduğunda derinin kendiliğinden iyileşmesi beklenemez. Böyle durumlarda, deri yedekleri tedavi için kullanılmaktadır. Geçmiş 10 yılda, xenogreftler, allogreftler ve otogreftler gibi birçok deri yedeği iyileşme için kullanılmıştır. Ancak donör dokuların limitli sayıda bulunması ve antijenik olmaları yüzünden bahsi geçen bu deri yedekleri deri iyileşmesini çok iyi sağlayamazlar ve henüz yaygın olarak kullanılmamaktadırlar. Bu nedenlerle, birçok yeni çalışma doku mühendisliği yaklaşımını kullanmaya başlamıştır. Doku mühendisliğinin amacı, mühendislik ve biyolojik bilimler gibi disiplinlerin yardımıyla organ ve doku yenilenmesini sağlamak ve fonksiyonlarını tekrar kazandırmaktır (MA, 2003).

Deri doku mühendisliği yoluyla üretilmiş deri yedekleri hem içine hücre ekilmiş hem de hücreyi destekleyen bir matriks sistemi olarak tasarlanabilir. Bu matrikslerin ev sahibi dokuyla oluşturduğu özel hücre reaksiyonları sayesinde in vivo doku oluşumu sağlanır ve sinir hücresi yenilenmesi ve kan damarları oluşumu hızlanır (RAMOS-E-SILVA, 2002; KEARNEY, 2001). Şu anda piyasada deri doku mühendisliği ile üretilmiş birçok deri yedeği mevcuttur. Bunlar arasında, TransCyte™-nylon ve silikon matriks içine fibroblast ekilip insan deri matriks proteinlerinin ve birçok büyüme faktörünün oluşmasını sağlayan, sonra dondurularak hücrelerinin cansızlaştırıldığı bir ürün- de bulunmaktadır. Ayrıca, Integra™ gibi kollajen ve Kondroitin-6-sülfat malzemelerinden oluşan iki katmanlı dermal yedek ve silikon yapay epidermisten oluşan ve Biobrane™ gibi silikon membran ve nylon kumaştan oluşan matriksin içine kollajen katılmış ve kimyasal olarak çapraz bağlanmış örnekler vardır (BALASUBRAMANI, 2001; RAMOS-E-SILVA, 2002; BOYCE, 2001; SHAKESPEARE, 2005). Hücreli deri yedekleri, epidermal ve kompozit (dermal ve epidermal) deri yedekleri olmak üzere iki çeşittir. Epidermal deri yedekleri, otolog veya allojenik keratinositlerin tek başlarına bir katman olarak (Epicel™), ya da laserle mikrodellikler açılmış hiyaluronik asit membranları üstüne ekilmesi şeklinde (VivoDerm) kullanılır (RAMOS-E-SILVA, 2002; JONES, 2002). İki katmanlı kompozit deri yedeklerine ticari örnek olarak Dermagraft™, Apligraf™ ve OrCel™ verilebilir. Bu deri yedeklerine de fibroblast ve keratinosit hücreleri ekilmiştir (RAMOS-E-SILVA, 2002; BALASUBRAMANI, 2001; KEARNEY, 2001; BOYCE, 2001).

Ülkemizde de deri doku mühendisliği çalışmaları yapılmaktadır. Dış katmanı poliüretan membran, iç katmanı ise EGF yüklü gelatin köpük olan yara örtüsü (ULUBAYRAM, 2001), tavşanlarda yapılan yara iyileşmesi testlerinde normal derinin dermis tabakasının neredeyse aynısının oluşumunu sağlayabilmiştir. Elektroçirami sistemi kullanılarak üretilen EGF-İmobilize PCL/jelatin nanofiberli yapıların deri doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak potansiyel adaylar olduğu bildirilmiştir (TIĞLI, 2010). Benzer bir çalışmada (GÜMÜŞDERELİOĞLU, 2011), EGF-İmobilize PCL/kollajen nanofiberli yapıların alternatif bir dermal yedek olabileceği söylenmiştir.

Deri doku mühendisliğindeki önemli bir faktör de iskelenin üretilmesidir. Deri doku mühendisliği için kullanılacak olan ideal bir dermal yedek için gerekli özellikler şu şekilde sıralanabilir: 1) mükemmel bir biyoyumluluğa sahip olması, 2) 100-200 µm gözenek boyutuna ve %90'nın üstünde gözenekliliğe sahip olması (birbiriyle bağlantılı, hücre geçişi ve göçü için uygun gözenek yapısı), 3) hücre yapışması, yayılması ve göçü için yeterli yüzey alanı ve uygun bir yüzey kimyası olması, 4) kontrollü bir biyobozunum hızına sahip olması (yeni doku oluşumuyla ve dokunun içinde büyümesi ile uyumlu bozunma hızı) ve 5) uygun

biyomekanik özelliklere sahip olması (MA, 2003; LV, 2005). Deri doku mühendisliği amacıyla geliştirilecek ideal bir epidermal yedek malzeme için gerekli genel özellikler de şu şekilde sıralanabilir: 1)Yarayı ikincil enfeksiyonlardan koruyucu olması, 2) bir yandan kontrollü bir su buharı geçirgenliğine sahipken diğer yandan da yara sıvılarını ve eksudalarını emebilmesi, 3) nemli bir yara iyileşme ortamı oluşturabilmesi, 4) oksijen ve karbondioksit alışverişine yeterli düzeyde izin vermesi, 5) biyoyumlu olması; doku oluşma sürecine olumlu katkısı olmalı ve 6) uygun biyomekanik özelliklere sahip olması (PURNA, 2000; WITTAYA-AREEKUL, 2006).

Bu gerekli özellikler düşünüldüğünde, doku mühendisliği alanında en uygun malzemelerden biri olarak kollajen ön plana çıkmaktadır. Yirminin üstünde tanımlanmış tipi bulunan kollajenler arasında, tip I kollajenin birçok dokuda bulunduğu ve en geniş dağılıma sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca, temel olarak kemikte, tendonlarda, bağ dokuda ve deride bulunan tip I kollajen, insan vücudunda toplam kollajene oranı en fazla olanıdır. Tip I kollajen, türler arasında daha iyi tolere edilme eğilimindedir ve diğer kollajen tiplerine kıyasla daha düşük bir bağışıklık sistemi reaksiyonuna sebep olur (HAARER, 2006). Doğal dokularda, tip I kollajen fibrillerinin çap boyu 50-500 nm arasında değişmektedir ve doku tipine göre boyut dağılımı düzgündür (MATTHEWS, 2002). Kollajen, doku mühendisliği ve implant tasarımlarında kullanılmak üzere film, mat, fiber, köpük ve jel gibi birçok değişik formlarda üretilebilir (HAARER, 2006; LEE, 2001). Kollajen, makrofajlar ve granülositler gibi yara iyileşmesinin hücresel elemanlarını uyarmasının yanı sıra, hücre yapışması, göçü ve çoğalmasını sağlayan bir şablon görevi de görür (PURNA, 2000). Fibroblastlar ve keratinositler gibi hücreler kollajen sübstratları özellikle tanırırlar (SILVER, 1994). Ayrıca, mükemmel biyoyumlu ve biyobozunur olmaları sayesinde doku mühendisliğinde çok farklı uygulama alanları bulunmaktadır (MA, 2003). Özellikle deri yedekleri (replasmanı), kemik yedekleri, yapay kan damarları ve kalp kapakçıkları, tendon, bağ dokusu, çevresel sinir sistemi, kıkırdak ve menisküs doku mühendisliği uygulamalarında ve ilaç salım sistemlerinde kullanılırlar (HAARER, 2006; LEE, 2001).

Sadece kollajenin elektroğrılması ile ilgili çalışmalarla birlikte (POWELL, 2008; RHO, 2006)., kollajen-polisakarit (chitosan, glycosaminoglycans) (CHEN, 2008; ZHONG, 2005), kollajen-sentetik polimerler (PEO, PCL) (HUANG, 2001; TILLMAN, 2009) ya da kollajen-doğal polimer (fibroin, elastin) kompozitlerinin (YEO, 2008; BUTTAFOCO, 2006) elektroğrılması ile ilgili birçok çalışma da yapılmıştır. Benzer şekilde kollajen (JANSSON, 2001) içeren (PARK, 2002; HAFEMANN, 2001; O'BRIEN, 2004) köpük formunda malzemeler de doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmışlardır. Deri doku mühendisliği uygulamaları için bu üretim metotlarından birinin bir diğerine daha üstün geldiği söylenebilir. Elektroğirme işlemiyle,

hücreler arası matriksinde (ECM) bulunan kollajenin yapısal ve biyolojik özelliklerini çok iyi bir şekilde taklit etmek mümkündür. Hatta elektroğrılmış tip I kollajenin, karakteristik 67 nm'lik tekrarlı D bandı şeklini neredeyse doğal kollajen yapısıyla birebir aynı olacak şekilde sağladığı göstermiştir (SCOTT, 2010). Bu konuda yapılmış olan bir araştırmada (POWELL, 2008) nanofiberli ağların köpüklere kıyasla deri doku mühendisliği için daha uygun olduğu önerilmiştir.

Ancak, kollajen deri doku mühendisliği uygulamalarında kullanırken dikkat edilmesi gereken bazı hususlar vardır. İşlem görmemiş kollajen iskelelerin hızlı biyobozunum hızı ve düşük mekanik kuvveti gibi zayıf noktaları onların doku mühendisliğinde kullanımını kısıtlayan önemli sorunlardır. Kollajen bazlı iskelelerin çapraz bağlanması, biyobozunum hızını düşürmek ve biyomekanik özelliklerini geliştirmek için kullanılan etkili bir metottur. Bu nedenle, kollajeni çapraz bağlama işlemi, kollajen bazlı iskeleler için en önemli konulardan biri olmuştur. Şu anda kollajen bazlı iskelelerin özelliklerini geliştirmede kullanılan fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki farklı çapraz bağlama yöntemi mevcuttur. Kimyasal kullanılmayan - fotooksidasyon, dehidrotermal işlemler ve ultraviyole ışınlama gibi- metotta, potansiyel sitotoksik etkisi olan kimyasal kalıntılar oluşmaz ve kollajen malzemelerin mükemmel biyoyumlulukları korunur (LEE, 2001). Ancak, bu fiziksel işlemlerin birçoğu deri doku mühendisliğinin taleplerine cevap olabilecek kadar yüksek düzeyde çapraz bağlama derecesi sağlayamaz. Bu nedenlerle, kimyasal (gluteraldehit-GA, 1-etil-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide-EDAC, polglisileter ve poliepoksidik rezinler, v.b. reaktifler) içeren metotların kullanımı birçok durumda gereklidir (KHOR, 1997; OSBORNE, 1999; COURTMAN, 2001; RAYMOND, 1999; SUNG, 1996). GA, iki bitişik polipeptit zincirindeki amino gruplarına köprü görevi gören bifonksiyonel bir çapraz bağlama reaktifidir. Suda çözünebilirliği, yüksek çapraz bağlama verimliliği ve düşük fiyatı sayesinde deri doku mühendisliği alanında en önde gelen seçeneklerden biri olmuştur (JORGE-HERRERO, 1999).

Doğal bir polimer olan serisin, ipeğin % 25-30'unu oluşturur ve fibroin fiberlerinin etrafını sarar. Serisin ipeğe birçok önemli özellik kazandırır (ZHANG, 2002). Bunlar; mükemmel oksijen geçirgenliği (MURASE, 1994), antioksidan özellik, mor ötesi (UV) ışın dayanıklılığı, nemi düzenleme yeteneği, antibakteriyel, antikanser ve antikoagülan özelliklerdir (ZHANG, 2002; ZHAORİGETU, 2003). Serisinin kozmetik ve biyomedikal uygulamalar gibi birçok farklı alanlarda kullanıldığı belirtilmiştir (ZHANG, 2002; KUNDU, 2008). Serisinin yara iyileşmesine katkılarını incelemek için yapılan araştırmalar önemli sonuçlar vermiştir. Tsubouchi (TSUBOUCHI, 1999) iyileşmeyi hızlandıran ve yeni oluşan deriye zarar vermeden çıkarılabilen fibroin-serisin karışımı bir yara örtüsü geliştirmiştir. Bir çalışmada (TSUBOUCHİ, 2005) primer

insan fibroblastlarının yapışmasının serisin sayesinde arttığı bulunmuştur. Ratlarda gerçekleştirilen bir araştırmada serisin kreminin herhangi bir alerjik reaksiyona sebep olmadan yara iyileştirici etkisinin olduğu gösterilmiştir (ARAMWİT VE SANGCAKUL, 2007).

Araştırmacılar nanofaz içeren malzemelerin içlerine kıyasla yüzeydeki atom sayılarının daha fazla olması gibi kendilerine has yüzey özelliklerinin hücre yapışmasını ve çoğalmasını etkileyebileceğini belirtmektedir. Örneğin, altın nanoparçacıkları ve kitosandan oluşan filmlere keratinositlerin daha hızlı bir şekilde yapıştığı bildirilmiştir (LU, 2010). Yapılan bu çalışmada düşük konsantrasyonda (5 ppm'lik bir konsantrasyon) altın nanoparçacıklarının keratinosit çoğalmasını arttırdığı gösterilmiştir. Yüzeydeki katyonların iskelelerin proteinlerle etkileşimini geliştirdiği, böylece protein yapışma miktarını arttırdığı gösterilmiştir. Örneğin, kitin gibi katyon bakımından zengin malzemelerle yapılan iskeleler iyi bir laminin yapışması sağlamıştır. Nanogümüş ve tip I kollajenden yapılan doku mühendisliği iskelesinin, laminin yapışmasını arttırdığı ve zarar görmüş periferik sinirlerin yeniden oluşumuna katkı sağladığı gözlenmiştir (DING, 2010). Altın nano-parçacıklarının geniş spektrumlu bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir (HERNANDEZ-SIERRA, 2008; NATH, 2008; RAY, 2007; ZHAROV, 2005; ZHANG, 2008). Ancak nano boyuttaki malzemeler için nanotoksitenin bir sorun olduğu da belirtilmektedir. Özellikle bakır ve çinko temelli nanomalzemeler yüksek toksisiteye sahiptir. Diğer yandan, titanyum, alümina, seriya, gümüş, nikel ve zirkonya temelli nanomalzemeler düşük-orta düzeyde toksisite göstermiş ve tungsten karbür için ise hiç toksisite gözlemlenmemiştir. (LANONE, 2009). Altın nanoparçacıklarının çok az düzeyde toksisiteye, 200 µg/mL'de hücre canlılığında %15 azalma, neden olduğu kaydedilmiştir (DREZEK, 2008). Altın nanoparçacıklarının boyuta bağlı sitotoksiteleri araştırılmıştır (PAN, 2007). Bu çalışmada, bağ doku fibroblastları, epitel hücreler, makrofajlar ve melanoma hücrelerinin 1,4 nm boyutundaki altın nanoparçacıklarına karşı çok hassas olmalarına karşın 15 nm boyutundaki altın nanoparçacıklarının bu hücrelere yüksek konsantrasyonlarda bile toksik olmadıkları gösterilmiştir. Araştırmacıların altın nanoparçacıkları hakkındaki araştırmaları bu konuda yapılacak gelecek çalışmalar için cesaretlendiricidir. Bu boyuttaki altın nanoparçacıkları, toksik olmamaları, kolaylıkla sentezlenebilmeleri ve bio-inertlikleri sayesinde büyük ilgi çekmişlerdir (SHARMA, 2011). Altın nanoparçacıkları biyoyumludur ve nanoimmünoloji, nanotıp ve nanobiyoteknoloji gibi uygulama alanlarında uygulama potansiyelleri bulunmaktadır (SHUKLA, 2005). Bir başka önemli çalışmada, iskelet kası doku mühendisliğinde kullanılmak üzere elektroğrılmış (electrospun) poli (L-laktid) ve altın nanoparçacık kompozit iskeleleri

üretmiş ve düşük miktarlardaki altın nanoparçacıkların iskelet kası onarımı için biyobozunur, biyouyumlu ve iletken iskeleler yaratmak için kullanılabileceği önerilmiştir (MCKEON-FISHER, 2011).

Literatürdeki çalışmalarda üretilmiş olan deri eşlenikleri genel olarak enfeksiyonlu yaralar için enfeksiyon önleyici bir özellik taşımamaktadır. Enfeksiyon önlemek için deri eşleniklerine nanogümüş ya da antibiyotik yüklenmiştir (PARK, 2004; MI, 2003), ancak bu amaçla nanoaltın henüz kullanılmamıştır. Bu projede doku iskelesinin dermal tabakasına yüklenecek olan nanoaltının hem enfeksiyon riskine karşın koruma potansiyeline sahip olması, hem de hücre/protein yapışmasını arttırarak iyileşmeyi hızlandırması beklenmektedir. Bu nedenlerle, projede getirilen bu yaklaşım, ticari formlara ve benzeri araştırmalara kıyasla biyolojik açıdan daha geliştirilmiş olması sayesinde inovatiftir. Daha önceden proje ekibince geliştirilmiş olan serisin/kollajen membranlar, önerilen projede epidermal yedek olarak kullanılacaktır, çünkü bu membranların bakteri geçişine karşı başarılı bir bariyer görevi gösterdiği, su buharı ve oksijen geçişini kontrollü bir şekilde sağladığı gösterilmiştir (AKTURK, 2011). Nanoaltın yüklü dermal tabaka ve serisin/kollajen membranlar birleştirilerek üretilen iki katmanlı deri yedeklerinin bu alandaki benzer çalışmalarda üretilen deri eşleniklerine kıyasla yukarıda belirtilen avantajlarının sayesinde daha iyi sonuçlar sağlayacağı ve uzun vadede, ticari ürünlere yeni bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

Projede Hedeflenen Amaçlar

Öncelikle, daha önce geliştirilen serisin/kollajen membranların, bu projede geliştirilen 3 boyutlu iskelelerle (liyofilize kollajen ve elektro-eğrilmış nanofibröz matriks) birleştirilerek deri doku mühendisliği uygulamaları için kullanılması amaçlanmıştır. Bu yapıların, hücrelerin geçişine olanak sağlayacak şekilde porlu yapıda, uygun bir porozite ve gözenek boyutuna sahip olması, derinin normal 3 boyutlu nanofibröz yapısını taklit edebilmesi hedeflenmiştir. İskelelere yüklenecek altın nanoparçacıklarının, yapılar antibakteriyel özellik kazandırması ve bununla birlikte hücre yapışması ve proliferasyonuna olumsuz bir etkisinin olmaması (sitotoksik olmaması) amaçlanmıştır. Bunun için uygun boyutta ve konsantrasyonda altın nanoparçacık grubu seçilmiştir. Altın nanoparçacıkların, iskelelere nasıl düzgün bir dağılımla eklenebileceğinin (emdirme ya da çözelti içine ekleme yoluyla) araştırılması amaçlanmıştır. İskelelere eklenen altın nanoparçacıklarının sitotoksik etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bütün üretilen iki katman deri eşleniklerin, laboratuvar karakterizasyon testleri ile deri doku mühendisi uygulamaları için uygunluklarının araştırılması proje kapsamında planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Aşama 1: İki Katmanlı Doku İskelelerinin (BLCS) Üretilmesi ve Optimizasyonu

1.1. Serisin/Kollajen Filmlerin Hazırlanması

Serisin ve kollajen çözeltileri (0.5 M) asetik asit içinde çözünerek daha önceki çalışmamızda olduğu gibi hazırlanmıştır (AKTURK, 2011). Serisin/kollajen (1:2) grubu, köpüklerle birlikte iki katmanlı bir yapı oluşturmak üzere kullanılmıştır.

1.2. Köpük Hazırlanması

Öncelikle kollajen çözeltisi (% 1, 0.5 M asetik asit içerisinde) çözülmeye bırakılmıştır. Daha sonra bu çözeltide oluşan jelleşmiş kollajen (%1) köpük hazırlamak için kullanılmıştır. Bu jelden 5 ml'lik hacimler alınarak, cam petrilere (D: 5 cm) dökülüp -80 °C'de hemen dondurulmuştur. Bu çözelti, -80°C' de 1 gün bekledikten sonra 4-6 saat liyofilize edilerek köpük elde edilmiştir.

1.3. İki Katmanlı İskele (BLCS) Hazırlanması

1%'lik kollajen çözeltisinden alınan 5 ml'lik hacimler, cam petrilere (D: 5 cm) hazırlanmış olan 1:2 serisin/kollajen filmlerin üstüne dökülüp -80 °C'de hemen dondurulmuştur. İki katmanlı yapı, -80°C' de 1 gün bekledikten sonra 24 saat liyofilize edilmiş ve iki katmanlı deri eşleniği elde edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. İki katmanlı deri eşleniği (BLCS) fotoğrafı

1.4. Nanofiberli Matris Hazırlanması

Tip I kollajen 0.5 molar asetik asit çözücüsü içinde çözünerek değişik konsantrasyonlarda kollajen çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözelti için elde edilebilecek maksimum konsantrasyonunun belirlenmesi

amacıyla yapılan denemeler sonrasında bu konsantrasyonun 4 mg/ml (% 0.4) civarında olduğu tespit edilmiştir. Burada uygulanan homojenizasyon işlemleri; homojenitör kullanılarak asetik asit içindeki kollajenin çözünürlüğünün ve dağılımının artırılması ve sonra bu çözeltiyi 5000 rpm’de santrifüj ederek süpernatantın 100 µm’lık filtreden geçirilmesi işlemlerinden oluşmaktadır. Bu işlemler sonrasında elde edilen çözeltinin konsantrasyonu 1 mg/ml (% 0.1) olarak bulunmuştur. Kollajenin düşük konsantrasyonlarda elektro-eğilmesi mümkün olmadığından, son çözeltinin konsantrasyonu çözücüsü uçurularak artırılabilmiştir. Bu şekilde elde edilen farklı kollajen çözeltileri (Tablo 1) için elektro-eğirme deneyleri yapılmıştır. ODTÜ, MODSIMMER-Koza araştırma Laboratuvarında bulunan elektro-eğirme düzeneği (Şekil 2) ile nanofiberli iskeleler üretilmiştir.



Şekil 2. Modsimmer Koza Araştırma laboratuvarı’nda bulunan elektro-eğirme düzeneği fotoğrafı

Kollajen çözeltileri, küt uçlu cam şırınga iğnelerden kütle akış hızı 1-2 ml/saat olacak şekilde şırınga pompası (New Era, USA) ile ayarlanmış ve belirli bir uzaklıkta bulunan sabit toplayıcı ekran (10-30 cm) üstüne gönderilmiştir. Şırınganın iğnesine bağlanan yüksek voltajlı güç kaynağının voltajı ayarlanarak (10-20 kV) iğneden çıkan fiberin sürekliliği ve ekranda nasıl toplandığı (sıvı damlaları olarak veya beyaz iplikçi parçalar halinde) gözlemlenmiştir. Bu düşük kollajen konsantrasyonlarında nanofiber oluşumunu sağlamak amacıyla yardımcı bir polimer olarak PEO kullanılması da düşünülmüştür. Sadece PEO ve PEO/kollajen karışımlarından oluşan 0.5 M asetik asitte çözülmüş çözeltiler (Tablo 1) de elektro-eğirmeye çalışılmıştır. Bu gruplarla, daha sağlam yapıda nanofiberli iskeleler elde edilmesi amacıyla ve

ayrıca fiberlerin arasında bir yapıştırıcı görev görmesi için çözeltilere serisin katılmıştır (Tablo 1). Başarılı bir şekilde elektro-eğrilen gruplar ayrıca ekran üstüne yerleştirilmiş olan 1:2 serisin/kollajen filmlerin (epidermal yedek) üstünde toplanmaya da çalışılmıştır. Bu şekilde, nanofiberlerin filmler üstünde düzgün bir dağılımla toplanıp toplanmadığı araştırılmıştır.

1.4. Deri İskelelerinin Çapraz Bağlanması (BLCS-X)

Kollajen köpük ve serisin/kollajen (1:2) filminden oluşan iki katmanlı deri eşlenikleri glutaraldehit (% 3' lük) çözeltisiyle 2 saat boyunca oda sıcaklığında çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlama işleminden sonra reaksiyona girmemiş aldehit grupları 0.1 M glisin (suda) çözeltisi ile 1 saat bloke edilmiştir. Bu işlemden önce iskeleler, artan etanol serisiyle (% 20-100) her bir oran için 10'ar dakika bekletilmiştir. Kurutma işlemi için de yapılar benzer şekilde azalan etanol serisi içerisinde (% 100-20) bekletilmiştir. En son olarak, yapılar son bir kurutma işlemine tabi olmuşlardır. Bunun için iskeleler ya HMDS (Hekzametildisilazan) içinde çeker ocak altında bir gün kurumaya bırakılmış, ya da -80 °C'de dondurulup liyofilize edilmiştir. Örnekler testlerde kullanılıncaya kadar desikatörde bekletilmiştir.

Tablo 1. Elektro-eğirme optimizasyonu için hazırlanan gruplar

Gruplar	PEO konsantrasyonu (% w/v)	Kollajen konsantrasyonu (% w/v)	Serisin konsantrasyonu (% w/v)	Polimer Karışım oranı, PEO:C:S (mg:mg:mg)	Toplam Polimer Karışım konsantrasyonu (% w/v)
P1	1.5	-	-	1:0:0	-
P2	2.5	-	-	1:0:0	-
P3	3.5	-	-	1:0:0	-
C1	-	0.1	-	0:1:0	-
C2	-	0.4	-	0:1:0	-
C3	-	1	-	0:1:0	-
S1	-	-	0.1	0:0:1	-
S2	-	-	0.4	0:0:1	-
S3	-	-	1	0:0:1	-

CS1	-	0.4	0.4	0:1:1	0.4
PC1	2.5	0.4	-	18.75:3:0	2.9
PC2	2.5	1	-	2.5:1:0	3.5
PS1	2.5	0.4	-	18.75:0:3	2.9
PCS1	2.5	0.4	0.4	18.75:1:2	2.9
PCS2	2.5	0.4	0.4	18.75:2:1	2.9
PCS3	2.5	0.4	0.4	18.75:1.5:1.5	2.9

1.5. Altın Nanoparçacıklarının Sentezi ve Karakterizasyonu

1.5.1. Altın Nanoparçacıklarının Sentezi

Altın nanoparçacıkları, sitrat indirgeme metodu (Turkevich metodu) ile sentezlenmiştir (TURKEVICH, 1951; KIMLING, 2006). Altın nanoparçacıklarının oluşumu kırmızı renk oluşu ile gözlemlenmiştir. İzlenen deney basamakları kısaca şöyledir:

1 g $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ kimyasalı 250 ml'lik distile suda çözülerek 10 mM altın (III) iyonlarından oluşan bir stok oluşturulmuştur.

- 1) Bu çözelti seyreltilerek 1 mM'lık bir çözelti elde edilmiştir (çözelti I).
- 2) Bu son çözülden 20 ml alınıp 50 ml'lik bir Erlenmeyer flaskına aktarılıp manyetik karıştırıcı bir ısıtıcıya konulmuştur. Yüksek hızda (800 rpm) karıştırılırken kaynama noktasına gelince buna daha önceden hazırlanmış %1'lik trisodyum sitrat dihidrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) çözeltisinden (çözelti II) değişik hacimlerde (1-5 ml) eklenmiştir.
- 3) Altın tuzu ile ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) indirgeyici ajanın ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) karışımdaki hacim oranları değiştirilerek farklı boyutlarda (çaplarda) altın nanoparçacıkları elde edilebileceği belirtilmektedir (FRENS, 1973; CHITHRANI, 2009). Çözeltinin rengi uçuk maviden (çekirdek oluşumu-nucleation) derin kırmızı bir renge (yakut kırmızısı) dönüştüğü zaman altın (III) indirgenip altın nanoparçacıkları oluşmuş olacaktır.

- 4) Son olarak, nanoaltın içeren çözelti ısıdan uzaklaştırılmış ve 20 ml'ye tamamlanacak şekilde üstüne distile su eklenmiştir. Son olarak çözelti 0.2 µm'lık filtreden geçirilmiştir. Elde edilen altın ananoparçacıkları konsantrasyonu 197 ppm 'dir.

1.5.2. Altın Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu

Altın nanoparçacıklarının istenilen nano boyutta olup olmadığı yüksek kontrastlı transmisyon elektron mikroskobu (cTEM) ile incelenmiştir. Analizden önce altın nanoparçacıkları sonikatörde tutularak sudaki stabilizasyonları yeterli ölçüde sağlanmıştır. Deneyle sırasında altın nanoparçacıkların sulu ortamlarda stabilizasyonlarını uzun süre koruduğu ve bu amaç için BSA ile kaplanmasına gerek olmadığı gözlenmiştir.

1.5.3. Altın Nanoparçacıklarının İskelelere Yüklenmesi

Üretilen doku iskelelerine iki farklı yolla altın nanoparçacıkları eklenmiştir. Birinci metotta iskeleler, belirli konsantrasyonlarda altın içeren çözeltilere batırılmıştır. İkinci metotta altın nanoparçacık stok çözeltisinden (157 ppm) belirli bir hacimde alınarak (1 ml) daha önce hazırlanan 10 ml 'lik kollajen çözeltilerine (1%) eklenmiştir (Şekil 3). Daha sonra iskelelerdeki altın dağılımı SEM ile incelenmiştir. Bu işlem hem çapraz bağlı olan, hem de çapraz bağlı olmayan örnekler için uygulanmıştır.



Şekil 3. Nanoaltın yüklü köpük fotoğrafı

1.6. İskelelerin In vitro Karakterizasyonu

1.6.1. Hidrolitik Bozunum Testleri

Üretilen doku iskelelerinin sudaki bozunumuna bakılmıştır. 1x1 cm² kesilen örnekler içinde PBS olan numüne kaplarına konulmuştur. Örnekler, 37° C deki inkübatörde yapının bütünlüğü bozulana kadar bekletilmiştir ve farklı zaman aralıklarında alınan süpernatantlara BCA analizi uygulanmıştır. İskelelerden kollajen kaybı BCA protein tayini testi ile ölçülmüştür. Buna göre, örnekler için 562 nm dalga boyunda spektrofotometre ile emilim ölçümleri yapıp daha önceden bilinen konsantrasyondaki protein çözeltileriyle elde edilmiş kalibrasyon eğrisi yardımıyla konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Bu değerlerden belirtilen zaman aralıklarındaki parçalanmış kollajen miktarı bulunmuştur (ZHONG, 2007). Ayrıca belirli zaman aralıklarında kaptan çıkarılan örneklerin ağırlıkları ölçülerek gravimetrik olarak bozunumları ölçülmüştür.

1.6.2. Su Tutma Deneyleri

İki katmanlı iskelelerin su tutma değerleri genel bir gravimetrik metot kullanılarak ölçülmüştür (WITTAYA-AREEKUL, 2006). Örnekler belirli boyutlarda kesilerek öncelikle kuru ağırlıkları (W_k) tartılmış, daha sonra bu örnekler 37°C 'de içinde fosfat tamponu bulunan plastik şişeler içinde bekletilmiştir. Günlük olarak (3 gün boyunca) şişeler içindeki su alınıp örneklerin yüzeyindeki fazla su filtre kağıdıyla silindikten sonra su tutmuş iskelelerin ağırlıkları ölçülmüştür (W_s). Sonuç olarak dengedeki su tutma miktarları (EDS) aşağıdaki formül (1) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$EDS = \frac{W_s - W_k}{W_k} \quad (1)$$

1.6.3. Enzimatik Bozunum Testleri

Üretilen doku iskelelerinin *in vitro* bozunumuna kolajenaz tip-1 enzimi ile bakılmıştır. Buna göre, 5 ml'lik fosfat tampon çözeltilisine 60 µl'lik kolajenaz tip-1 enzimi (1 mg/ml, fosfat tamponunda çözülmüş) eklenmiştir. Örnekler, kollajenaz enzimi içinde 37° C deki inkübatörde yapının bütünlüğü bozulana kadar bekletilmiştir ve farklı zaman aralıklarında alınan süpernatantlara BCA analizi uygulanmıştır. İskelelerden kollajen kaybı BCA protein tayini testi ile ölçülmüştür. Buna göre, örnekler için 562 nm dalga boyunda spektrofotometre ile emilim ölçümleri yapıp daha önceden bilinen konsantrasyondaki protein

çözeltileriyle elde edilmiş kalibrasyon eğrisi yardımıyla konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Bu değerlerden belirtilen zaman aralıklarındaki parçalanmış kollajen miktarı bulunmuştur (ZHONG, 2007).

1.6.4. Biyomekanik Testler

İki katmanlı doku iskelelerinin mekanik özellikleri, labımızda bulunan Lloyd LS500 Malzeme Test Cihazı (Lloyd, İngiltere) ile çekme testi uygulayarak Nexygen bilgisayar programı yardımıyla ölçülmüştür. Öncelikle 5x30 mm boyutlarında örnekler kesilmiştir. Örneklerin kalınlığı 2 mm civarındadır ve deneylerden önce vernier kaliper yardımıyla her bir test örneğinin kalınlığı ölçülmüştür. Örneklerin tutma kollarında kaymasını engellemek için bu bölgeler zımpara kâğıdıyla kaplanmıştır. Örnek gauge uzunluğu, 10 mm olarak ayarlanmıştır. Test hızı 10 mm/dk olacak şekilde ayarlanmış ve bilgisayar programı yardımıyla dayanım-uzama (stres-strain) datalarına dönüştürülen sonuçlardan elastik modülüsü, çekme dayanımı ve kırılma anındaki uzama değerleri hesaplanmıştır.

1.6.5. Gözeneklilik ve Gözenek Boyutunun Belirlenmesi

Gözeneklilik ölçümlerinde civa porozimetresi (Quantachrome Corporation, Poremaster 60) kullanılmıştır. Analizler için düşük basınç (0- 50 psi) ölçümü yapılmıştır. Ancak, gözeneklilik ölçümü için örneğin gerçek yoğunlunun da bilinmesi gerektiğinden helyum piknometresi (Quantachrome Ultrapycnometer 1000) kullanılmıştır. Bu şekilde liyofilize köpük iskelelerin hem gözeneklilik hem de gözenek boyut dağılımı bilgileri elde edilmiştir.

1.7. Altın Nanoparçacıkların In Vitro Biyouyumluluk Deneyleri

1.7.1. Hücre Kültürü Deneyleri

HaCat insan keratinosit ve 3T3 fibroblast hücre hatları, içine fetal sığır serum (FBS, %10, v/v) ve penisilin/streptomisin (10 U/ml) eklenmiş DMEM vasatıyla (DMEM high glucose-Glutamine) 37°C de ve % 5 CO₂- % 95 nemli hava içeren inkübatörde (5215, SHEL LAB, USA) kültive edilmiştir. Hücreler, en az % 80-90 konfluensiye ulaştıklarında, pasajlama için tripsinize edilmişlerdir. Hücreler diğer deneylerde kullanımlarına kadar sıvı azot tankında dondurularak saklanmışlardır.

1.7.2. Altın Nanoparçacık Süspansiyonlarının Sitotoksite Testleri (MTT Analizi)

3T3 fibroblast ve keratinosit hücreleri %10 FBS içeren DMEM hücre kültür vasatında kùltive edilip % 80-90 konfluensiye ulaştıklarında tripsinize edilip hemositometre ile sayılmışlardır. Hücre süspansiyonun içindeki hücre yoğunluğu 3000 hücre/ μ l olarak ayarlanmıştır. 3T3 fibroblast ve keratinosit hücreleri steril polistiren 12'lik hücre kültür kuyucukları içine bu yoğunlukta ekilmeden önce, her bir kuyucuğa 1ml %10 FBS içeren DMEM hücre kültür vasatı konulmuştur. Sonra her bir kuyucuğa 30.000 hücre ekilmiş ve hücrelerin kuyucuk yüzeyinde düzgün dağılımı sağlamak için pipetling yapılmıştır. 1 gün boyunca 37°C de ve % 5 CO₂- % 95 nemli hava içeren inkübatörde kùltive edildikten sonra kuyucuklar içindeki hücre kültür vasatı yenilenmiş ve her birinin üstüne farklı konsantrasyon (5, 10, 20 ppm) ve boyutlardaki (10, 20, 50 nm) altın nanoparçacıkları ekilmiştir. İstenilen altın nanoparçacıklarının konsantrasyonları, farklı boyutlarda nanoaltın içeren stok çözeltiler (197 ppm) DMEM vasatı ile seyreltilerek sağlanmıştır. 1 ve 7 günlük zaman periyotları için bu boyut ve konsantrasyon değerlerindeki altın nanoparçacıklarının hücreler üstündeki sitotoksik etkisine MTT hücre canlılık testi ile bakılmıştır. 7 günlük test için, nanoaltın içeren hücre kültür vasatı her iki günde bir yenilenmiştir. Bu test için, öncelikle MTT kimyasalı fosfat tamponu içinde çözümlenerek stok (5 mg/ml) hazırlanmıştır. Bu stok çözelti fenol kırmızısı içermeyen DMEM vasatıyla 1/10 oranında seyreltilerek bu testte kullanılmıştır. Belirlenen zamanlar sonunda kuyucuklardaki vasat alınmış ve önce fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Sonra her bir kuyucuğa 500 μ l MTT çözeltisi konulmuştur. 4 saat boyunca 37°C de karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda MTT solusyonu alınmış ve her bir kuyucuğa 500 μ l DMSO konulmuştur. Karıştırıcıda 15 dakika boyunca 200 rpm bekledikten sonra 550 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçümler yapılmıştır.

Aşama 2: İki Katmanlı Doku İskelelerinin (BECM) Üretilmesi ve Optimizasyonu

2.1. Serisin/Kollajen Filmlerin Hazırlanması

Serisin ve kollajen çözeltileri (0.5 M) asetik asit içinde çözünerek daha önceki çalışmamızda olduğu gibi hazırlanmıştır (AKTURK, 2011). Serisin/kollajen (1:2) grubu, nanofiberli ağla birlikte iki katmanlı bir yapı oluşturmak üzere kullanılmıştır.

2.2. Nanofiberli Matriks Hazırlanması

Tip I kollajen, 0.5 molar asetik asit çözücüsü içinde çözünerek % 1'lik ve % 2'lik kollajen çözeltileri hazırlanmıştır. Projenin birinci aşamasındaki çalışmalara göre, elektro-eğirme işleminin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için iyi çözülmüş şeffaf bir çözelti hazırlanması gerektiği anlaşıldığından, hazırlanan çözeltiler öncelikle kaynama noktalarına kadar ısıtılmış ve bu şekilde 5-15 dakika kadar bekletilmişlerdir. Bundan sonra iyice çözüldüğü gözlemlenen çözelti son olarak 100 µm'luk filtreden geçirilmiştir. Hazırlanan çözeltiden 1 ml'lik numüne alınarak fırında iyice kurutulmuş ve bütün çözme ve homojenizasyon işlemlerinden sonra çözeltinin konsantrasyonunda bir değişme olup olmadığı tespit edilmiştir. Elektro-eğirme işleminin gerçekleşmesi için yine yardımcı bir polimer olan PEO kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltilere iletkenliğin artırılması ve düzgün fiberler elde edilebilmesi için NaCl ya da altın nanoparçacıkları eklenmiştir (Tablo 2). Ayrıca nanoaltının spinleme işlemindeki etkisi de farklı deney grupları hazırlanarak araştırılmıştır (Tablo 3). Kollajen çözeltileri, küt uçlu cam şırınga iğnelerden kütle akış hızı 0,8-1 ml/saat olacak şekilde şırınga pompası (New Era, USA) ile ayarlanmış ve belirli bir uzaklıkta bulunan sabit toplayıcı ekran (20-30 cm) üstüne gönderilmiştir. Şırınganın iğnesine bağlanan yüksek voltajlı güç kaynağının voltajı ayarlanarak (10-20 kV) iğneden çıkan fiberin sürekliliği ve ekranda nasıl toplandığı (sıvı damlaları olarak veya beyaz ipliksi parçalar halinde) gözlemlenmiştir. Düzgün sağlam bir şekilde ekranda toplanan nanofibröz matriksler (Şekil 4) bir cımbız yardımıyla ekrandan çıkarılmış ve bir sonraki deneylerde kullanılmak üzere desikatöre kaldırılmıştır.



Şekil 4. Nanofibröz matriks fotoğrafı

2.3. İki Katmanlı İskele (BECM) Hazırlanması

Başarılı bir şekilde elektro-eğrilen gruplara 1:2 serisin/kollajen filmler (epidermal yedek) fibrin doku yapıştırıcısı ile yapıştırılarak iki katmanlı iskeleler elde edilmiştir. Toplayıcı ekran üstünde film yapıştırılarak nanofibröz matrikslerin filmler üstünde düzgün bir şekilde toplanması zor olduğundan bu yoldan vazgeçilmiştir. Hazırlanan örnekler deneylerde kullanılana kadar desikatöre kaldırılmıştır.

2.4. Deri iskelelerinin Çapraz Bağlanması (BECM-X)

Elektro-eğrilmiş iskelelerin sıvı içinde büyük oranda parçalandıkları gözlemlendiği için glutaraldehit buharında (% 3' lük) çapraz bağlanmaları yapılmıştır. Çapraz bağlama sırasında, iskelelerin büzüşerek yapılarının bozulmaması için iskeleler kenarlarından yuvarlak kapaklara sabitlenmiştir (Şekil 5). Bu şekilde, iskelelerin şekil ve ebatlarında herhangi bir bozulma olması engellenmiştir. Çapraz bağlama sırasında reaksiyona girmemiş aldehit grupları 0.2 M glisin (suda) çözeltisinde 30 dakika bloke edilmiştir. Bu işlemden önce iskeleler, artan etanol serisiyle (% 20-100) her bir oran için 10'ar dakika bekletilmiştir. Kurutma işlemi için de yapılar benzer şekilde azalan etanol serisi içerisinde (% 100-20) bekletilmiştir. En son olarak, yapılar son bir kurutma işlemine tabi olmuşlardır. Bunun için iskeleler ya HMDS (Hekzametildisilazan) içinde çeker ocak altında bir gün kurumaya bırakılmış, ya da -80 °C'de dondurulup liyofilize edilmiştir. Örnekler testlerde kullanılıncaya kadar desikatörde bekletilmiştir.



Şekil 5. Nanofibröz matriksin çapraz bağlama işleminden sonraki fotoğrafı

Tablo 2. Elektroegirme optimizasyonu için hazırlanan tuz veya altın içeren gruplar

Gruplar	PEO konsantrasyonu (% w/v)	Kollagen konsantrasyonu (% w/v)	Karışım oranı, PEO:C (mg:mg)	Toplam karışım konsantrasyonu (% w/v)	Eklenen tuzun molaritesi (mM)	Eklenen nano altın hacmi (157 ppm, µl)
C1t	-	1	0:1	1	40	-
C2t	-	2	0:2	2	40	-
S1t	1	1	1:1	2	40	-
S2t	1.5	1	1.5:1	2.5	40	-
S3t	2.5	1	2.5:1	3.5	40	-
S4t	1	2	1:2	3	40	-
S5t	1.5	2	1.5:2	3.5	40	-
S6t	2.5	2	2.5:2	4.5	40	-
C1a	-	1	0:1	1	-	10
C2a	-	2	0:2	2	-	10
S1a	2	1	2:1	3	-	10
S2a	2	1	2:1	3	-	100
S3a	2.5	1	2.5:1	3.5	-	10

S4a	2.5	1	2.5:1	3.5	-	100
-----	-----	---	-------	-----	---	-----

Tablo 3. Altın nanoparçacık konsantrasyonunun elektroëirmeye etkisini değerlendirmek için hazırlanan gruplar

Gruplar	PEO konsantrasyonu (% w/v)	Kollagen konsantrasyonu (% w/v)	Karışım oranı, PEO:C (mg:mg)	Toplam karışım konsantrasyonu (% w/v)	Eklenen nano altın hacmi (157 ppm, µl)
Sa1	2.5	1	2.5:1	3.5	10
Sa2	2.5	1	2.5:1	3.5	100
Sa3	2.5	1	2.5:1	3.5	500
Sa4	2.5	1	2.5:1	3.5	1000

2.5 Altın Nanoparçacıklarının Sentezi ve Karakterizasyonu

2.5.1. Altın Nanoparçacıklarının Sentezi

Altın nanoparçacıkları projenin birinci aşamasında üretildiği gibi, sitrat indirgeme metodu (Turkevich metodu) ile sentezlenmiştir (TURKEVICH, 1951; KIMLING, 2006). Ancak daha büyük (30-50 nm) ve düzgün boyut ve şekil dağılımı elde edebilmek için bazı değişiklikler yapılmıştır. 1 g $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ kimyasalı distile suda çözülerek 1 mM'lık bir çözelti elde edilmiştir (Solusyon I). Bu son çözelten 20 ml alınıp 50 ml'lik bir Erlenmeyer flaskına aktarılıp manyetik karıştırıcılı bir ısıtıcıya konulmuştur. Yüksek hızda (800 rpm) karıştırılırken kaynama noktasına gelince buna daha önceden hazırlanmış % 0,1'lik trisodyum sitrat dihidrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2$) çözeltisinden (Solusyon II) değişik hacimlerde (5-10 ml) eklenmiştir. Bu işlem den önce, Solusyon II daha homojen olması için 0,2 µm filtreden geçirilmiştir. Solusyon I kaynama noktasına ulaşana kadar, Solusyon II'nin bir ısıtıcı ile hafif bir şekilde sıcak olması sağlanmıştır. Bu şekilde Solusyon II, Solusyon I'e katılırken sıcaklık farkından kaynaklanacak sorunların önüne geçilmek amaçlanmıştır. Çözeltinin rengi uçuk maviden (çekirdek oluşumu-nucleation) derin kırmızı bir renge (yakut kırmızısı) dönüştüğü zaman 15 dakika daha işlem devam etmiştir. Bundan sonra çözelti hemen

buzlu su banyosuna batırılarak daha düzgün boyut dağılımlı parçacıklar elde edilmesine çalışılmıştır. Son olarak, nanoaltı içeren çözelti ısıdan uzaklaştırılmış ve 30 ml'ye tamamlanacak şekilde üstüne distile su eklenmiştir. Son olarak çözelti 0,1 µm'lık (100 nm) filtreden geçirilmiştir. Elde edilen altın nanoparçacıkları son konsantrasyonu 157 ppm 'dir.

2.5.2. Altın Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu

Altın nanoparçacıklarının istenilen nano boyutta olup olmadığı yüksek kontrastlı transmisyon elektron mikroskobu (cTEM) ile incelenmiştir. Analizden önce altın nanoparçacıkları sonikatörde tutularak, ve vorteksenerek topak yapıları engellenmiş ve suyun içinde daha düzgün dağılımları sağlanmıştır. Projenin ikinci döneminde, daha net görüntüler almak için yüksek çözünürlüklü transmisyon elektron mikroskobu (rTEM) kullanılması planlanmıştır. Ancak Merkezi Laboratuvar uzmanı, örneklerimiz için cTEM görüntülemesinin daha uygun olduğunu belirtmiştir. Bu nedenle rTEM analizine gerek kalmamıştır. CTEM ile görüntülenen altın nanoparçacıkların boyut dağılımı image J programı yardımıyla en az 100 parçacık için yapılmıştır.

2.5.3. Altın Nanoparçacıklarının İskelelere Yüklenmesi

Üretilen doku iskelelerine kollajen çözeltisi hazırlanırken altın nanoparçacıklarının yüklenmiştir. 10 ml'lik kollajen (1%) ve PEO (2-2,5%) karışımlarına farklı hacimlerinde (10, 100, 500, 1000 µl) altın nanoparçacık süspansiyonundan (157 ppm) eklenmiştir. İskelelerdeki altın dağılımını incelemek için cTEM analizi kullanılmıştır. cTEM örnekleri, karbon film kaplı bakır ızgaralar (grid) üstüne elektro-eğirme metoduyla nanoaltın yüklü nanofiberler toplanarak elde edilmiştir. Nanofiberlerin içindeki nanoaltın parçacıkları SEM analizi ile backscattering görüntülemesi ile de incelenmeye çalışılmış, ancak bu işlemde sonuç alınamamıştır.

2.6. İskelelerin In vitro Karakterizasyonu

2.6.1. Hidrolitik Bozunum Testleri

Üretilen doku iskelelerinin sudaki bozunumuna bakılmıştır. 1x1 cm² kesilen örnekler içinde fosfat tampon çözeltisi olan numüne kaplarına konulmuştur. Örnekler, 37°C deki inkübatörde yapının bütünlüğü bozulana kadar bekletilmiş ve farklı zaman aralıklarında alınan süpernatantlara BCA analizi uygulanmıştır. İskelelerden kollajen kaybı BCA protein tayini testi ile ölçülmüştür. Buna göre, örnekler için

562 nm dalga boyunda spektrofotometre ile emilim ölçümleri yapıp daha önceden bilinen konsantrasyondaki protein çözeltileriyle elde edilmiş kalibrasyon eğrisi yardımıyla konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Bu değerlerden belirtilen zaman aralıklarındaki parçalanmış kollajen miktarı bulunmuştur. (ZHONG, 2007). Ayrıca belirli zaman aralıklarında kaptan çıkarılan örneklerin ağırlıkları ölçülerek gravimetrik olarak bozunumları ölçülmüştür.

2.6.2. Su Tutma Deneyleri

İki katmanlı iskelelerin su tutma değerleri genel bir gravimetrik metot kullanılarak ölçülmüştür (WITTAYA-AREEKUL, 2006). Örnekler belirli boyutlarda kesilerek öncelikle kuru ağırlıkları (W_k) tartılmış, daha sonra bu örnekler 37°C 'de içinde fosfat tamponu bulunan plastik şişeler içinde bekletilmiştir. Günlük olarak (3 gün boyunca) şişeler içindeki su alınıp örneklerin yüzeyindeki fazla su filtre kağıdıyla silindikten sonra su tutmuş iskelelerin ağırlıkları ölçülmüştür (W_s). Sonuç olarak dengedeki su tutma miktarları (EDS) aşağıdaki formül (1) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{EDS} = \frac{W_s - W_k}{W_k} \quad (1)$$

2.6.3. Enzimatik Bozunum Testleri

Üretilen doku iskelelerinin *in vitro* bozunumuna kolajenaz tip-1 enzimi ile bakılmıştır. Buna göre, 5 ml'lik fosfat tampon çözeltisine 60 µl'lik kolajenaz tip-1 enzimi (1 mg/ml, fosfat tamponunda çözünmüş) eklenmiştir. Örnekler, kollajenaz enzimi içinde 37°C 'deki inkübatörde yapının bütünlüğü bozulana kadar bekletilmiştir ve farklı zaman aralıklarında alınan süpernatantlara BCA analizi uygulanmıştır. İskelelerden kollajen kaybı BCA protein tayini testi ile ölçülmüştür. Buna göre, örnekler için 562 nm dalga boyunda spektrofotometre ile emilim ölçümleri yapıp daha önceden bilinen konsantrasyondaki protein çözeltileriyle elde edilmiş kalibrasyon eğrisi yardımıyla konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Bu değerlerden belirtilen zaman aralıklarındaki parçalanmış kollajen miktarı bulunmuştur (ZHONG, 2007).

2.6.4. Biyomekanik Testler

İki katmanlı doku iskelelerinin mekanik özellikleri, labımızda bulunan Lloyd LS500 Malzeme Test Cihazı (Lloyd, İngiltere) ile çekme testi uygulayarak Nexygen bilgisayar programı yardımıyla ölçülmüştür. Öncelikle 5x30 mm boyutlarında örnekler kesilmiştir. Örneklerin kalınlığı 2 mm civarındadır ve deneylerden önce vernier kaliper yardımıyla her bir test örneğinin kalınlığı ölçülmüştür. Örneklerin tutma kollarında kaymasını engellemek için bu bölgeler zımpara kâğıdıyla kaplanmıştır. Örnek gauge uzunluğu,

10 mm olarak ayarlanmıştır. Test hızı 10 mm/dk olacak şekilde ayarlanmış ve bilgisayar programı yardımıyla dayanım-uzama (stres-strain) datalarına dönüştürülen sonuçlardan elastik modülüsü, çekme dayanımı ve kırılma anındaki uzama değerleri hesaplanmıştır.

2.6.5. Gözeneklilik ve Gözenek Boyutunun Belirlenmesi

Gözeneklilik ölçümlerinde civa porozimetresi (Quantachrome Corporation, Poremaster 60) kullanılmıştır. Analizler için yüksek basınç (0- 55,000 psi) ölçümü yapılmıştır. Bu şekilde nanofibröz iskelelerin hem gözeneklilik hem de gözenek boyut dağılımı bilgileri elde edilmiştir.

2.7. Nanoaltın In Vitro Biyouyumluluk Deneyleri

2.7.1. Hücre Kültürü Deneyleri

HaCat insan keratinosit ve 3T3 fibroblast hücre hatları, içine fetal sığır serum (FBS, %10, v/v) ve penisilin/streptomisin (10 U/ml) eklenmiş DMEM vasatıyla (DMEM high glucose-Glutamine) 37°C'de ve %5 CO₂- %95 nemli hava içeren inkübatörde (5215, SHEL LAB, USA) kültive edilmiştir. Hücreler, en az %80-90 konfluensiye ulaştıklarında, pasajlama için tripsinize edilmişlerdir. Hücreler diğer deneylerde kullanımlarına kadar sıvı azot tankında dondurularak saklanmışlardır.

2.7.2. Altın Nanoparçacık Süspansiyonlarının Sitotoksite Testleri (MTT Analizi)

3T3 fibroblast ve keratinosit hücreleri %10 FBS içeren DMEM hücre kültür vasatında kültive edilip %80-90 konfluensiye ulaştıklarında tripsinize edilip Cell Nucleocounter ile sayılmışlardır. Hücre süspansiyonu içindeki hücre yoğunluğu 30 hücre/ μ l olarak ayarlanmıştır. 3T3 fibroblast ve keratinosit hücreleri steril polistiren 12'lik hücre kültür kuyucukları içine her bir kuyucuk içine 30.000 hücre gelecek şekilde 1 ml koyulmuştur. 1 gün boyunca 37°C'de ve % 5CO₂- %95 nemli hava içeren inkübatörde kültive edildikten sonra kuyucuklar içindeki hücre kültür vasatı yenilenmiş ve her birinin üstüne farklı konsantrasyon (5, 10, 20 ppm) ve boyutlardaki (36-42 nm) altın nanoparçacıkları ekilmiştir. İstenilen altın nanoparçacıklarının konsantrasyonları, farklı boyutlarda nanoaltın içeren stok çözeltiler (157 ppm) DMEM vasatı ile seyreltilerek sağlanmıştır. 1, 4 ve 7 günlük zaman periyotları için bu boyut ve konsantrasyon değerlerindeki altın nanoparçacıklarının hücreler üstündeki sitotoksik etkisine MTT hücre canlılık testi ile bakılmıştır. 4 ve 7 günlük testler için, nanoaltın içeren hücre kültür vasatı her iki günde bir yenilenmiştir.

Bu test için, öncelikle MTT kimyasalı fosfat tamponu içinde çözülerek stok (5 mg/ml) hazırlanmıştır. Bu stok çözelti fenol kırmızısı içermeyen DMEM vasatıyla 1/10 oranında seyreltilerek bu testte kullanılmıştır. Belirlenen zamanlar sonunda kuyucuklardaki vasat alınmış ve önce fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Sonra her bir kuyucuğa 500 µl MTT çözeltisi konulmuştur. 4 saat boyunca 37°C de karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda MTT solusyonu alınmış ve her bir kuyucuğa 500 µl DMSO konulmuştur. Karıştırıcıda 15 dakika boyunca 200 rpm bekledikten sonra 570 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçümler yapılmıştır.

2.7.3. Altın Nanoparçacık ile Yüklü İskelelerin Sitotoksite Testleri (MTT Analizi)

3T3 fibroblast ve keratinosit hücreleri %10 FBS içeren DMEM hücre kültür vasatında kültive edilip %80-90 konfluensiye ulaştıklarında tripsinize edilip Cell Nucleocounter ile sayılmışlardır. Hücre süspansiyonun içindeki hücre yoğunluğu 30 hücre/µl olarak ayarlanmıştır. 3T3 fibroblast ve keratinosit hücreleri steril polistiren 12'lik hücre kültür kuyucukları içine her bir kuyucuk içine 30.000 hücre gelecek şekilde 1 ml eklenmiştir. 1 gün boyunca 37°C de ve %5 CO₂- %95 nemli hava içeren inkübatörde kültive edildikten sonra kuyucuklar içindeki hücre kültür vasatı alınarak her birinin üstüne 1, 4 ve 7 günlük zaman periyotlarında serumsuz kültür vasatında bekletilen iskelelerin kültür vasatı konulmuştur. Kültür vasatı bu işlemde önce 0,2 µm'luk filtreden geçirilmiş ve içine son oranı %10 olacak şekilde FBS konulmuştur. 1 gün boyunca bu kültür vasatında, 37°C de ve %5 CO₂- %95 nemli hava içeren inkübatörde bekletilen bu örnekler MTT hücre canlılık testi uygulanmıştır. Bu test için, yukarıda anlatılan prosedürün aynısı kullanılmıştır.

2.8. Nanoaltın Antibakteriyellik Testleri

İskelelerin bakterisit kapasitesi, *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) bakterisi ekilmiş agar petrilere disk difüzyon metodu uygulanarak bulunmuştur. Antibiyogram testinde kullanılan steril diskler (6 mm), çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan nanoaltın paçacık süspansiyonlarına batırılmıştır. Nanoaltının antibiyotikle birlikte antibakteriyel etkisine de bakılmak amacıyla nanoaltın yüklü diskler antibiyogram testinden önce *S.auresu*'a karşı bakterisit etkisi olduğu bilinen bir antibiyotik (sefuroksim) yüklenmiştir. Kanlı agar petrilere 37 °C'de önceden kültüre edilmiş *S.aureus* petri plakalara yayılmış ve bunların üstüne nanoaltın yüklü ve antibiyotik yüklü diskler yerleştirilmiştir. 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildikten sonra bakterinin oluşturduğu bulanık alandan farklı olarak diskin etrafında oluşan saydam engelleyici alan

bir cetvel yardımıyla ölçülmüştür. (Park ve ark., 2004, modifiye edilmiş metod). Kontrol olarak boş diskler kullanılmıştır.

2.9. Deri İskelelerine Hücre Ekimi Çalışmaları (Ko-Kültür)

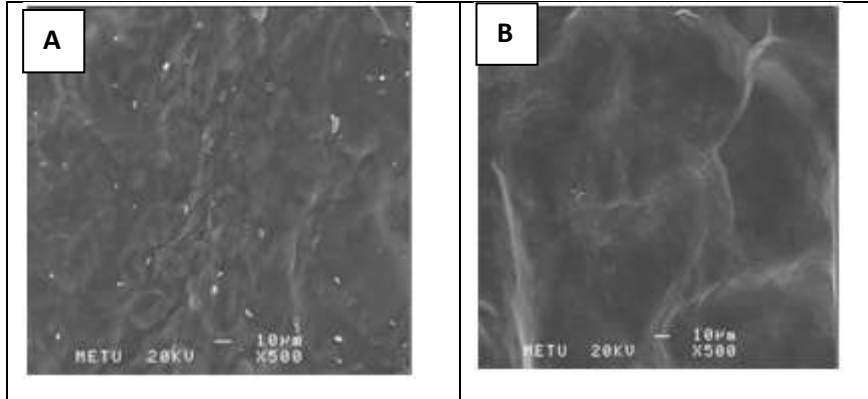
Belirli boyutlarda kesilen örnekler (çapraz bağlı nanoaltın yüklü nanofibröz matriks ve köpük) hücre ekiminden önce 6 kuyucuklu steril plakalar içinde bulunan hücre kültür insertlerinin (0,1 µm filtreli) üstüne yerleştirilmiştir. Bu şekilde UV ışığında 30 dakika tutulduktan sonra % 70 etanolde 1 gece bekletilmiştir. Sterilizasyon işlemi bittikten sonra örnekler fosfat tamponu (PBS) ile iyice yıkanmıştır. Hücre ekiminden önce, en son işlem olarak örnekler DMEM vasatı içinde bir gece inkübatörde ön nemlendirmeye tabi olmuşlardır. Bütün bu işlemlerden sonra iskelelere sırasıyla 3T3 fibroblast hücreleri ve keratinosit hücreleri ekilmiştir. Fibroblast hücreleri 1,5x10⁶ hücre/kuyucuk yoğunlukta ekilmiş ve 2 gün boyunca 37°C de ve % 5 CO₂- % 95 nemli hava içeren inkübatörde bekletilmiştir. Sonra iskelelere 6x10⁶ hücre/kuyucuk yoğunluğunda keratinosit ekilip 1 gün inkübe edilmiştir. Bundan sonra hava-su ara yüzü oluşturulması için kuyucuk içindeki vasat tazelenmiş, insert içindeki vasat ise tamamen alınmıştır. Bu şekilde filtre üstünde duran iskeleler alttan vasat ile temas halindeyken üstten de hava ile temas etmesi sağlanmıştır. Bu işlem 2 gün boyunca daha devam etmiştir. Kuyucuklar içindeki hücre kültür vasatları her gün tazelenmiş, insertler boş bırakılmıştır (Powell ve ark., 2008). En son olarak vasat alınmış ve iskeleler % 3 GTA içeren (PB içinde) çözelti içinde 2 saat bekletilerek hücreler fikse edilmiştir. Hemotoksin ve Eosin boyaması yapılarak iskelerdeki hücreler görüntülenmeye çalışılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

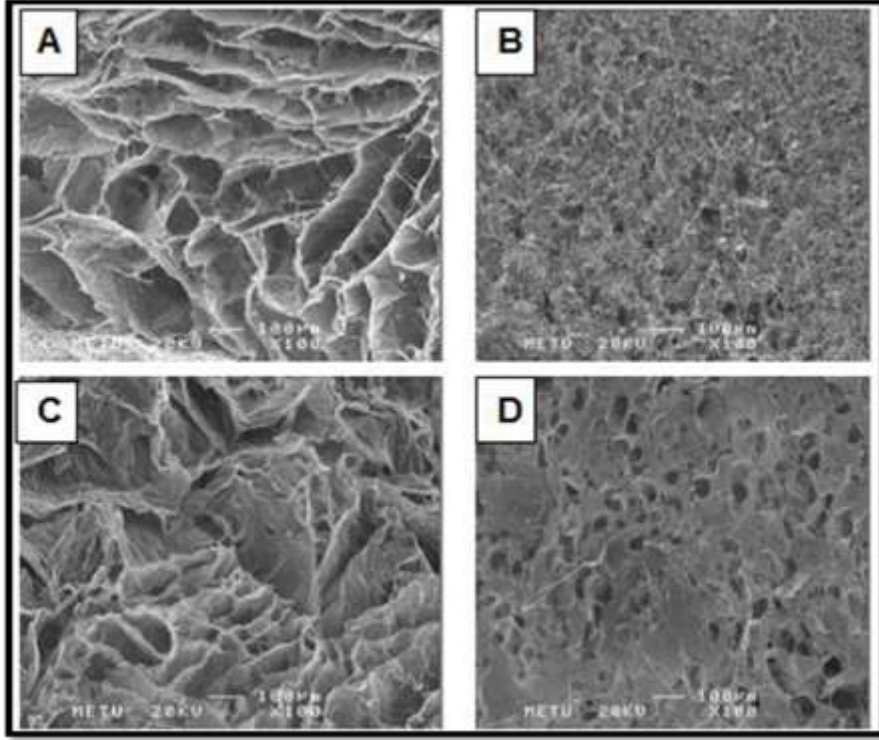
Aşama 1. İki Katmanlı Doku İskelelerinin (BLCS) Üretilmesi ve Optimizasyonu ile İlgili Bulgular

1.1. Köpük ile İki Katmanlı İskele Hazırlanması

İki katmanlı iskelelerin, epidermal yedek kısmının film yapısında, dermal yedek kısmının da köpük yapısında olduğu SEM analizi ile teyit edilmiş ve deriyi taklit edebilen gözenekli yapı (dermis) ve üzerindeki bariyer tabaka benzeri (epidermis) doku iskelesi oluşturulmuştur. Çapraz bağlanan ve bağlanmayan grupların film tabakalarında herhangi bir (mikron boyutta) gözenek görülmemektedir (Şekil 6). Çapraz bağlama işlemi sonrasında film tabakasındaki gözeneklerin azaldığı ve yüzeyin daha düzgün bir yapı kazandığı gözlenmiştir (Şekil 6B). Gözeneklerin boyut olarak hücrelerin geçişini sağlayabilecek büyüklükte (100-500 μm) ve göç etmesine uygun biçimde birbirleriyle kanallarla bağlı yapıda olduğu bulunmuştur (Şekil 7). Çapraz bağlanan grubun gözenek ve kanallarının kurutma işlemi sırasında daraldığı ve birbirine daha çok yaklaştığı, ancak yine de gözenekler arasında geçiş bağlantılarının bulunduğu görülmektedir. Bu gruplarda SEM resimlerinde görülen gözeneklerde hücre geçişi için uygun büyüklüktedir (30-100 μm) (Şekil 7).



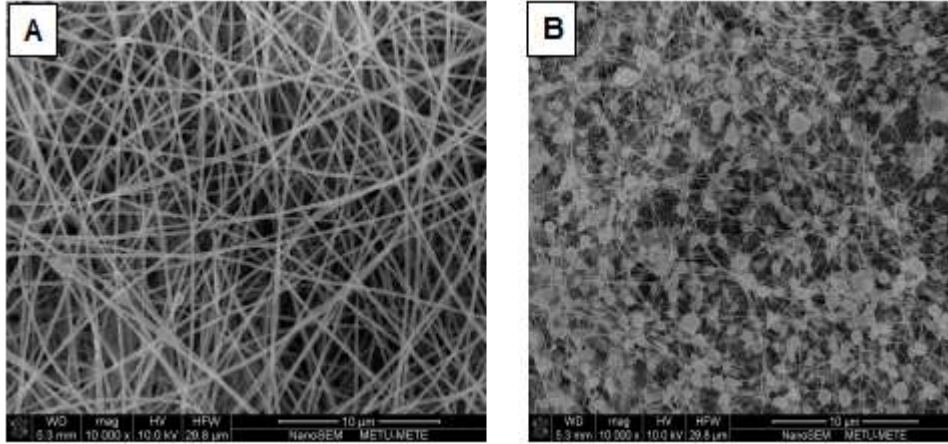
Şekil 6. İki katmanlı iskelelerin film tabakalarının SEM mikrografileri A) çapraz bağlanmamış, B) çapraz bağlanmış



Şekil 7. İki katmanlı iskelelerin köpük tabakalarının A) yandan ve C) üstten çekilmiş çapraz bağlanmamış, B) yandan D) üstten çekilmiş çapraz bağlanmış grupların SEM mikrografileri

1.2. Nanofiberli Matriks Hazırlanması

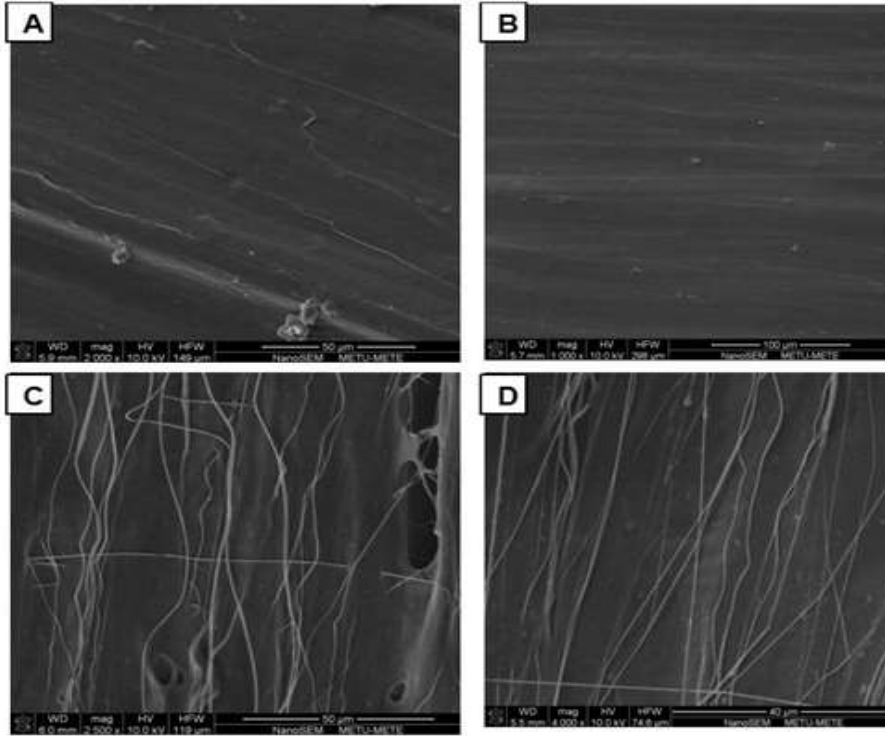
Sadece kollajenin değişik konsantrasyonları (C1, C2, C3) kullanılarak yapılan elektro-eğirme deneylerinde toplayıcı ekran üstünde nanofiber oluşturulamamıştır. Bununla ilgili yapılan elektro-eğirme çalışmalarının sonuçları Tablo 2’de özetlenmiştir. Kollajenin düşük konsantrasyonlardaki sulu çözeltileri ile nanofiber oluşturmanın zor olduğu belirtilmektedir. Kollajenin ve kollajen/polimer kombinasyonlarının sulu zayıf çözücülerde hazırlandığı durumlarda bu sorunu çözmek için PEO kullanımı yaygındır (CHEN , 2007). Bu sebeple bu projede, kollajenin elektro-eğrilebilmesi için yardımcı bir polimer olarak PEO kullanılmıştır. PEO ile birleştirmeden önce 0.5 M asetik asitte çözülmüş PEO’nun hangi konsantrasyonda düzgün bir şekilde elektro-eğrilebildiği araştırılmıştır (Tablo 2). Araştırma sonuçlarına göre P2 grubu (%2.5, w/v) uygun bulunmuştur. SEM analizi ile gözlemlenen P2 grubunun nanofiber dağılımının düzgün olduğu, nanofiber çapının da 181.98 ± 15.71 nm olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. PEO'in (akış hızı= 1 ml/h, voltaj=8.5 kV, mesafe=15 cm). A) % 2.5 konsantrasyondaki ve B) % 2 konsantrasyondaki çözeltileriyle elde edilen nanofiberlerin SEM mikrografileri

P1 grubunda küçük damlacıklar olduğu SEM analizi ile tespit edildiği, P3 grubu da çok visköz olduğu için şırıngadan istenilen akışın sağlanamadığı için bu grupların uygun olmadığı düşünülmüştür. Bu sebeple bir sonraki aşama olarak PEO konsantrasyonu (% 2.5) sabit tutularak değişik konsantrasyonlarda kollajenlerle birleştirilmiş ve elektro-eğirme denemeleri yapılmıştır (Tablo 2). Ancak oluşan yapıların alüminyum toplayıcıda düzgün dağılmadığı (belirli alanlarda ipliksi yapılar olduğu, belirli alanlarda da şeffaf- yoğun filmsi yapılar oluştuğu) gözlemlenmiştir. Bu durum, yapının homojenliğinin bozulmasına ve aynı zamanda yapının sağlamlığını yitirmesine de sebep olmuştur. Nanofiberlerin düzgün dağılımı için genellikle kollajen/PEO karışımı çözeltilere belirli miktarda tuz eklendiği belirtilmektedir (CHEN, 2011). Ayrıca kollajenin iyi çözünmediği bulanık çözeltilerle elde edilen nanofiberli yapılarda nanofiberlerin birbirine yapışması problemi olabileceği literatürde rapor edilmektedir (ZEUGOLIS, 2008). Bu sebeple bundan sonraki denemelerde çözeltilere tuz ilave etmek ve aynı zamanda kollajeni iyi bir şekilde çözmek (şeffaf çözelti) gerektiği düşünülmüştür. Ancak bundan önce, bu sorunu çözmek için (sağlam nanofiberli bir yapı elde etmek için) çözeltilere serisin proteini katılmıştır. İpek fibroinlerinin birleşerek sağlam bir ipek ipliği oluşturmasına yardımcı olduğu bilinen serisinin, kollajen nanofiberlerin de sağlamlığını artırıcı bir etken olarak görev görebileceği düşünülmüştür. Sadece serisinin değişik konsantrasyonları (S1, S2, S3) ve serisin ile kollajenin 1:1 kombinasyonu (CS1) kullanılarak yapılan elektro-eğirme çalışmalarına göre toplayıcı ekran üstünde nanofiber oluşmamıştır (Tablo 2). Ancak CS1 grubu ile elektro-eğrilirken şırınga ucundan toplama ekranına doğru düzgün bir fiber akışı aradaki mesafe çok arttırılsa bile (50 cm civarı) sağlanmıştır. Bu yüzden serisin tek başına fiber oluşturmada yetersiz kalmış olsa bile, kollajen fiberlerin

bütünlüğünü korumasında yardımcı olabileceği düşünülmüştür. Bundan sonraki deneylerde PEO/kollajen/serisin kombinasyonlarının elektro-eğrilmesi denenmiştir. Karışımlardaki PEO (% 2.5) ve toplam polimer konsantrasyonları (% 2.9) sabit tutulmuş, kollajen ve serisin oranları ise değiştirilmiştir (Tablo 1). Ayrıca fiberlerin düzgün dağılımını sağlamak ve çözücünün havada kuruma hızını arttırmak için toplayıcı ekranının belirli bir hızda dönmesi sağlanmıştır. Elektro-eğirme denemelerinde yapıya serisin eklenince oluşan nanofiberli iskelelerin sağlamlığının arttığı görülmüştür. Ancak serisin ile birlikte elde edilen yapıların şeffaf olduğu da gözlenmiştir (Tablo 4). SEM analizi sonuçlarına göre, nanofiberler birbirine kaynaşarak yoğun filmsi bir yapı oluşmuştur (Şekil 9). Ancak, kollajen ve serisin oranının birbirine eşit olduğu grupta (PCS3) daha az nanofiber birbiriyle kaynaşmıştır (Şekil 9C). Kontrol amaçlı yapılan bir diğer denemede sadece PEO kullanılarak başarılı bir şekilde nanofiber elde edilen grup (P2 grubu) da dönen ekranda toplandığı zaman nanofiberlerin yine kaynaşmış olduğu, bu nedenle bunun ekranda oluşan ısı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 9. Dönen alüminyum disk (D=5 cm) üstünde toplanan sabit hız (2200 rpm) ve akış hızında (1 ml/h), elektro-eğrilmiş A) PCS1 (voltaj=15 kV, mesafe=18.5 cm) B) PCS2 (voltaj=20 kV, mesafe=22 cm) C) PCS3 (voltaj=20 kV, mesafe=15.5 cm) D) P2 (voltaj=8.5 kV, mesafe=15cm) gruplarının SEM mikrografileri

Üretilen nanofiberli iskelelerin hepsi su içinde hızlı bir şekilde parçalanmaktadır. Ayrıca GTA sıvısı ya da buharında da bu iskelelerin eridiği gözlenmiştir. Bu sebeplerle nanofiberli doku iskelesi örnekleri in vitro karakterizasyon testinde kullanılamamıştır.

Tablo 4. Oluşturulan gruplarla elde edilen nanofiberlerin özellikleri

Gruplar *	Toplama ekranında oluşan yapının özellikleri	Oluşan nanofiberin özellikleri	Kullanılan çözeltinin özellikleri
P1	Fiberli sağlam bir yapı, ancak çok ince ve küçük sıvı damlaları var	-	Viskozitesi düşüktür. Çözelti şeffaftır.
P2	Fiberli sağlam bir yapı	Nanofiber dağılımı düzgündür. Ortalama fiber çapı: 181.98 ± 15.71 nm	Viskozitesi P1 göre yüksektir. Çözelti şeffaftır.
P3	Fiberli sağlam bir yapı	-	Viskozitesi çok yüksektir. Çözelti şeffaftır.
C1	Sadece sıvı damlaları	-	Viskozitesi çok düşüktür. Çözelti bulanıktır.
C2	Sadece sıvı damlaları	-	Viskozitesi çok düşüktür. Çözelti bulanıktır.
C3	Sadece sıvı damlaları	-	Viskozitesi çok düşüktür. Çözelti bulanıktır.
S1	Sadece sıvı damlaları	-	Viskozitesi çok düşüktür. Çözelti bulanıktır.
S2	Sadece sıvı damlaları	-	Viskozitesi çok düşüktür. Çözelti bulanıktır.
S3	Sadece sıvı damlaları	-	Viskozitesi çok düşüktür. Çözelti bulanıktır.
CS1	Sadece sıvı damlaları	-	Viskozitesi çok düşüktür. Çözelti bulanıktır.

PC1	Fiberli bir yapı ancak sağlam değil	-	Viskozitesi P2'ye benzer. Çözelti bulanıktır.
PC2	Fiberli bir yapı ancak sağlam değil	-	Viskozitesi çok yüksektir. Çözelti bulanıktır.
PS1	Fiberli bir yapı ancak sağlam değil	-	Viskozitesi P2'ye benzer. Çözelti bulanıktır.
PCS1	Fiberli sağlam bir yapı ve şeffaf	Nanofiberler birbirleriyle kaynaşmıştır	Viskozitesi P2'ye benzer. Çözelti bulanıktır.
PCS2	Fiberli sağlam bir yapı ve şeffaf	Nanofiberler birbirleriyle kaynaşmıştır	Viskozitesi P2'ye benzer. Çözelti bulanıktır.
PCS3	Fiberli sağlam bir yapı ve şeffaf	Nanofiberler daha az kaynaşmıştır. Ortalama fiber çapı: 566 ± 110.33 nm	Viskozitesi P2'ye benzer. Çözelti bulanıktır.

*Grup içerikleri Tablo 1'de sunulmuştur.

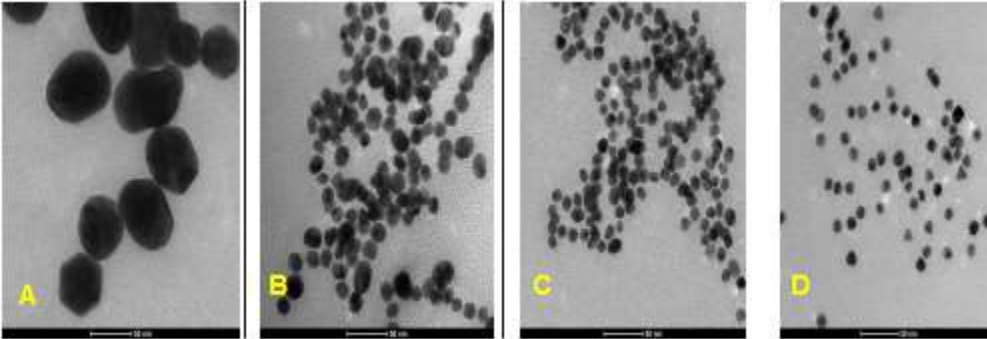
1.3. Altın Nanoparçacıklarının Sentezi ve Karakterizasyonu ile İlgili Bulgular

Projenin başında amaçlandığı gibi Turkewich metodu ile istenilen boyutlarda (10-50 nm aralığında) nanoaltın parçacıkları üretilmiştir. Nanoaltın sentez aşamasında çözelti sıcaklığı (kaynama noktası), karıştırma hızı (800 rpm), altın tuzu molaritesi (1 mM) ve başlangıç hacmi (20 ml), eklenen trisodyum sitratın konsantrasyonu (1%) sabit tutulmuş, tek değişken sitratın eklenen hacmi (1-4 ml) olmuştur. Bu şekilde elde edilen altın nanoparçacıkları S1 (1 ml sitrat), S2 (2 ml sitrat), S3 (3 ml sitrat), S4 (4 ml sitrat) diye gösterilmiştir. Sulu ortamda nanoaltın oluşumu kalorimetrik farklarla tespit edilebilmiştir (Şekil 10).



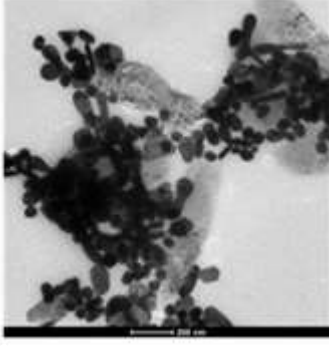
Şekil 10. Altın nanoparçacık sentezinin kalorimetrik olarak tespiti (Sayılar eklenen sitratın hacmini göstermektedir)

Distile su içinde 197 ppm konsantrasyonunda üretilen altın nanoparçacıklarının konsantrasyonları DMEM hücre kültür vasatı yardımıyla seyreltilerek sitotoksosite deneyleri için istenilen değerlere (5, 10, 20 ppm) inilmiştir. Nanoaltın parçacıklarının distile su içindeki stabiliteyi yüksektir ancak uzun zaman bekletildikleri zaman çökeltiler ve topaklanmalar oluşmaktadır. Bu problemin önüne geçebilmek için altın nanoparçacıklarının deneylerden önce yeni olarak hazırlanması veya uzun süre bekletildiklerinde belirli zaman aralıklarıyla sonikasyon ve vorteksleme işlemine tutulmaları gerektiği görülmüştür. Özellikle büyük boyuttaki altın parçacıklarının daha çabuk çökelti ve topaklanma oluşturduğu ve bu parçacıkların birbirinden ayrılmasının biraz daha zor olduğu gözlemlenmiştir. S1 grubundan S4 grubuna doğru giderken (eklenen sitrat miktarı arttıkça) belirgin bir boyut farklılaşması (55.18 ± 8.41 nm- 12.02 ± 1.19 nm) görülmektedir. Ancak S3 ve S4 grupları arasında belirgin bir fark (13.40 ± 1.13 nm- 12.02 ± 1.19 nm) yoktur (Şekil 11). S1 ve S2 gruplarında altın nanoparçacıklarının boyut dağılımı düzgün olmamasına karşın, S3 ve S4 gruplarında daha düzgün dağılım elde edilmiştir.



Şekil 11. Altın nanoparçacıkların CTM mikrografileri A)1 ml sitrat eklenmiş, B)2 ml sitrat eklenmiş, C) 3 ml sitrat eklenmiş, D) 4 ml sitrat eklenmiş

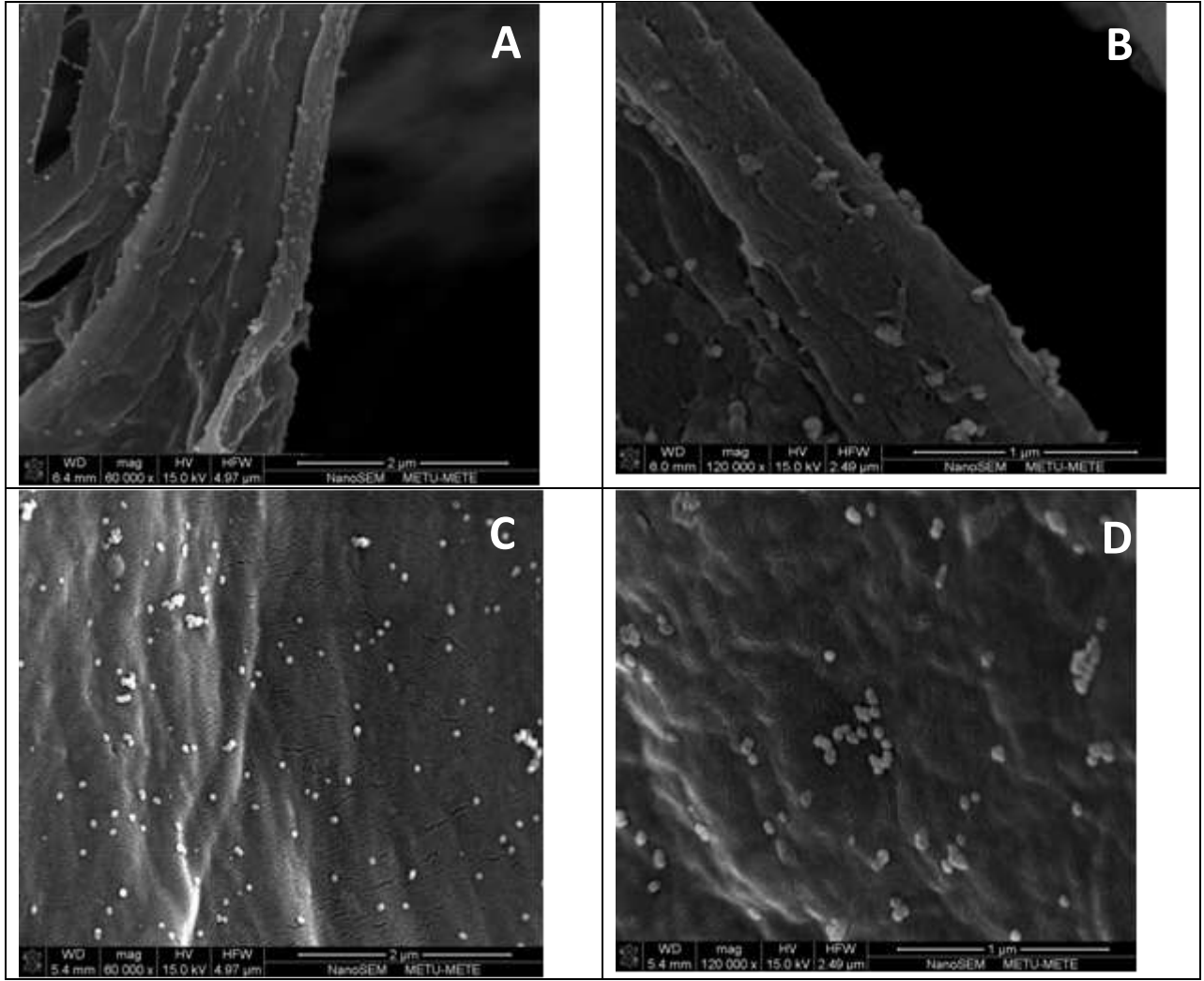
Ayrıca S1 grubunda küre dışında farklı şekillerde parçacıklar (piramit, çubuk, veya rastgele köşeli parçacıklar) olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 12). S1 den S4 e doğru giderken parçacıklar daha çok küre şeklini almaktadır. Bütün bu bulgular ele alındığında S1 grubunda elde edilen nano-altının özelliklerinde istenilen düzeyde kontrol sağlanamadığı düşünülmektedir.



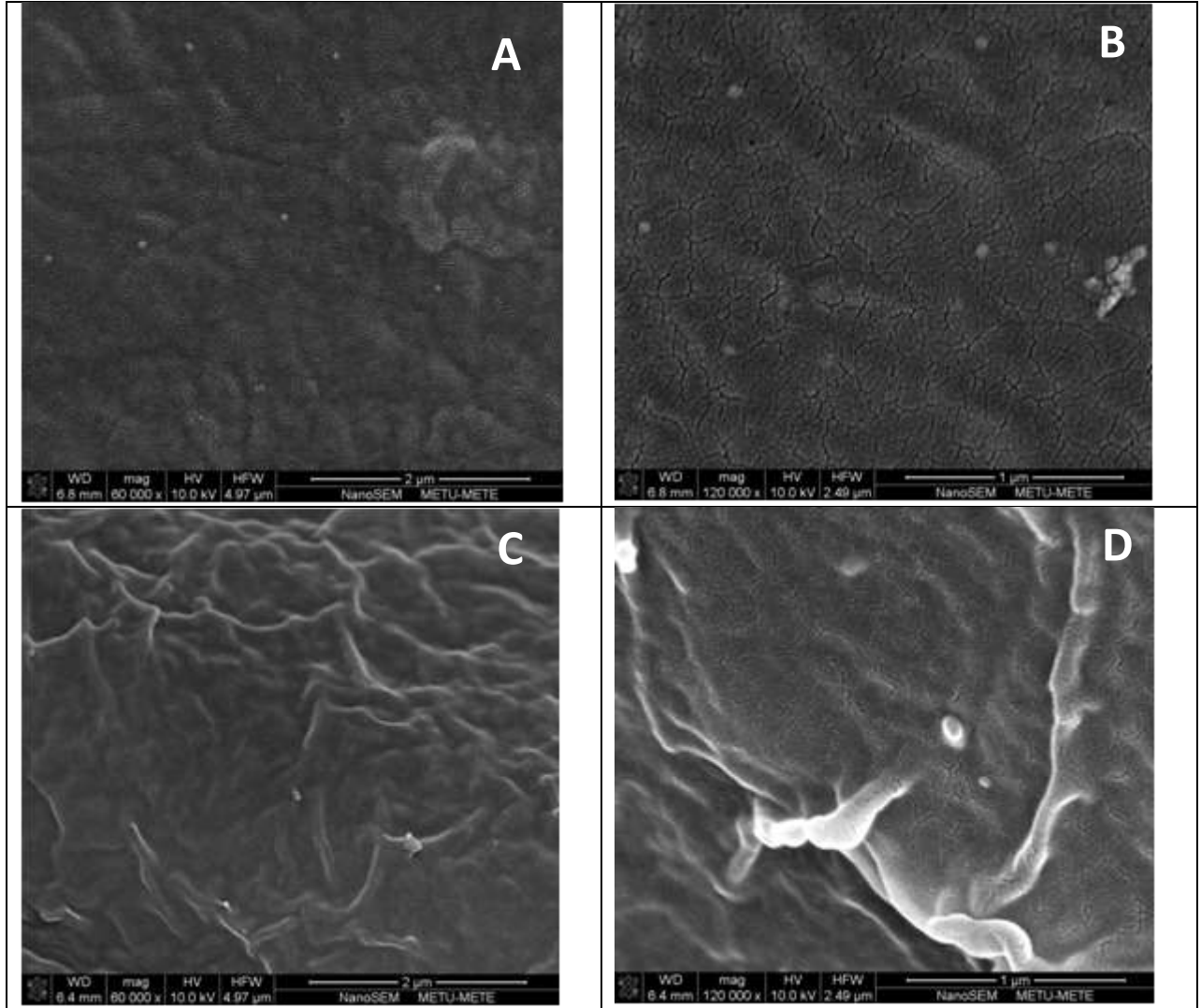
Şekil 12. Altın nanoparçacıkların (S1 grubu) CTEM mikrografisi

1.4. Altın Nanoparçacıklarının İskelelere Yüklenmesi

Belirli konsantrasyonlarda altın içeren çözeltilere iskelelerin batırılması sonucu elde edilen altın dağılımı düzgündür (Şekil 13). Özellikle çapraz bağlanan (Şekil 13 C,D) örneklerdeki nanoaltınlar daha belirgin bir şekilde görülmektedir. Buna karşın çözeltilere nanoaltınların eklenmesi sonucu elde edilen nanoaltın dağılımı net bir şekilde görülmemektedir (Şekil 14). Nanoaltın parçacıklarının sadece kollajen köpüğün yüzeyine yakın yerlerde olanları görülmektedir. Parçacıklarının büyük bölümünün köpüğün derinlerinde olduğu düşünülmektedir.



Şekil 13. Altın nanoparçacık yüklenmiş (batırma yolu ile) iskelelerin (A, B çapraz bağlanmamış) ve (C, D çapraz bağlanmış) SEM resimleri



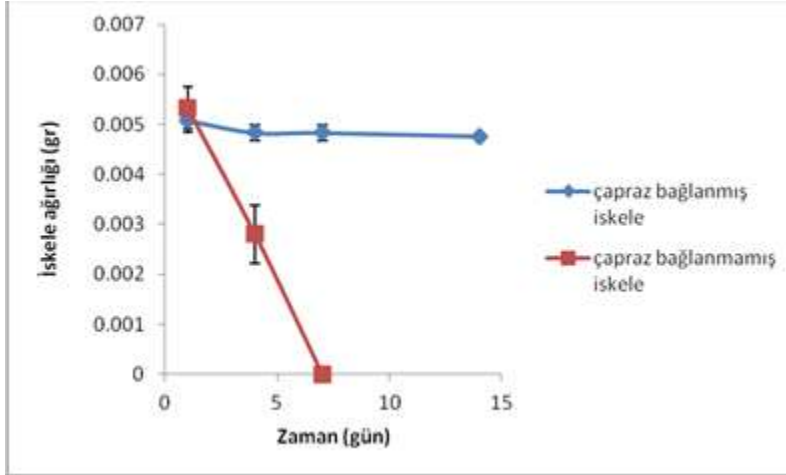
Şekil 14. Altın nanoparçacık yüklenmiş (çözelti hazırlama sırasında eklenmiş) iskelelerin (A, B çapraz bağlanmamış) ve (C, D çapraz bağlanmış) SEM resimleri

1.5. İskelelerin In vitro Karakterizasyonu ile İlgili Bulgular

1.5.1. Hidrolitik Bozunum Testleri

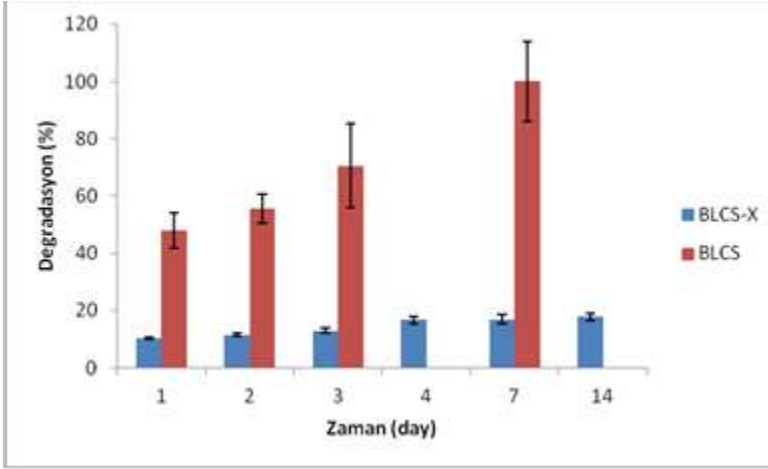
Kollajen köpük ve serisin/kollajen filmlerden hazırlanan iki katmanlı iskelelerin distile su içindeki dayanıklılıkları yüksektir. Bununla ilgili ön testler gerçekleştirilmiştir. BCA analizi ve gravimetrik metot kullanılarak yapılan deney sonuçlarına göre çapraz bağlanmamış grupların (BLCS) 37 °C degradasyonu 1 hafta sürmüştür. Çapraz bağlanan gruplar (BLCS-X) ise gravimetrik analize göre suda neredeyse hiç

çözünmemektedirler (Şekil 15 ve 16). BCA sonuçları ve gravimetrik analizler büyük oranda birbirleriyle örtüşmektedirler.



Şekil 15. İki katmanlı iskelelerin distile su içinde hidrolitik bozunumlarının gravimetrik analizi

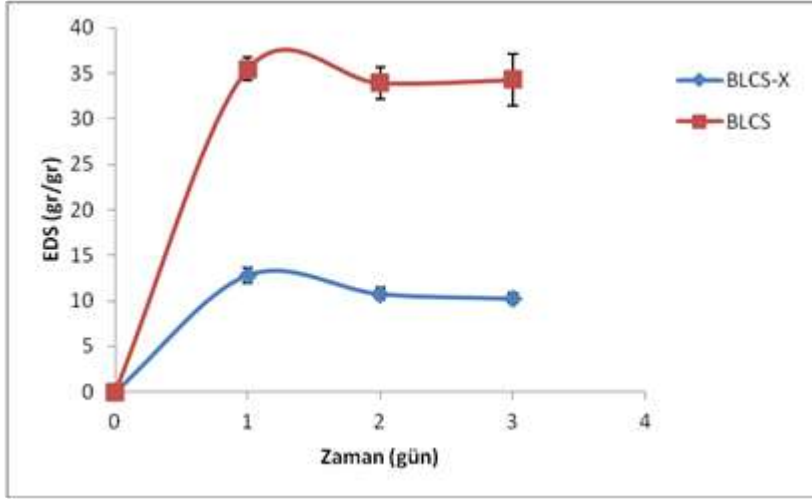
Hazırlanan örneklerin sulu ortamlarda 3 boyutlu yapılarını korudukları görülmüştür. Ancak BLCS örneklerin, 37 °C de 1 gün bekledikten sonra kontraksiyona (büzüşme) uğradıkları, BLCS-X'de ise 3 boyutlu yapının büyük oranda korunduğu gözlenmiştir. Gerçekleştirilen hidrolitik degradasyon testlerinin sonuçları da (Şekil 15) bu gözlemler ile uyumludur. BCA sonuçlarına göre (Şekil 16), 7 gün sonunda çapraz bağlanmayan iskeleler %100 oranında degradasyona uğramışlardır, çapraz bağlananlar ise 14 gün sonunda bile çok az degrade (17.88 ± 1.32) olmuşlardır. Çapraz bağlamayla birlikte yapının bütünlüğünün korunması amacına ulaşılmıştır. Benzer çalışmalarda da glutaraldehitte çapraz bağlanan kollajenden yapılmış iskelelerin bütünlüğünü büyük oranda koruduğu gösterilmiştir (WİTTAYAAREEKUL, 2006; CHARULATHA, 2003).



Şekil 16. İki katmanlı iskelelerin distile su içinde hidrolitik bozunumlarının BCA analizi

1.5.2. Su Tutma Deneyleri

İskelelerin su tutma analiz (EDS) sonuçlarına göre (Şekil 17), hem BLCS-X hem de BLCS örnekler 1.gün sonunda maksimuma ulaşmıştır. Ancak aynı ortamda bekletilmeye devam edilerek su tutma düzeyinde dengeye ulaşmalarının 2-3. günde olduğu görülmüştür. Bu süre sonundaki dengede su tutma değerleri BLCS-X için 34.28 ± 2.84 (gr/gr), BLCS için ise 10.26 ± 0.54 (gr/gr) olarak hesaplanmıştır. İskeleleri çapraz bağlamanın, su tutma değerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmüştür. Bu sonucun, suyun çapraz bağlanan gruplarda yapı içinde hapsedilmesi, çapraz bağlamayanlarda ise iskelenin sudan çıkarılmasıyla suyun kolaylıkla dışarı bırakılmasıyla alakalı olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, ön testlerde gözlemlenen BLCS iskelelerin sulu ortamlarda $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 gün bekletildiği durumlarda belirgin bir büzüşmeye uğraması ve kollajenin BLCS-X'e kıyasla hızlı bir şekilde bozunmasının da bu duruma yol açmış olabileceği düşünülmektedir.

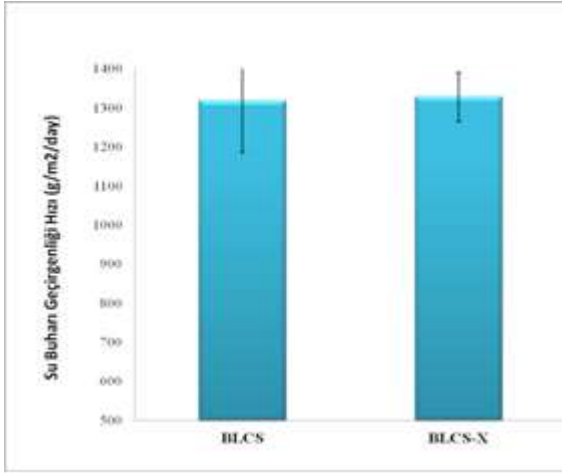


Şekil 17. İki katmanlı iskelelerin dengedeki su ile şişme (EDS) analizi. 1, 2, ve 4. günlerde gruplar arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p < 0.05$).

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak iskeleler için optimum bir değer (80 gr/gr) belirtilmiştir (MA, 2003). Ancak literatürdeki çalışmalarda elde edilen EDS değerleri arasında büyük farklar bulunmaktadır ve bunların neredeyse hiçbiri bu değere ulaşamamıştır. Üretilen liyofilize kitosan-kollajen iskeleler (MA, 2003) bu EDS değerindedir ve iskeleler çapraz bağladığında bu EDS değerlerinin ikiye katlandığı (80 g/g dan 160 g/g değerine arttığı) görülmüştür. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde çapraz bağlanan iskelelerin EDS değeri yaklaşık 3 katına çıkmıştır. Yapılan bir araştırmada (CHEN, 2007) tarafından üretilen kollajen/kitosan nanofiberli iskelelerin EDS değeri 9 (g/g) olarak bulunmuştur. Jelatin ve aljinattan oluşan köpüklerin EDS değeri 26-35 (g/g) aralığındadır (CHOI, 1999). GTA ile çapraz bağlanmış kitosan yara örtüleri (ADEKOGBE, 2005) için bu değer (29,9-31, g/g) projede araştırılan doku iskelelerinin EDS değeri ($34,28 \pm 2.84$ gr/gr) ile çok benzerdir. Bütün bu çalışmalar değerlendirildiğinde, hazırlanan iki katmanlı deri eşleniklerinin EDS değerinin deri doku mühendisliği için uygun olduğu düşünülmektedir.

1.5.3. Su Buharı Geçirgenliği Hızı

BLCS ve BLCS-X'in su buharı geçirgenliği hızları arasında (1318.14 ± 131.81 ve 1327.72 ± 63.04) anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 18).



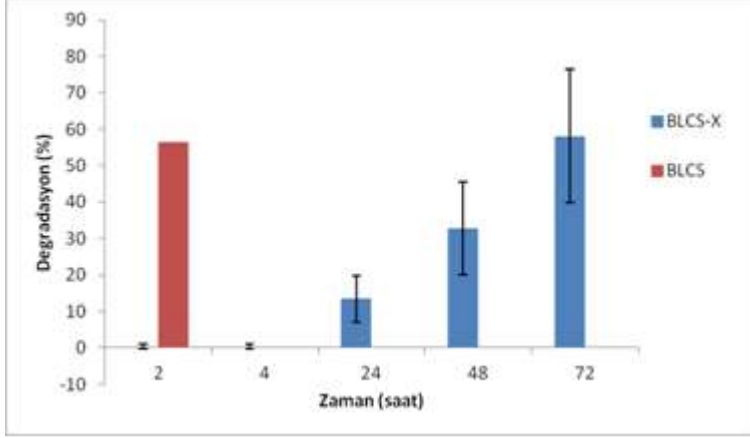
Şekil 18. Çapraz bağlanmamış (BLCS) ve çapraz bağlanmış (BLCS-X) iki katmanlı iskelelerin su buharı geçirgenliklerinin kıyaslaması

Yaranın çabuk iyileşebilmesi için nemli bir ortam gerekmektedir, ama aynı zamanda enfeksiyon riskinin azaltılması için yara yatağının altında irinli sıvının (exudate) birikmesi de önlenmelidir. Diğer yandan yara dehidrasyonu, hücrelerin ölmesine ve kabuklu yara oluşmasına neden olur. Bu sebeple, yaradan optimum bir hızda su buharlaşmasını kontrollü bir şekilde sağlayan bir deri eşleniğine ihtiyaç vardır. Normal deri için hız; günlük 204 g/m^2 iken, yaralı deride bu hız birinci derece yanıkları için 279 g/m^2 /gün 'den granüle yaralar için 5138 g/m^2 /gün değerlerine çıkmaktadır. Su buharı geçirgenliği hızı yaranın türüne göre değiştiğinden, bu çalışmada iki katmanlı deri eşlenikleri için ölçülen değerlerin (1300 g/m^2 /gün) düşük-orta egzüde yaralar için uygun olduğu söylenebilir (MI, 2001; YANNAS, 1980).

1.5.4. Enzimatik Bozunum Testleri

Kollajenaz tip I enzimi kullanılarak yapılan in vitro degradasyon sonuçlarına göre BLCS 2 saat sonunda, BLCS-X ise 3 gün sonunda parçalanmışlardır (Şekil 19). İki katmanlı iskelelerde öncelikle köpük kısmı bozunmakta, film kısmı ise nispeten daha çok dayanmaktadır. BLCS-X grupların ilk 4 saat içinde neredeyse hiç bozunmamış olduğu, ancak 1 gün sonunda bozunma hızlarının arttığı görülmüştür. İnkübasyon sıvısı içinde iskele parçacıkları olmasına karşın örneklerin yapısal bütünlüğünün bozulması nedeniyle testler sonlandırılmıştır. Bu sebeplerle, testlerin sonlandırıldığı zamanlardaki degradasyon değerlerinin % 100 olmadığı bilinmektedir. Bu analizde bozunum sonuçlarının malzeme özelliği yanısıra kullanılan kollajenaz

enzimi konsantrasyonun da bir fonksiyonu olduğu bilinmektedir. Doğal dokuda bu konsantrasyonun doku hasar düzeyi veya dokuya özgün olarak değişebileceği, dolayısıyla daha yavaş veya hızlı bozunum sonuçları alınabileceği düşünülmektedir.



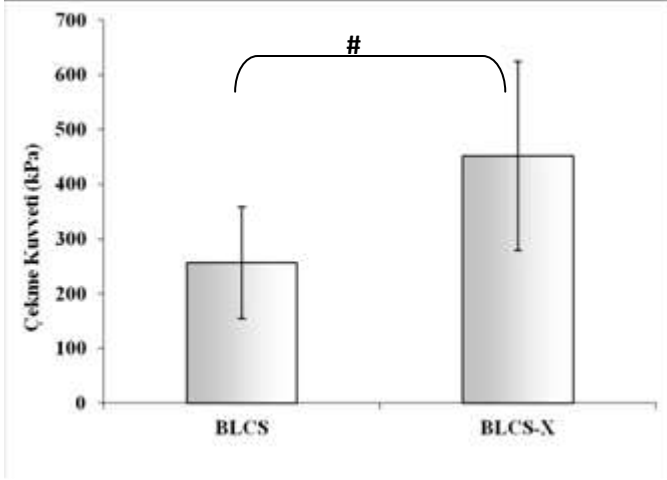
Şekil 19. İki katmanlı iskelelerin in vitro-enzimatik bozunumunun BCA yöntemi ile analizi

İyi bir deri iskelesi için 25 günlük bir biyobozunum zamanı tavsiye edilmektedir. Birkaç gün içinde yapısal bütünlüğünü tamamen kaybeden iskeleler deri doku mühendisliği için uygun olmayacaktır. Diğer yandan, 3-4 hafta boyunca bile sadece minimal olarak bozunum gösteren iskeleler yara iyileşmesini ve yeni deri oluşumunu hızlandıracaktır (YANNAS, 1980). Projede in vitro biyobozunum sonuçlarına göre BLCS-X iskelelerinin 3 gün içinde tamamen degrade olması, kullanılan kollajenazın konsantrasyonunun oldukça yüksek olmasıyla açıklanabilir. Normal yaralı deride bu kadar yıkıcı bir koşul olmayabileceği de düşünülmektedir. Ayrıca in vivo koşullarda kollajenaz ve diğer enzimlerle bir yandan iskeleler yıkılırken aynı zamanda yeni doku oluşumu da beklenmektedir. Dolayısıyla, projede gösterilen biyodegradasyon değerlerinin in vivo ortamda olumlu sonuçlar verebileceği düşünülmektedir. Bu deneydeki asıl amaç çapraz bağlama işleminin kollajenaz degradasyonunu ne kadar azalttığının gözlemlenmesidir. GTA ile çapraz bağlanmış kollajen matrislerin kollajenaz enzimi ile bozunumuna karşı belirgin bir şekilde dirençlerinin arttığı başka çalışmalarda da bildirilmiştir (CHARULATHA, 2003).

1.5.5. Biyomekanik Testler

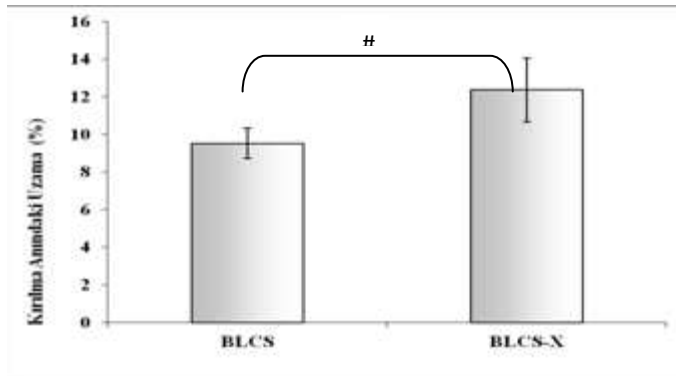
Mekanik testlere göre çapraz bağlama işlemi iskelelerin hem çekme dayanımını (Şekil 20) hem de kırılma anındaki uzama oranlarını (Şekil 21) istatistiksel açıdan anlamlı bir biçimde arttırmıştır. Örneklerin elastik modülüsleri arasında (Şekil 22) anlamlı bir fark bulunamamıştır. BLCS-X'in ortalama çekme

dayanımı 451.58 ± 172.19 kPa, BLCS'in ki ise 256.18 ± 102.17 kPa'dır. BLCS-X'in kırılma anındaki uzaması $\% 12.36 \pm 1.69$, BLCS'in ki ise $\% 9.52 \pm 0.80$ dir. Çapraz bağlı ve çapraz bağlı olmayan örneklerin elastik modülüsleri 3.5-4 MPa arasında değişmektedir.



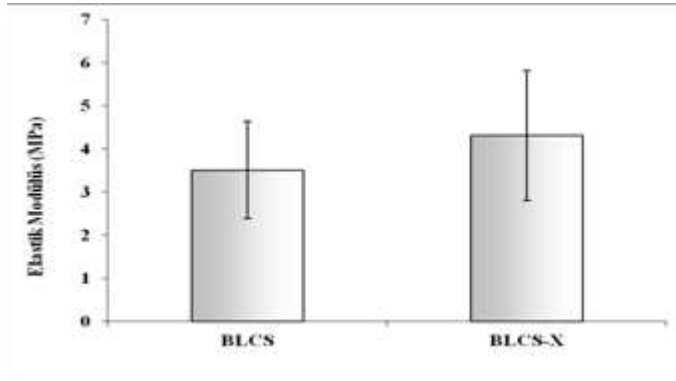
Şekil 20. Çapraz bağlı olmayan (BLCS) ve çapraz bağlı (BLCS-X) iskelelerin çekme dayanımları #: Gruplar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p < 0.05$

Projede üretilen doku iskelelerinin çekme dayanımı, derinin çekme dayanımı (7.6 MPa) değerine göre daha düşüktür. Ayrıca literatürdeki diğer çalışmalardaki çekme dayanımı değerleri genel olarak yüksektir. Antibiyotik yüklenmiş kollajen-hyaluronik asit matikslerinin çekme dayanımı değerleri 10-30 MPa arasındadır (PARK, 2004). Bir çalışmada (RHO, 2006) üretilen nanofiberli kollajen matikslerin çekme dayanımı değerleri 11.44 ± 1.20 MPa dir.



Şekil 21. Çapraz bağlı olmayan (BLCS) ve çapraz bağlı (BLCS-X) iskelelerin kırılma anındaki uzamaları. #: Gruplar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p < 0.05$

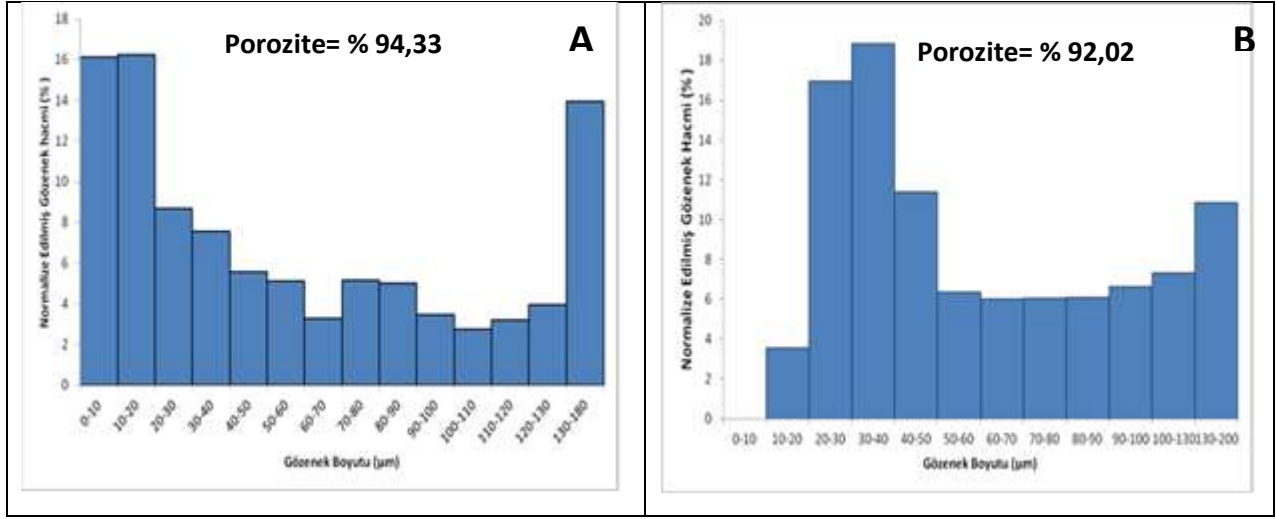
Kollajen için bildirilen maksimum uzama miktarı % 10-20 civarındadır (MEYERS, 2008). Bu değer projede elde ettiğimiz sonuçlarla örtüşmektedir. Deneyle kuru örneklerle ve kuru ortamda gerçekleşmiştir. Ancak çapraz bağlanan grupların sıvı içinde dayanıklılığı çok yüksek olduğundan, eğer su çekmiş iskelelerin mekanik özellikleri analiz edilirse deney sonuçları özellikle kırılma anındaki uzama oranları açısından daha olumlu sonuçlar verecektir. Yaralı bölgenin genellikle nemli olduğu düşünüldüğünde, in vivo koşullarda, üretilen iskelelerin nemlenmesi ve daha çok esneme özelliğine sahip olması beklenmektedir. Islatılmış ya da nemlendirilmiş iskelelerin daha çok uzama oranına sahip olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (ADEKOGBE, 2005; WANG, 2003). Deri için elastik modülüs değeri 6-40 MPa arasındadır (SILVER, 1987). Projede üretilen deri iskelelerin elastik modülüsü derinin alt sınırına yakındır.



Şekil 22. Çapraz bağlı olmayan (BLCS) ve çapraz bağlı (BLCS-X) iskelelerin elastik modülüsü

1.5.6. Gözeneklilik Ölçüm Sonuçları

Gözeneklilik ölçümlerine göre çapraz bağlama işlemi sonrasında örneklerin gözenekliliği bir miktar düşmüştür (Şekil 23). Çapraz bağlı olmayanlar için gözeneklilik % 94,33 iken (Şekil 23 A), çapraz bağlı olanlar için % 92,02'dir (Şekil 23 B). Çapraz bağlama işleminin gözenekliliği büyük miktarda düşürücü bir etkisi olduğu görülmemiştir. Gözenek boyut dağılımı histogram grafiklerine göre, çapraz bağlama sonrasında en küçük gözenekler (0-10 µm) tamamen, 10-20 µm arasındaki gözenekler de büyük miktarda kapanmıştır.

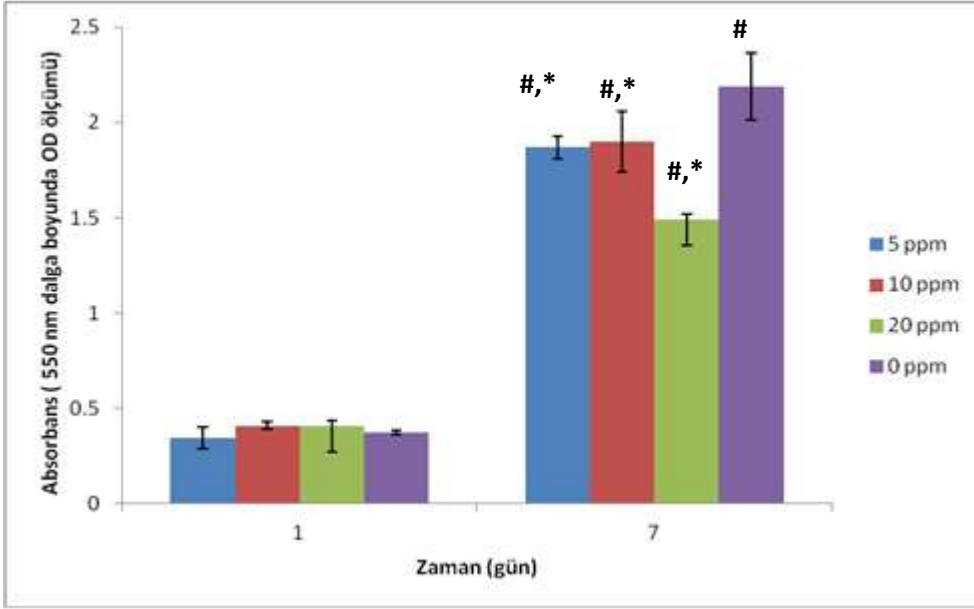


Şekil 23. İskelelerin A) çapraz bağlı olmayan, B) çapraz bağlı olanların gözenek boyut dağılımı

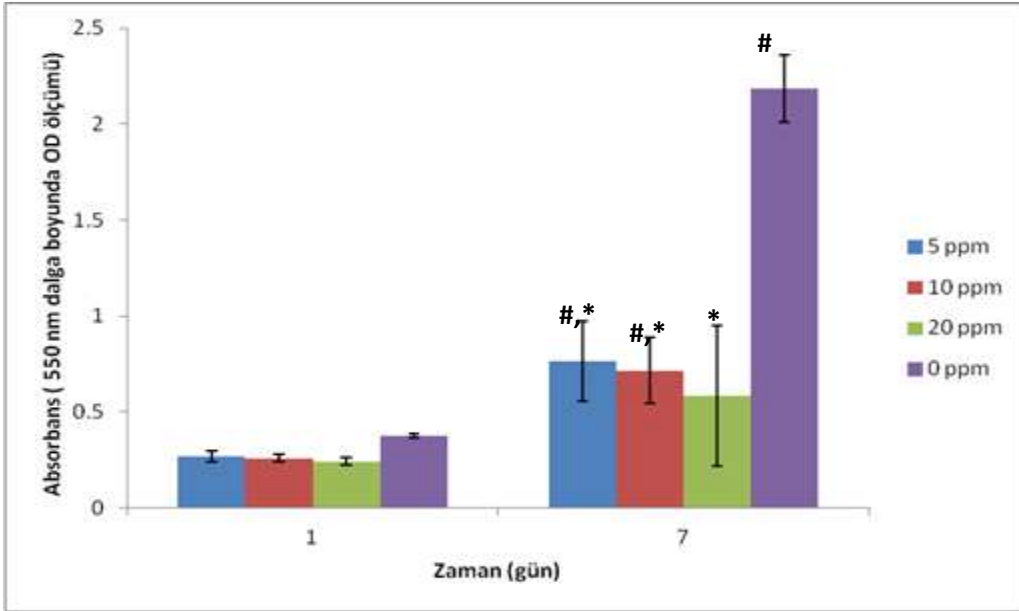
1.6. Nanoaltın In vitro Biyouyumluluk Testleri ile İlgili Bulgular

1.6.1. Altın Nanoparçacıklarının Keratinositler Üstündeki Sitotoksik Etkisi

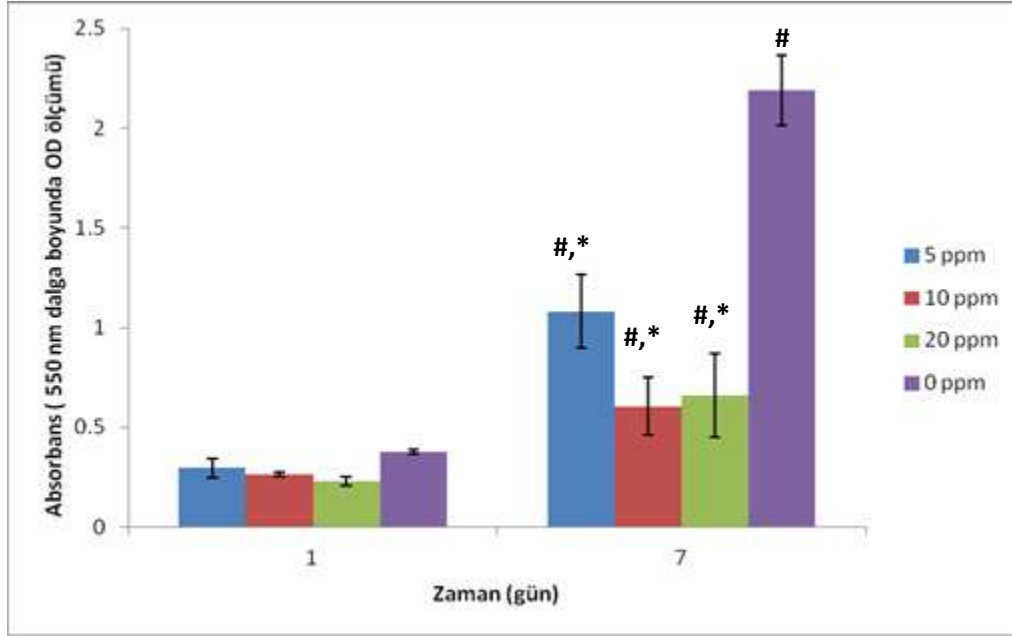
Sitotoksisite deneylerinde farklı boyutlarda üretilen altın nanoparçacıkları-S1 (50 nm), S2 (20 nm) ve S3 (13 nm)- için değişik konsantrasyonlarda (5, 10, 20 ppm) keratinosit hücrelerinde sitotoksisite testleri yapılmıştır (Şekil 24-26). 1 günlük sonuçlara göre; S1, S2 ve S3 gruplarının farklı konsantrasyonlarında elde edilen absorbans değerleriyle kontrol grubu (0 ppm) arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu sonuç, bu boyutlarda üretilen altın nanoparçacıklarının 5-20 ppm konsantrasyonlarında keratinositler üstünde sitotoksik bir etkisi olmadığını göstermektedir. Ancak, 7 günlük inkübasyon sonrasındaki test sonuçlarına göre, her ne kadar bütün gruplarda hücreler 7 günlük zaman içinde anlamlı bir şekilde çoğalmışlarsa da bu değerler ile kontrol grubu (0 ppm) arasında istatistiksel anlamlı fark ($p < 0.05$) bulunmuştur (Şekil 24-26). Bu sebeple altın nanoparçacıklarının uzun zamanlarda hücre sayısının artışına olumlu etkisinin olmayabileceği düşünülmüştür. Bütün bunlar birlikte değerlendirildiğinde altın nanoparçacıkların bu hücre tipinin çoğalma hızını yavaşlattığı ancak özellikle S1 grubundaki düşük konsantrasyonların (5 ve 10 ppm) sitotoksik olmadığı düşünülmektedir S1 grubu 1. gün kontrolün % 91-108 değerindedir, S2 (% 64-70) ve S3 grupları (%60-78) ise bundan daha düşük değerdedirler. 7. günde S1 grubunun kontrole (altın eklenmemiş hücrelere) oranı bir miktar azalmıştır (% 68-85). S1 grubunun düşük konsantrasyonlarda ise bu oran (% 85-86) daha yüksektir. S2 ve S3 gruplarının kontrole göre oranları (% 26-34, % 30-49) ise çok düşmüştür.



Şekil 24. Altın nanoparçacıklarının (S1 grubu) keratinositler üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi #: Aynı konsantrasyonda farklı zamanlar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. *: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p < 0.05$.



Şekil 25. Altın nanoparçacıklarının (S2 grubu) keratinositler üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi #: Aynı konsantrasyonda farklı zamanlar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. *: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p < 0.05$.

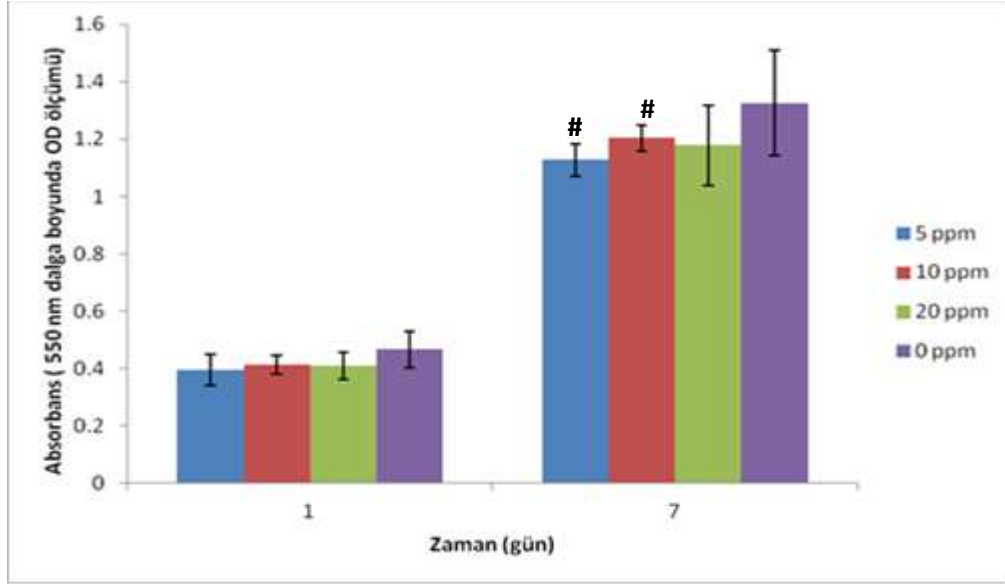


Şekil 26. Altın nanoparçacıklarının (S3 grubu) keratinositler üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi. #: Aynı konsantrasyonda farklı zamanlar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. *: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir p<0.05.

1.6.2. Altın Nanoparçacıklarının 3T3 Fibroblastlar Üstündeki Sitotoksik Etkisi

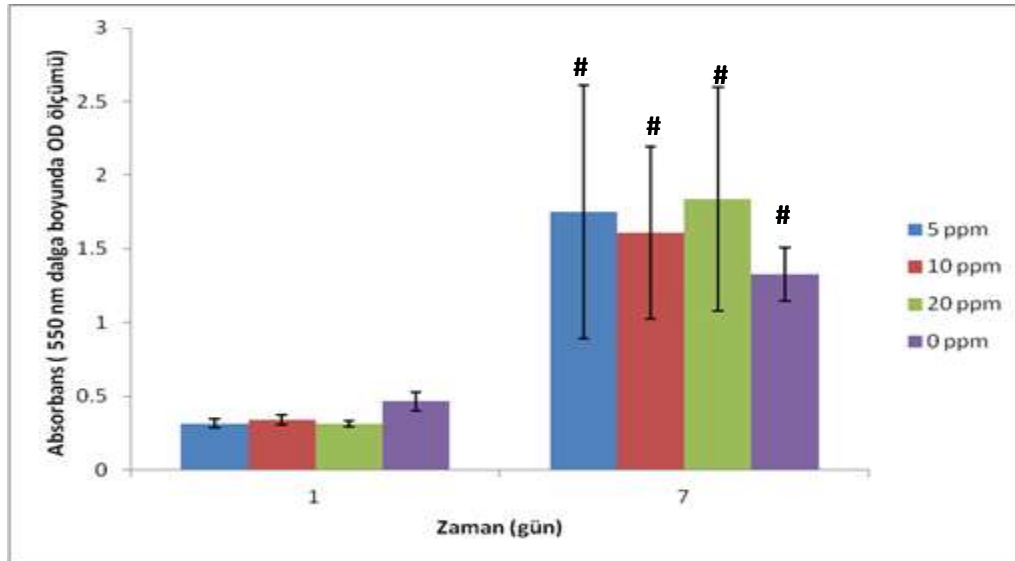
S1 (50 nm), S2 (20 nm) ve S3 (13 nm) farklı boyuttaki nanoaltın gruplarının farklı konsantrasyonları (5, 10, 20 ppm) üstünde yapılan sitotoksisite test sonuçları gösterilmiştir (Şekil 27, 28, 29). 1. gün sonuçlarına göre; S1, S2 ve S3 gruplarının farklı konsantrasyonlarında elde edilen absorbans değerleri ile kontrol gruplarıyla elde edilen değerler arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu sonuç, bu boyutlarda üretilen altın nanoparçacıklarının 5-20 ppm konsantrasyonlarında 3T3 fibroblast hücreleri üstünde sitotoksik bir etkisi olmadığını göstermektedir. Ayrıca, uzun süre inkübasyon sonrasında (7 gün) bu gruplardaki altın nanoparçacıklarının fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksisitesi de araştırılmıştır (Şekil 26, 27, 28). Bu sonuçlara göre, hücreler bütün gruplarda (S3 grubundaki 20 ppm değeri hariç) istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde çoğalmışlardır. S1 grubu 1.gün kontrolün % 84-88 değerindedir, S2 (% 67-72) ve S3 grupları (% 61-73) ise bundan daha düşük değerdedirler. 7. günde S1 grubunun kontrole oranı yaklaşık olarak 1. gündeki değerindedir (% 85-90). S2 ve S3 gruplarının kontrole göre oranları (% 121-138, % 50-

97) ise belirgin bir biçimde artmıştır. Sadece S3 grubundaki yüksek altın konsantrasyonunda belirgin bir düşüş olmuştur (%50). Bu sebeplerle bütün grupların 5 ve 10 ppm altın konsantrasyonlarının sitotoksik etkiye sebep olmadan kullanılabilceği düşünülmüştür.



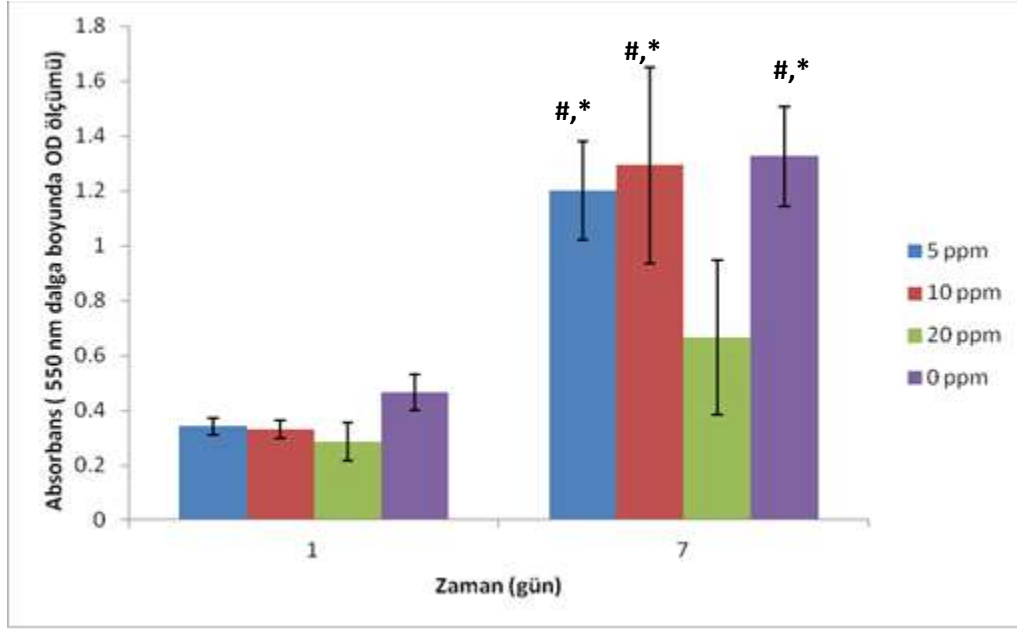
Şekil 27. Altın nanoparçacıklarının (S1 grubu) 3T3 fibroblastlar üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi.

#: Aynı konsantrasyonda farklı zamanlar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p < 0.05$



Şekil 28. Altın nanoparçacıklarının (S2 grubu) 3T3 fibroblastlar üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi.

#: Aynı konsantrasyonda farklı zamanlar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p < 0.05$.



Şekil 29. Altın nanoparçacıklarının (S3 grubu) 3T3 fibroblastlar üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi. #: Aynı konsantrasyonda farklı zamanlar arasında arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. *: Aynı zaman içinde 20 ppm grubu ile arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p < 0.05$.

Aşama 2. İki Katmanlı Doku İskelelerinin Üretilmesi (BECM) ve Optimizasyonu ile İlgili Bulgular

2.1. Nanofiberli Matriks Hazırlanması

Yapılan elektro-eğirme denemelerine göre sadece kollajen ve iletkenliği artırıcı olarak tuz ya da altın nanoparçacıkları içeren çözeltiler ile nanofiberli yapılar oluşmamıştır (Tablo 4). Buna göre düşük konsantrasyonlardaki (% 1- 2) kollajenin 0.5 M asetik asitte çözünmesiyle nanofiberler oluşturmanın kolay olmadığı düşünülmüştür. Kollajenin başarılı bir şekilde elektro-eğrilebilmesi için ona yardımcı bir polimerin katılması gereklidir. Bu çalışmada 0.5 M asetik asitte iyi bir şekilde çözünen PEO kullanılmıştır. Ancak sadece kollajen ve PEO karışımlarından elde edilen nanofiberli matrikslerde çok sayıda damla bulunmaktadır. Bu sebeple bütün karışımlara iletkenliği arttırmak amacıyla tuz ya da altın nanoparçacıkları ilave edilmiştir. Tuz eklenen gruplarda fiberli yapılar oluştuğu gözlemlenmiştir. Ancak aynı zamanda bu şekilde oluşturulan nanofiberli matrikslerde gözle görülür küçük damlacıklar oluşmuştur. 40 mM tuz katılmış hiçbir grupta istenilen nitelikte matriks (toplayıcı ekrandan düzgün ve sağlam bir şekilde çıkarılabilen) elde edilememiştir. Farklı miktarlarda (10 ve 100 µl) altın nanoparçacıkları katılan gruplarda ise çok başarılı bir şekilde nanofiberli matriksler elde edilmiştir. Projenin ilk bölümünde tespit edildiği gibi tekrar en başarılı matriksler % 2.5 PEO içeren gruplarda elde edilmiştir. Kollajenin miktarını %1 den 2'ye arttırmak ise viskoziteyi belirgin bir şekilde arttırdığından, viskozitenin çok fazla artması elektro-eğirme sırasında şırınganın ucundan düzgün ve sürekli bir fiber akışı çıkmasını engellemektedir. Bu sebeple kollajenin elektro-eğirme için en uygun konsantrasyonu % 1 olarak seçilmiştir. Ayrıca kollajen çözeltilerine eklenen nanoaltının miktarının artması nanofiber boyut dağılımını olumlu bir şekilde etkilemektedir. Bütün bu sonuçlar Tablo 4'de özetlenmiştir.

Tablo 5. Oluşturulan gruplarla elde edilen nanofiberlerin özellikleri

Gruplar *	Toplama ekranında oluşan yapının özellikleri	Ortalama fiber çapı (nm)	Kullanılan çözeltinin özellikleri
C1t	Fiberli yapı oluşmadı	-	Viskozitesi düşüktür. Çözelti şeffaftır.
C2t	Fiberli yapı oluşmadı	-	Viskozitesi C1t'ye göre yüksektir. Çözelti şeffaftır.
S1t	Fiberli yapı oluştu. Ancak çok fazla	-	Viskozitesi elektro-eğirme için

	damla da oluştu.		uygun. Çözelti şeffaftır.
S2t	Fiberli yapı oluştu. Ancak çok fazla damla da oluştu (S1t'ye gore daha az).	-	Viskozitesi S1t'ye gore yüksektir. Çözelti şeffaftır.
S3t	Fiberli yapı oluştu. Ancak çok fazla damla da oluştu (S2t 'ye gore daha az)	-	Viskozitesi S2t 'ye gore daha yüksektir. Çözelti şeffaftır.
S4t	Düzgün bir fiber akışı sağlanamadı. Çok fazla sıvı damlaları var.	-	Viskozitesi çok yüksektir. Çözelti şeffaftır.
S5t	Düzgün bir fiber akışı sağlanamadı. Çok fazla sıvı damlaları var.	-	Viskozitesi çok yüksektir. Çözelti şeffaftır.
S6t	Düzgün bir fiber akışı sağlanamadı. Çok fazla sıvı damlaları var.	-	Viskozitesi çok yüksektir. Çözelti şeffaftır.
C1a	Sadece sıvı damlaları	-	Viskozitesi çok düşüktür. Çözelti şeffaftır.
C2a	Sadece sıvı damlaları	-	Viskozitesi çok düşüktür. (C1a'ya gore daha yüksek). Çözelti şeffaftır.
S1a	Fiberli bir yapı. Gözle görölür bir damla yok.	283.8 ± 25.9	Viskozitesi elektro-eğirme için uygun. Çözelti şeffaftır.
S2a	Fiberli bir yapı. Gözle görölür bir damla yok.	205.2 ± 36.8	Viskozitesi elektro-eğirme için uygun. Çözelti şeffaftır.
S3a	Fiberli bir yapı. Gözle görölür bir damla yok.	235.0 ± 50.1	Viskozitesi elektro-eğirme için uygun. Çözelti şeffaftır.
S4a	Fiberli bir yapı. Gözle görölür bir damla yok.	201.3 ± 31.9	Viskozitesi elektro-eğirme için uygun. Çözelti şeffaftır.

* Grupların iğerdiği polimerler ve oranları Tablo 2'de verilmiştir.

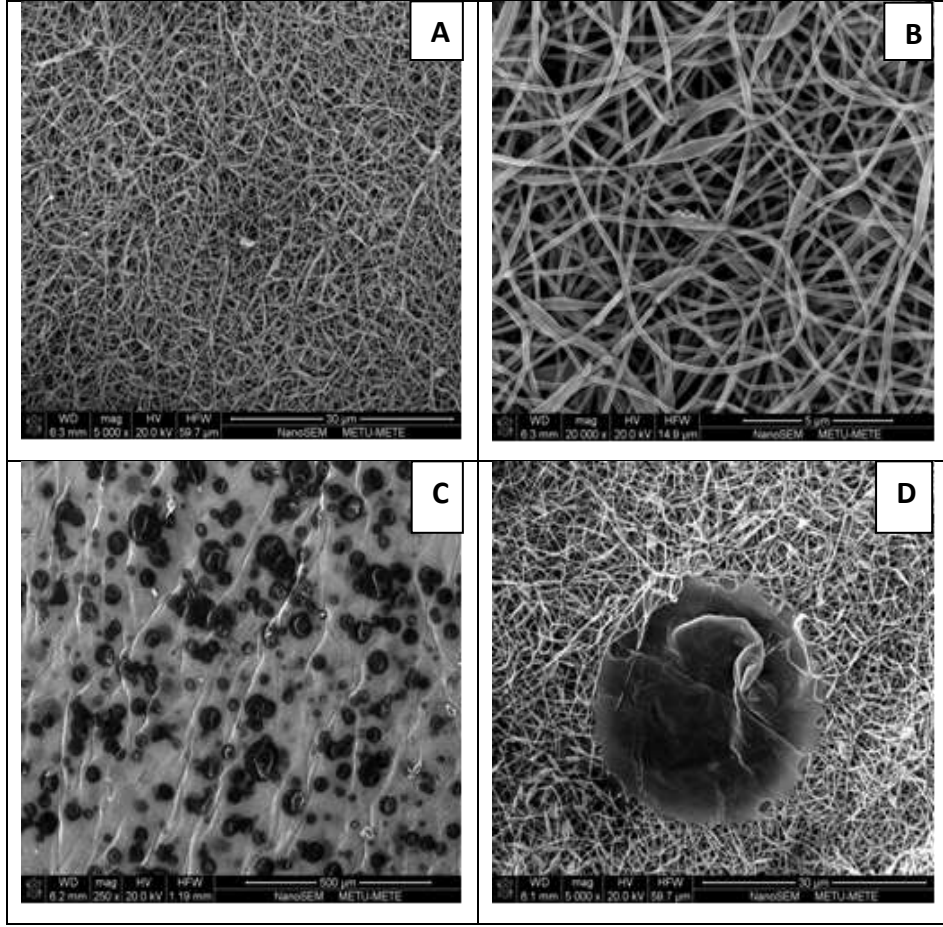
Genel olarak çözeltilerde bulunan altın miktarının artmasıyla nanofiber çapının küçölüdüğü de gözlenmektedir (Tablo 5).

Tablo 6. Çözeltilere altın nanoparçacıkları eklenmesiyle elde edilen nanofiberlerin özellikleri

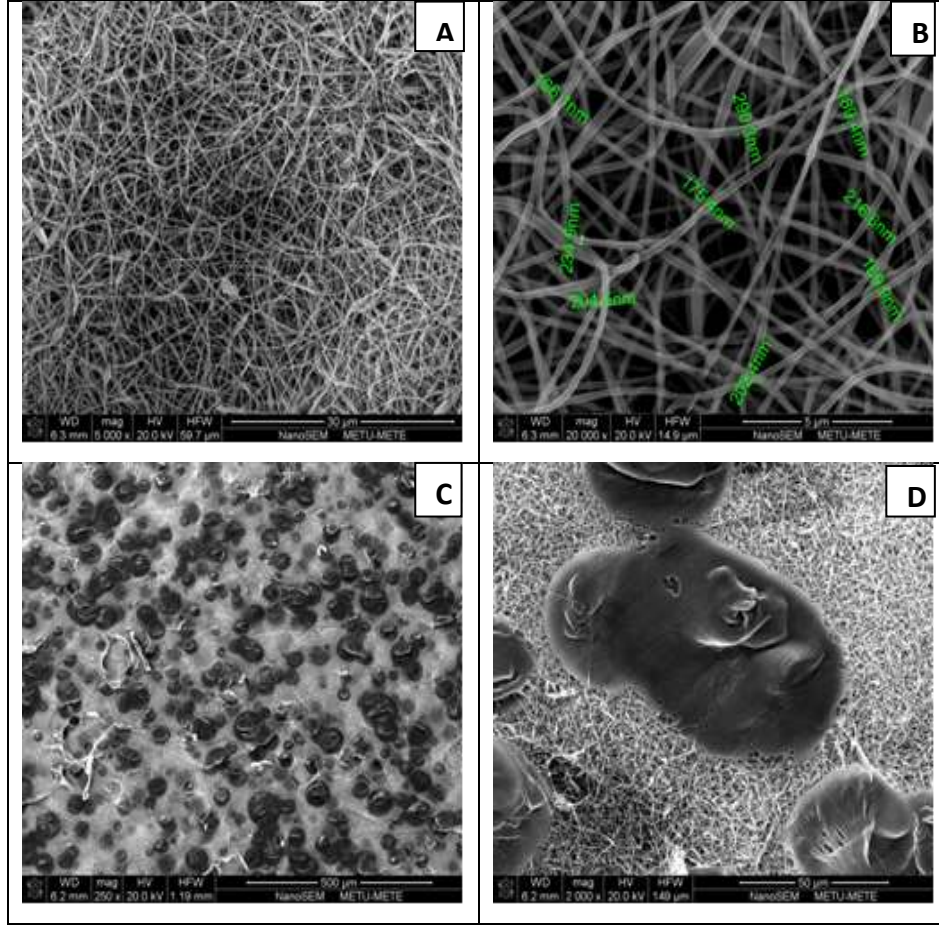
Gruplar *	Toplama ekranında oluşan yapının özellikleri	Ortalama fiber çapı (nm)	Kullanılan çözeltinin özellikleri
Sa1	Fiberli sağlam ve düzgün bir yapı oluştu.	235.0 ± 50.1	Viskozitesi düşüktür. Çözelti şeffaftır.
Sa2	Fiberli sağlam ve düzgün bir yapı oluştu.	201.3 ± 31.9	Viskozitesi C1t'ye göre yüksektir. Çözelti şeffaftır.
Sa3	Fiberli sağlam ve düzgün bir yapı oluştu.	194.1 ± 24.5	Viskozitesi elektro-eğirme için uygun. Çözelti şeffaftır.
Sa4	Fiberli sağlam ve düzgün bir yapı oluştu.	248.5 ± 19	Viskozitesi elektro-eğirme için uygun. Çözelti şeffaftır.

*Grupların içerdiği polimerler ve oranları Tablo 3'de verilmiştir.

Nanoaltın parçacıkları katılan gruplarda çok başarılı bir şekilde nanofiberli matriksler elde edilmesine rağmen, bu matrikslerin içinde mikron boyutunda birikimler (damlalar şeklinde) olduğu gözlenmiştir. Kollajen/PEO (1:2 %) ve nanoaltın içeren (10 veya 100 µl) gruplarda bunların daha belirgin bir şekilde olduğu görülmektedir (Şekil 30, 31). PEO oranı arttığında ise (Kollajen/PEO 1:2.5 %), nanoaltın içeren (10 veya 100 µl) gruplarda, özellikle de altın oranı arttırıldığında bu yapıların azaldığı görülmüştür (Şekil 32, 33).

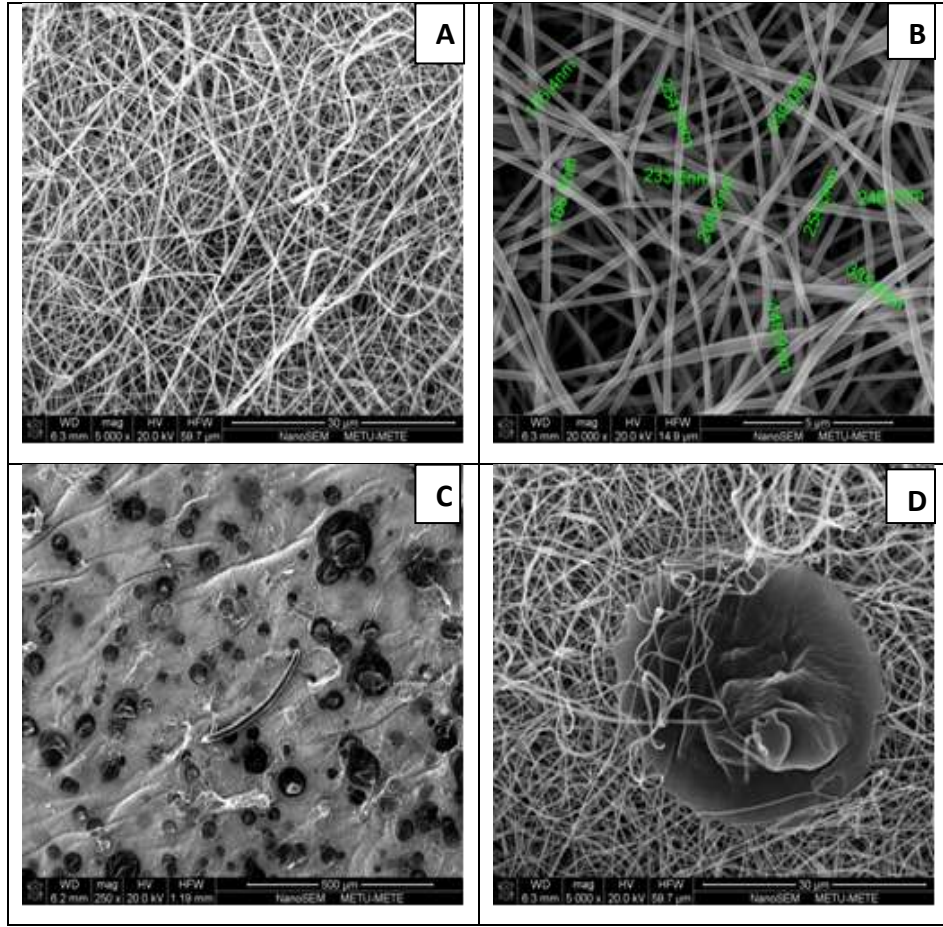


Şekil 30. Alüminyum disk üstünde toplanan kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2 % + 10 µl) iskeleler (D= 5 cm, akış hızı= 1 ml/h, voltaj=19 kV, mesafe=23 cm). A, B) Nanofiber boyut dağılımını C, D) iskelelerdeki damlaları göstermektedir.

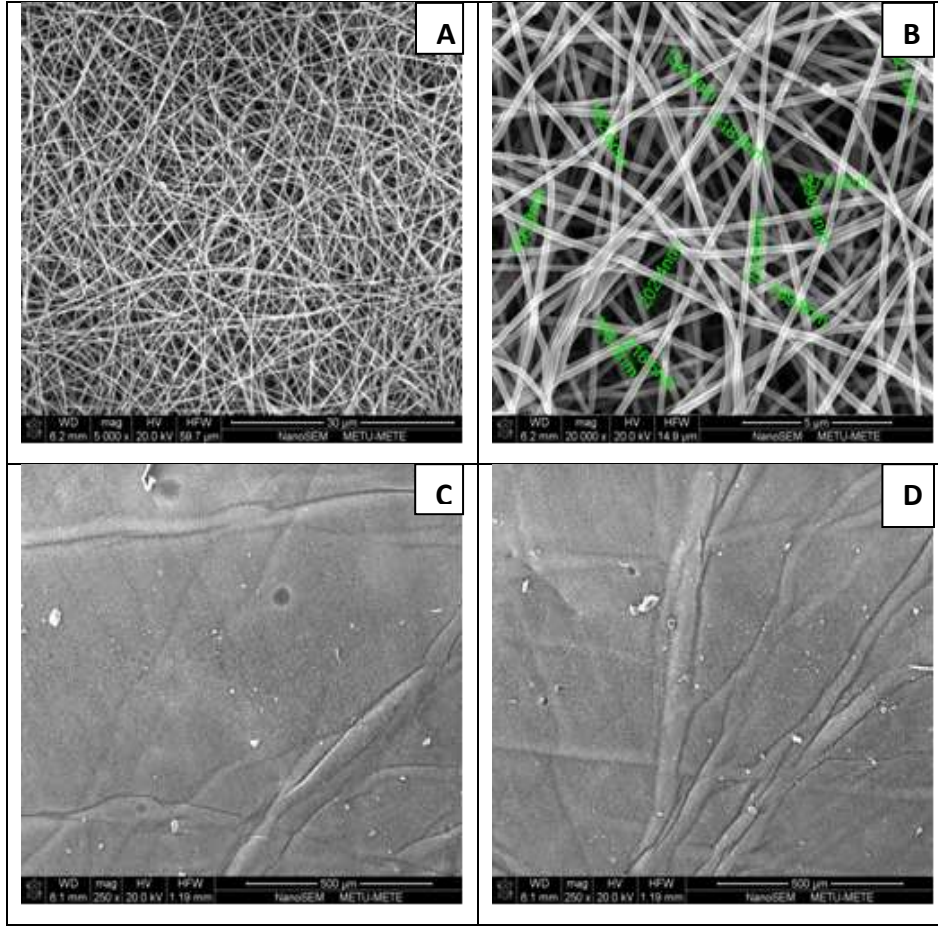


Şekil 31. Alüminyum disk üstünde toplanan kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2 % + 100 µl) iskeleler (D= 5 cm, akış hızı= 1 ml/h, voltaj=19 kV, mesafe=23 cm). A, B) Nanofiber boyut dağılımını C, D) iskelelerdeki damlaları göstermektedir.

Oluşan mikro damlacıkları azaltmak için öncelikle PEO konsantrasyonu (2.5 %) arttırılmıştır (Şekil 32). Bununla birlikte altın miktarı arttırıldığında (100 µl) damlacık sayısında belirgin bir azalma ve nanofiberlerin yapısında düzelme olmuştur (Şekil 33).

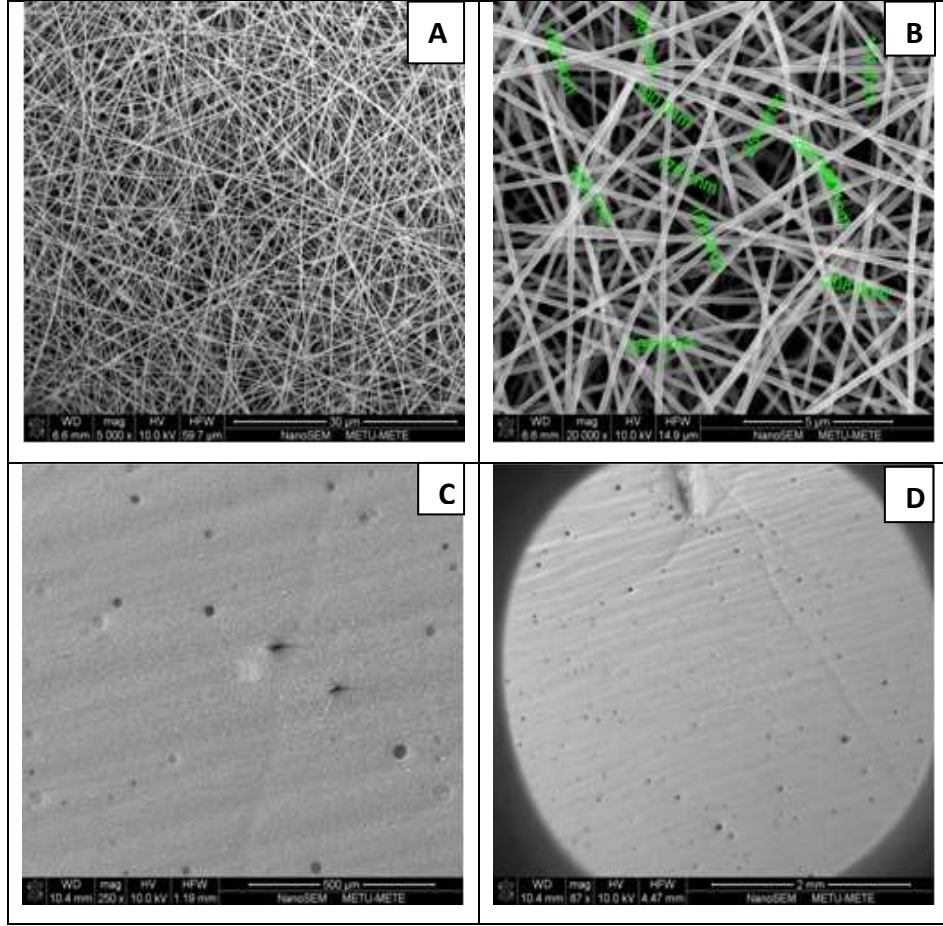


Şekil 32. Alüminyum disk üstünde toplanan kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2.5 % + 10 µl) iskeleler (D= 5 cm, akış hızı= 1 ml/h, voltaj=19 kV, mesafe=23 cm). A, B) Nanofiber boyut dağılımını C, D) iskelelerdeki damlaları göstermektedir.

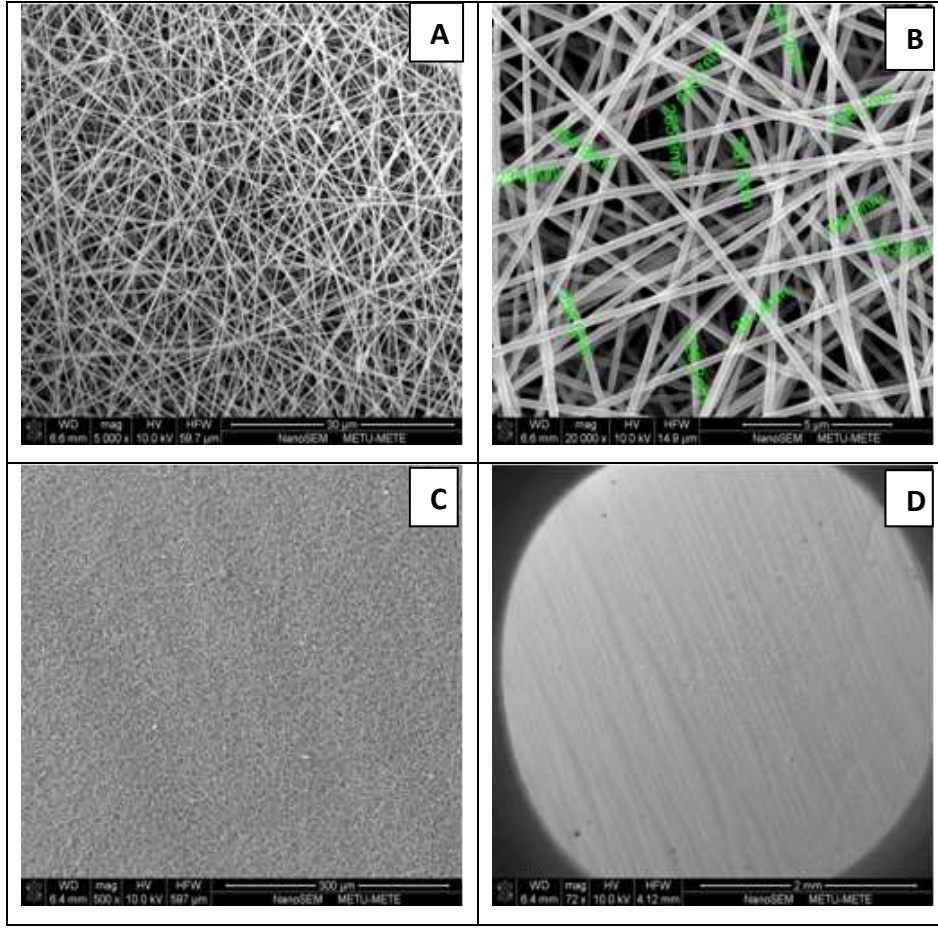


Şekil 33. Alüminyum disk üstünde toplanan kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2.5 % + 100 µl) iskeleler (D= 5 cm, akış hızı= 1 ml/h, voltaj=19 kV, mesafe=23 cm). A, B) Nanofiber boyut dağılımını C, D) iskelelerdeki damlaları göstermektedir.

Son olarak % 2.5'lük PEO konsantrasyonu seçilerek altın miktarı daha da arttırılmıştır (500 ve 1000µl). Böylece nanofiberlerin içindeki mikro damlacıklar neredeyse tamamen yok olmuş ve nanofiberlerin yapısında düzelme sağlanmıştır (Şekil 34, 35). Bunlardan 1000 µl nanoaltın içeren grupta oldukça homojen bir yapıya sahip, yukarıda bahsedilen yapısal deformasyonları çok az olan bir deri doku iskelesi malzemesi oluşturulabilmiştir.



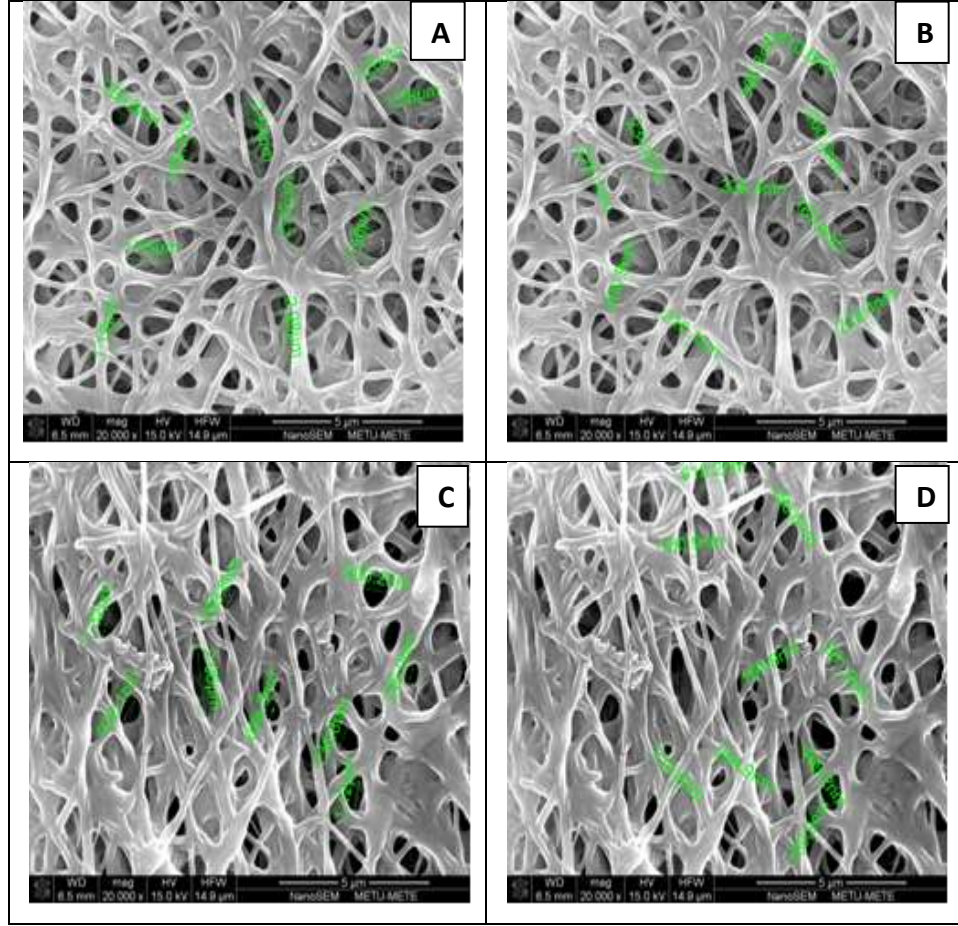
Şekil 34. Alüminyum disk üstünde Kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2.5 % + 500 µl) iskeleler (D= 5 cm, akış hızı= 0.8 ml/h, voltaj=16 kV, mesafe=23 cm). A, B) Nanofiber boyut dağılımını C, D) iskelelerdeki damlaları göstermektedir.



Şekil 35. Alüminyum disk üstünde Kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2.5 % + 1000 μ l) iskeleler (D= 5 cm, akış hızı= 0.8 ml/h, voltaj=16 kV, mesafe=23 cm). A, B) Nanofiber boyut dağılımını C, D) iskelelerdeki damlaları göstermektedir.

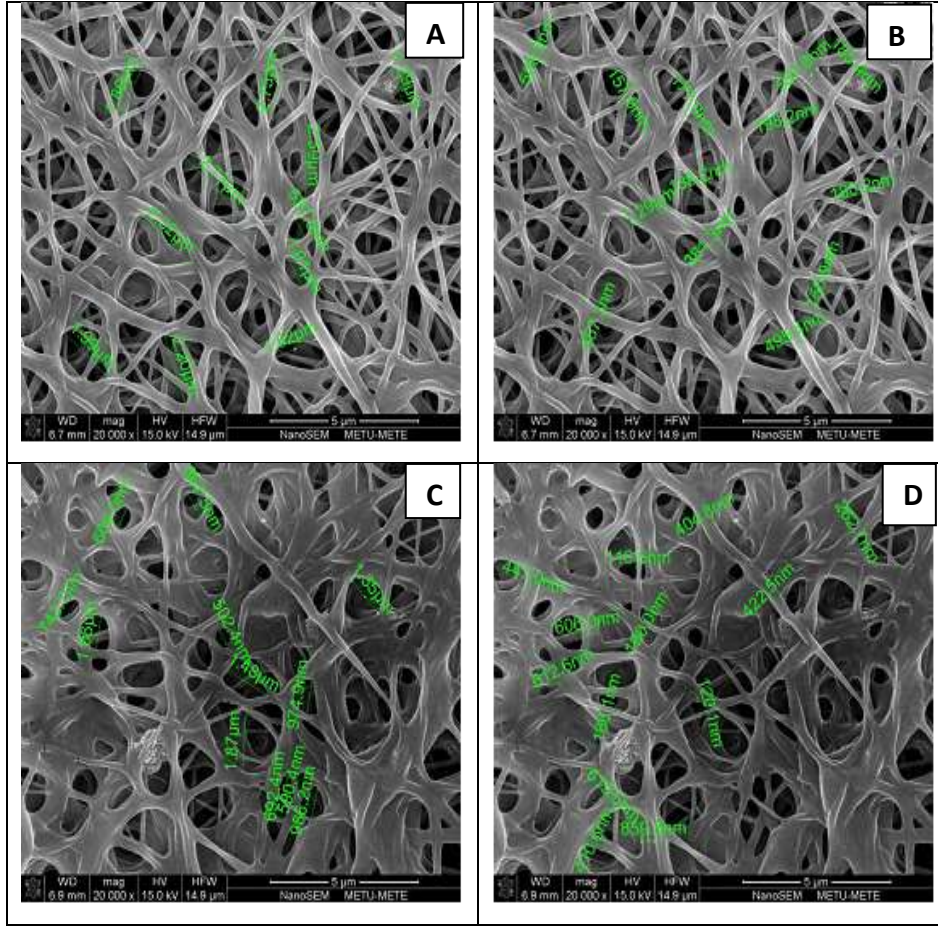
2.2. Deri iskelelerinin Çapraz Bağlanması (BECM-X)

Deri iskelelerinin GTA buharıyla (3 %) farklı zaman periyotlarında (2 ve 4 saat) çapraz bağlama işlemi sonucunda nanofiberli yapılarının korunduğu gözlenmiştir (Şekil 36, 37). Farklı miktarlarda nanoaltın (10 veya 100 μ l) içeren gruplarda yapılan çapraz bağlama işlemlerine göre 4 saatlik çapraz bağlamanın fiberli yapının gözeneklerini büyük oranda kapattığı görülmektedir (Şekil 36, 37 C, D). Bu sebeple 2 saatlik çapraz bağlama işleminin daha uygun olduğu düşünülmüştür.



Şekil 36. Alüminyum diskler üstünde toplanan kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2 % + 10 µl) iskelelerin (D= 5 cm, akış hızı= 1 ml/h, voltaj=19 kV, mesafe=23 cm) A, B) 2 saat boyunca, C, D) 4 saat boyunca GTA çözeltisi (3 %) ile çapraz bağlanmasının fiber çapı ve gözenek boyutu üstündeki etkisi .

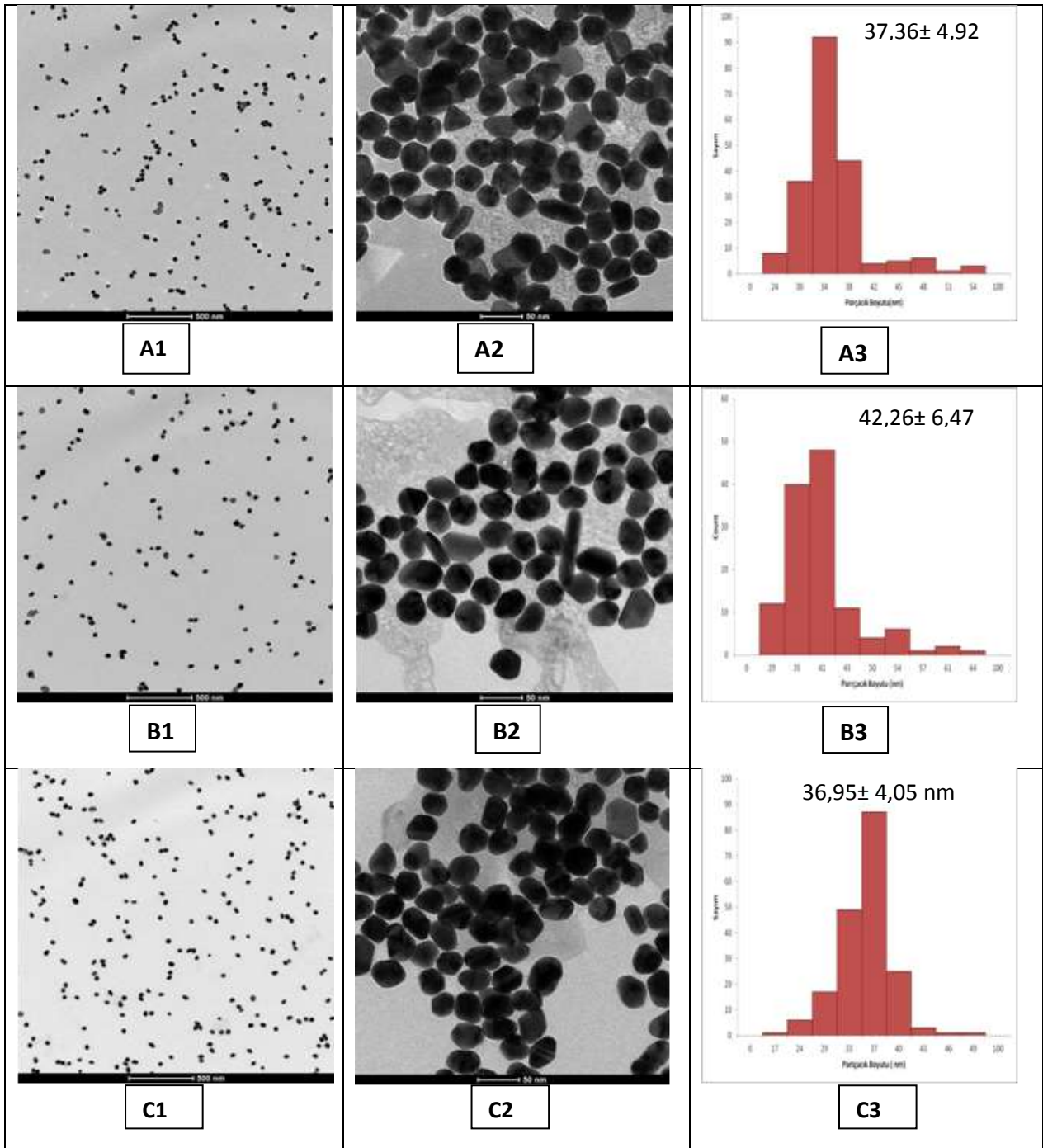
Kısa süreli çapraz bağlanan grupların gözenek boyutu (Şekil 36 A ve 37 A), 500 nm ile 3 µm arasında değişmektedir. Bu boyut hücrelerin iskele içine göçü için uygundur. Ayrıca çapraz bağlanan gruplardan daha fazla nanoaltın içeren grubun 2 saatlik çapraz bağlama işlemi sonrasında nanofiberli yapısı daha fazla korunmuştur.

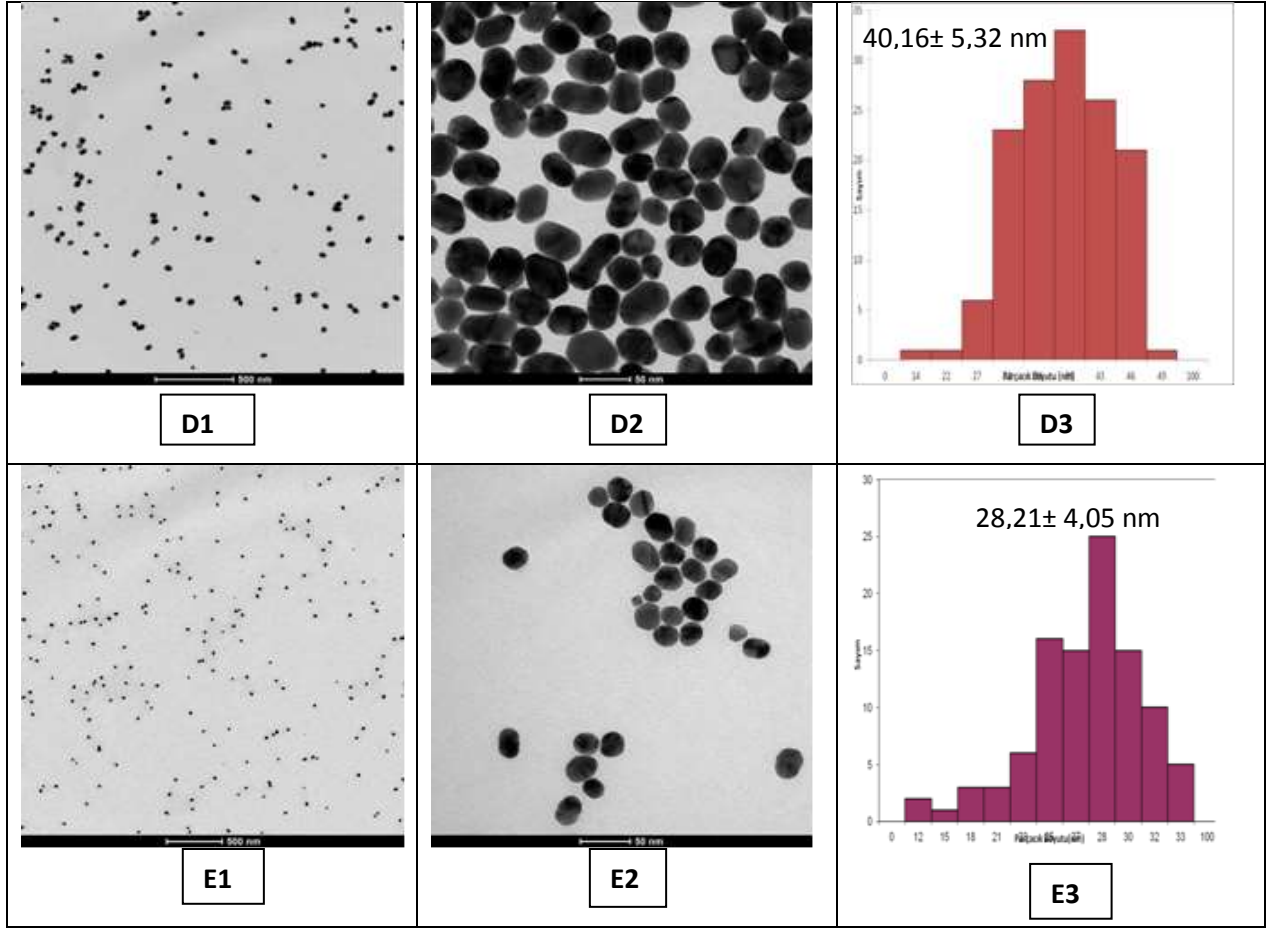


Şekil 37. Alüminyum diskler üstünde toplanan kollajen/PEO/NanoAu (1% / 2 % + 100 µl) iskelelerin (D= 5 cm, akış hızı= 1 ml/h, voltaj=19 kV, mesafe=23 cm) A,B) 2 saat boyunca, C,D) 4 saat boyunca GTA çözeltisi (3 %) ile çapraz bağlanmasının fiber çapı ve gözenek boyutu üstündeki etkisi .

2.3. Altın Nanoparçacıklarının Sentezi ve Karakterizasyonu ile İlgili Bulgular

Projenin ikinci bölümünde amaçlandığı gibi Turkewich metodu ile istenilen boyutlarda (20-50 nm aralığında) altın nanoparçacıkları düzgün bir boyut dağılımı ile üretilmiştir (Şekil 38). Nanoaltın sentez aşamasında çözelti sıcaklığı (kaynama noktası), karıştırma hızı (800 rpm), altın tuzu molaritesi (1 mM) ve başlangıç hacmi (20 ml), eklenen trisodyum sitratın konsantrasyonu (0.1%) sabit tutulmuş, tek değişken sitratın eklenen hacmi (5-10 ml) olmuştur. Bu şekilde elde edilen altın nanoparçacıkları S5 (5 ml sitrat), S6 (6 ml sitrat), S7 (7 ml sitrat), S8 (8 ml sitrat), S9 (9 ml sitrat), S10 (10 ml sitrat) olarak kodlanmıştır.



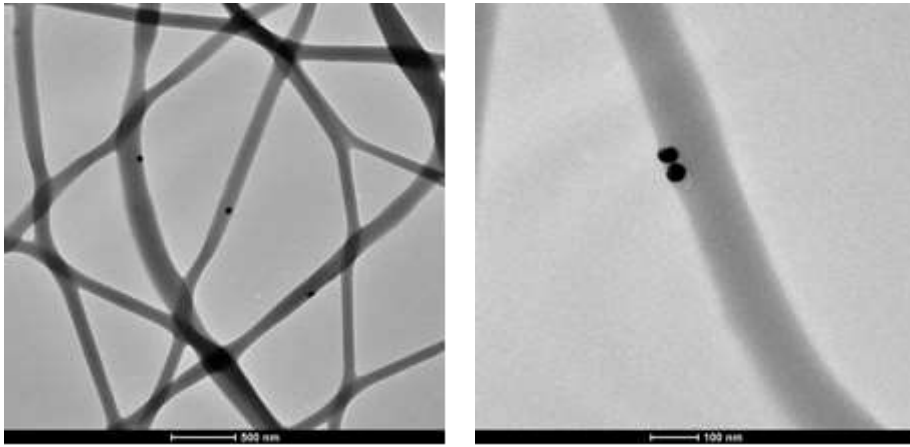


Şekil 38. Karbon film kaplı ızgaralar üstünde toplanmış A1-A3) 6 ml, B1-B3) 7 ml, C1-C3) 8 ml D1-D3) 9 ml E1-E3) 10 ml % 0.1'lik sodyum sitrat ile hazırlanan altın nanoparçacıklarının cTEM mikrografileri ve boyut dağılım histogramları

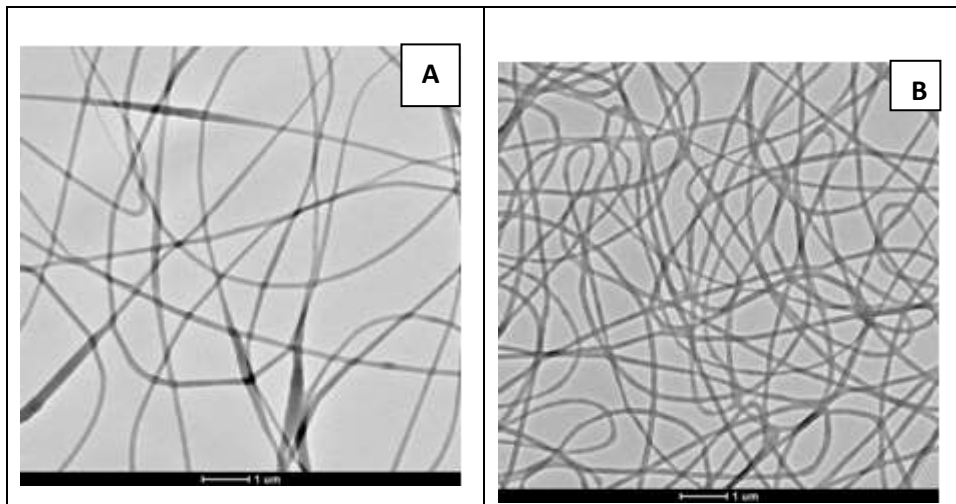
Yapılan boyut analizine göre S5 grubu ile altın nanoparçacıkları elde edilmemiştir. Diğer grupların hepsinde (S6, S7, S9, S8, S10) altın nanoparçacıkları elde edilmiştir. Eklene sodyum sitrat miktarı ile birlikte (S10 grubu hariç) altın boyutunda anlamlı bir değişiklik olmamıştır (Şekil 38). Ancak sitrat miktarı arttırıldığında altın parçacıklarının boyut dağılımı ve şekli daha düzgün hale gelmiştir. S8 ve S9 grupları şekil ve boyut dağılımı ve ortalama parçacık boyutu açısından birbirlerine çok benzemektedirler. Bütün bu sonuçlara göre, S7, S8, S9 grupları diğer deneylerde (elektro-eğirme ve hücre kültür deneyleri) kullanılmak üzere seçilmiştir.

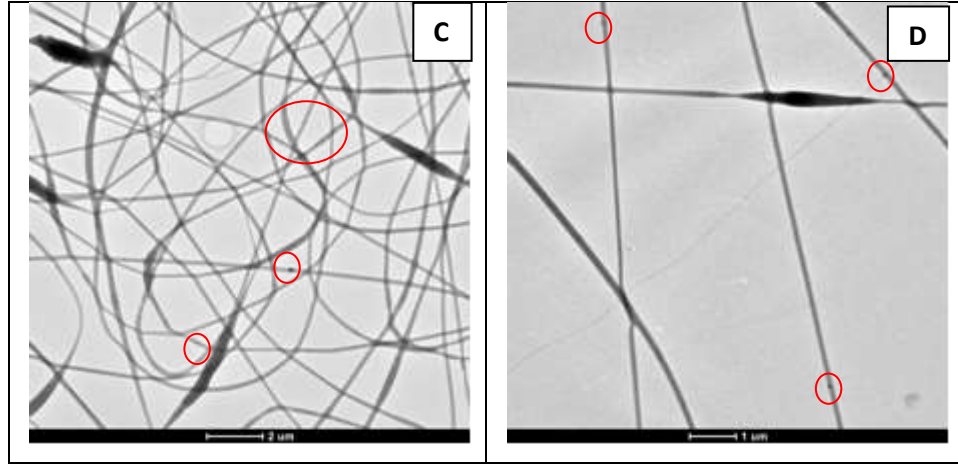
2.3.1. Altın Nanoparçacıklarının İskelelere Yüklenmesi

S8 ya da S9 grubundan seçilen nanoparçacıklar elektro-eğirme için hazırlanan kollajen/PEO çözeltilerine farklı miktarlarda (10, 100, 500, 1000 μ l) eklenerek iskelelere altın nanoparçacıklarının eklenmesi gerçekleştirilmiştir. Nanoaltınların nanofiberlerin içindeki görünümüne TEM ile bakılmıştır (Şekil 39). Nanofiberlerin içindeki altın nanoparçacıkların tayini, düşük konsantrasyonlar (10, 100 μ l) için çok zordur (Şekil 40 A, B). Ancak yüksek miktarlarda (500, 1000 μ l) altın eklenen iskelelerde nanoparçacık tespiti kolaylaşmıştır (Şekil 40 C,D). Bu analize göre elektro-eğirme için hazırlanan çözeltilere katılan nanoaltın miktarının arttırılabileceğine karar verilmiştir.



Şekil 39. Karbon film kaplı ızgaralar üstünde toplanmış nanofiberli matriks içindeki altın nanoparçacıklarının (S9) cTEM mikrografileri

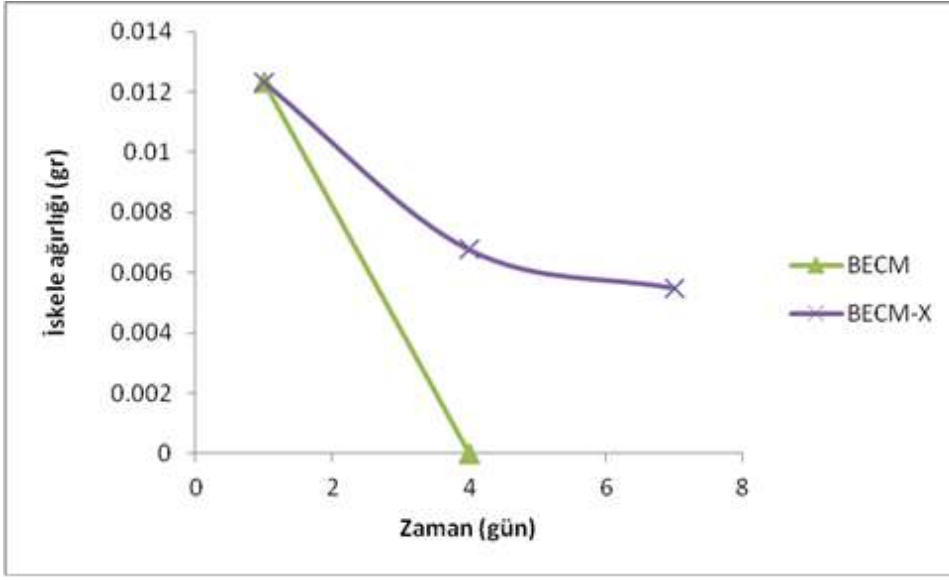




Şekil 40. Karbon film kaplı ızgaralar üstünde toplanmış A)10 μ l, B)100 μ l, C)500 μ l, D)1000 μ l altın nano parçacık yüklü (S9) nanofiberli matrislerin (akış hızı= 1 ml/saat, voltaj=19 kV, mesafe=20 cm) cTEM mikrografileri. Kırmızı daireler içinde altın nanoparçacıkları gösterilmiştir.

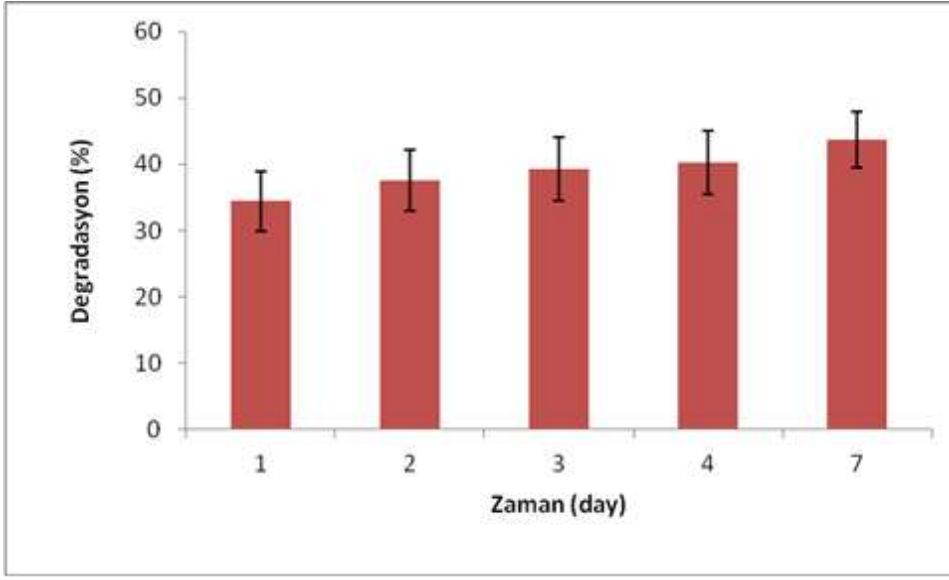
2.4. İskelelerin In Vitro Karakterizasyonu ile İlgili Bulgular

Kollajen/PEO/NanoAu nanofibröz matris ve serisin/kollajen filmlerden hazırlanan iki katmanlı iskelelerin (BECM ve BECM-X) 37 °C PBS içindeki dayanıklılıkları düşüktür. Bununla ilgili ön testler gerçekleştirilmiştir. BCA analizi ve gravimetrik metodu kullanılarak yapılan deney sonuçlarına göre BECM grupların 37 °C degradasyonu 1 gün sürmüştür. Çapraz bağlanan gruplarda (BECM-X) ise gravimetrik analize göre 37 °C PBS’de 4-7 gün arasında nanofibröz tabaka tamamen çözünmekte, film tabakasının sağlamlığı ise korunmaktadır (Şekil 41, 42). Gravimetrik analizde görülen, 4 gün içindeki ani ağırlık düşüşü ve daha sonra ağırlığın 4-7 günler arasında sabitlenmesinin bundan kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Şekil 41).



Şekil 41. İki katmanlı iskelelerin 37 °C’de PBS içinde hidrolitik bozunumlarının gravimetrik analizi

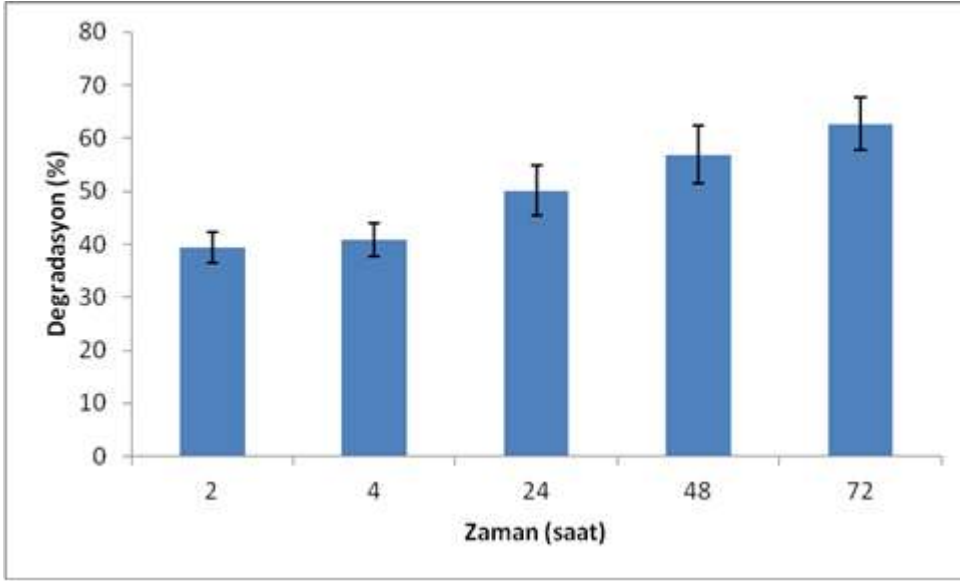
Yapılan ilk denemelerde, BECM’nin sulu ortamlarda 3 boyutlu yapısını koruyamadığı görülmüştür. Ancak çapraz bağlama sonucunda, BECM-X yapısını koruyabilmiştir. Buna rağmen BECM-X’in 37 °C’de bekletildiğinde belirli bir kontraksiyona (büzüşme) uğradığı gözlenmiştir. Gerçekleştirilen hidrolitik degradasyon testlerinin sonuçları göre BECM 37 °C’de 1 günde tamamen çözüldüğü için deri doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak için uygun bulunmamıştır. Bu nedenle bundan sonraki testlerde BECM’nin analiz ve testleri yapılmamıştır. BCA sonuçları ve gravimetrik analizler büyük oranda birbirleriyle örtüşmektedirler. BCA sonuçlarına göre en büyük degradasyon (% 35 civarında) 1. gün gerçekleşmiştir (Şekil 42). Bundan sonraki günlerde belirgin bir bozunma görülmemektedir ve 7 gün sonundaki bozunma % 40 seviyesinde sabitlenmiş görülmektedir. Bütün bu sonuçlara göre çapraz bağlama üretilen naofibröz matriksin hidrolitik bozunuma karşı direncini arttırmıştır. Ancak, belirli bir gün sonunda nanofibröz iskele tamamen bozunmaktadır. Benzer çalışmalarda da glutaraldehitle çapraz bağlanan kollajenden yapılmış iskelelerin bütünlüğünü büyük oranda koruduğu gösterilmiştir (WITTAYAAREEKUL, 2006; CHARULATHA, 2003).



Şekil 42. İki katmanlı iskelelerin (BECM-X) 37 °C'de PBS içinde hidrolitik bozunumlarının BCA analizi

2.4.1. Enzimatik Bozunum Testleri

Kollajenaz tip I enzimi kullanılarak yapılan in vitro degradasyon sonuçlarına göre çapraz bağlanmayan gruplar 2 saat sonunda, çapraz bağlananlar ise 3 gün sonunda parçalanmışlardır (Şekil 43). İki katmanlı iskelelerde öncelikle nanofibröz matriks kısmı bozunmakta, film kısmı ise daha çok dayanmaktadır. BECM-X'in nanofibröz matriks kısmının ilk 2 saat içinde tamamen bozunduğu, film tabakadaki bozulmanın ise çok yavaş olduğu tespit edilmiştir. BCA analizine göre 3 gün sonundaki toplam bozunma % 60 değerlerine çıkmıştır. Projenin ilk bölümünde de belirtildiği gibi, bu analizde bozunum sonuçlarının malzeme özelliğinin yanısıra kullanılan kollajenaz enzimi konsantrasyonunun da bir fonksiyonu olduğu bilinmektedir. Doğal dokuda bu konsantrasyonun doku hasar düzeyi veya dokuya özgün olarak değişebileceği, dolayısıyla daha yavaş veya hızlı bozunum sonuçları alınabileceği düşünülmektedir.



Şekil 43. İki katmanlı iskelelerin in vitro-enzimatik bozunumunun BCA yöntemi ile analizi

İyi bir deri iskelesi için 25 günlük bir biyobozunum zamanı tavsiye edilmektedir. Birkaç gün içinde yapısal bütünlüğünü tamamen kaybeden iskeleler deri doku mühendisliği için uygun olmayacaktır. Diğer yandan, 3-4 hafta boyunca bile sadece minimal olarak bozunum gösteren iskeleler yara iyileşmesini ve yeni deri oluşumunu hızlandıracaktır (YANNAS, 1980). Projede üretilen BECM-X'in nanofibröz matriksinin 2 saat içinde tamamen degrade olması, kullanılan kollajenazın konsantrasyonunun oldukça yüksek olmasıyla açıklanabilir. Normal yaralı deride bu kadar yıkıcı bir koşul olmayabileceği de düşünülmektedir. Ayrıca in vivo koşullarda kollajenaz ve diğer enzimlerle bir yandan iskeleler yıkılırken aynı zamanda yeni doku oluşumu da beklenmektedir. Dolayısıyla, projede gösterilen biyodegradasyon değerlerinin in vivo ortamda olumlu sonuçlar verebileceği düşünülmektedir. Ancak enzimatik degradasyona karşı daha dayanıklı bir nanofibröz matriks üretilmesi in vitro çapraz bağlama yoluyla başarılabilir. GTA ile çapraz bağlanmış kollajen matrikslerin kollajenaz enzimi ile bozunumuna karşı belirgin bir şekilde dirençlerinin arttığı başka çalışmalarda da bildirilmiştir (CHARULATHA, 2003). Ayrıca, in vitro çapraz bağlama ile nanofiberli ve porlu bir yapıda suda çözünmeye daha dayanıklı nanofibröz matriksler üretilabileceği düşünülmektedir.

2.4.2. Su Tutma Deneyleri

BECM-X iskelelerin su tutma değerleri (3.58 ± 0.58) çok yüksek değildir (Tablo 6). Nanofibröz matrikslerin daha az porlu yapıda ve yoğun olduğu bilindiğinden su tutma değerlerinin köpük yapıdaki iskelelere göre daha düşük çıkması beklenmektedir. CHEN ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan araştırmada üretilen kollajen/kitosan nanofiberli iskelelerin EDS değeri 9 (g/g) bizim çalışmamızda ürettiğimiz BECM-X iskelelerin su tutma değerlerine yakın olarak bulunmuştur. Literatürdeki çalışmalarda köpük tarzında üretilmiş iskelelerin EDS değerleri (20-160 g/g) yüksektir (CHOI,1999; ADEKOGBE, 2005; L. MA , 2003).

2.4.3. Su Buharı Geçirgenliği Hızı Deneyleri

BECM-X'in su buharı geçirgenliği hızı 1359.75 ± 82.62 olarak bulunmuştur (Tablo 6). Projenin birinci bölümünde belirtildiği gibi bir yaranın çabuk iyileşebilmesi için nemli bir ortam gerekmektedir, ama aynı zamanda enfeksiyon riskinin azaltılması için yara yatağının altında irinli sıvının (exudate) birikmesi de önlenmelidir. Yani, yaradan optimum bir hızda su buharlaşmasını kontrollü bir şekilde sağlayan bir deri eşleniğine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada iki katmanlı deri eşlenikleri için ölçülen değerlerin ($1300 \text{ g/m}^2/\text{gün}$ civarında) düşük-orta egzude yaralar için uygun olduğu söylenebilir (MI, 2001; YANNAS, 1980).

2.4.4. Biyomekanik Testler

Mekanik testlere göre çapraz bağlama işleminin iskelelerin hem çekme dayanımını (Tablo 6) hem de kırılma anındaki uzama oranlarını istatistiksel açıdan anlamlı bir biçimde arttırmıştır. Örneklerin elastik modülüsleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. BECM-X örneğinin ortalama çekme dayanımı 3.36 ± 1.29 , kırılma anındaki uzaması $\% 23.37 \pm 8.35$, elastik modülüsü ise 40.82 ± 14.19 'dir. Projede üretilen doku iskelelerinin çekme dayanımı, derinin çekme dayanımı (7.6 MPa) değerine yakındır ve literatürde verilen (SILVER, 1987) elastik modülüs değeri aralığı içindedir (6-40 Mpa). Ayrıca literatürdeki diğer çalışmalardaki çekme dayanımı değerlerine (10-30 MPa) benzemektedir (PARK ve ark., 2004) genel olarak yüksektir. Kollajen için bildirilen maksimum uzama miktarı $\% 10-20$ civarındadır (MEYERS, 2008) ve bu bilgi bizim sonuçlarımızla örtüşmektedir. Deneyler kuru örneklerle ve kuru ortamda gerçekleşmiştir. Eğer su çekmiş ya da nemlendirilmiş iskelelerin mekanik özellikleri analiz edilirse örneklerin kırılma anındaki uzama oranları artacaktır. Islatılmış ya da nemlendirilmiş iskelelerin daha çok uzama oranına sahip olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (ADEKOGBE, 2005; WANG, 2003). Deri için elastik modülüs değeri

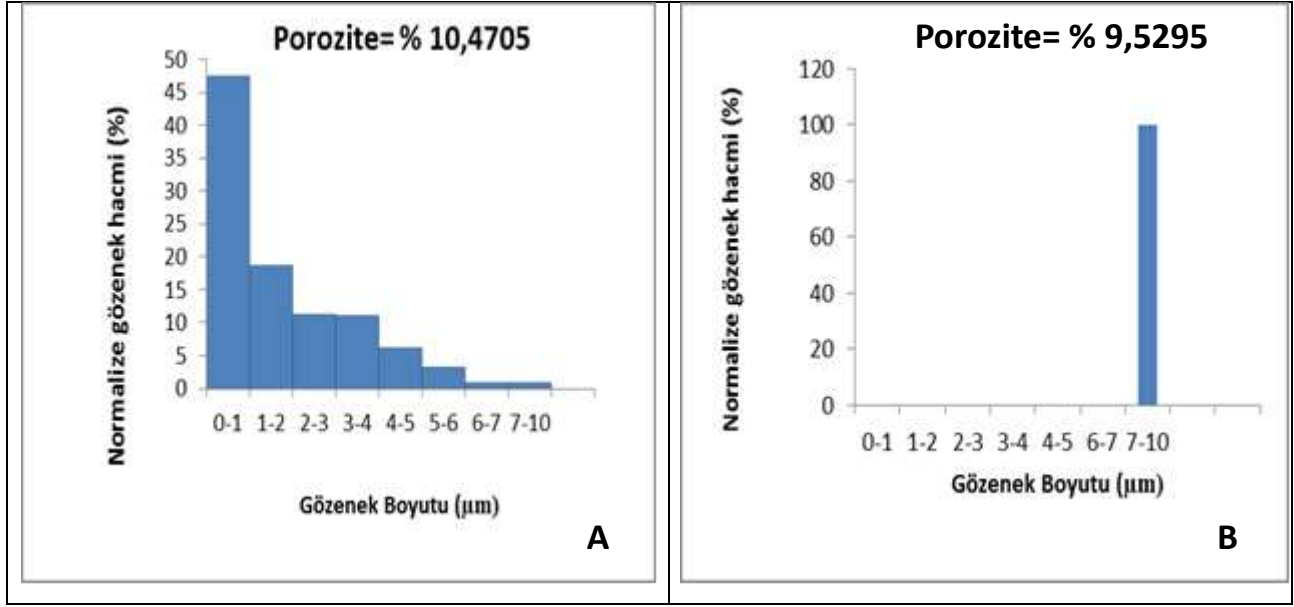
6-40 MPa arasındadır (SILVER, 1987). Projede üretilen deri iskelelerin elastik modülüsü derinin alt sınırına yakındır.

Tablo 7. İskelelerin in vitro karakterizasyon testleri sonuçları

Su Tutma (g/g)	Su Buharı Geçirgenliği Hızı (g/m ² /gün)	Çekme Kuvveti (MPa)	Kırılma Anındaki Uzama (%)	Elastik Modülüs (MPa)
3.58 ± 0.58	1358.75 ± 82.62	3.36± 1.29	23.37 ± 8.35	40.82 ±14.19

2.4.5. Gözeneklilik Ölçüm Sonuçları

Gözeneklilik ölçümlerine göre çapraz bağlama işlemi sonrasında örneklerin gözenekliliği bir miktar düşmüştür (Şekil 44). Çapraz bağlı olmayanlar için gözeneklilik % 10,47 iken (Şekil 44 A), çapraz bağlı olanlar için % 9,53'dür (Şekil 44 B). Çapraz bağlama işleminin gözenekliliği büyük miktarda düşürücü bir etkisi olduğu görülmemiştir. Gözenek boyut dağılımı histogram grafiklerine göre, çapraz bağlanmamış örneklerin gözeneklerinin daha çok küçük boyutlarda olduğu (0-1 µm) ve büyük gözeneklerin sayısının nispeten daha az olduğu görülmüştür (1-10 µm). Çapraz bağlama işlemi sonrasında küçük gözenekler (0-7 µm) tamamen kapanmıştır. Üretilen nanofibröz matrislerin köpüklere kıyasla daha yoğun ve küçük gözenek boyutunda ve gözeneklilikte olduğu daha önce SEM mikrografilerinde teyit edilmişti. Buna karşın iskeleler içindeki PEO'nun bir porojen görevi görerek iskelelerin gözenekliliğini ve gözenek boyutunu belirgin bir şekilde arttırması beklenmektedir.



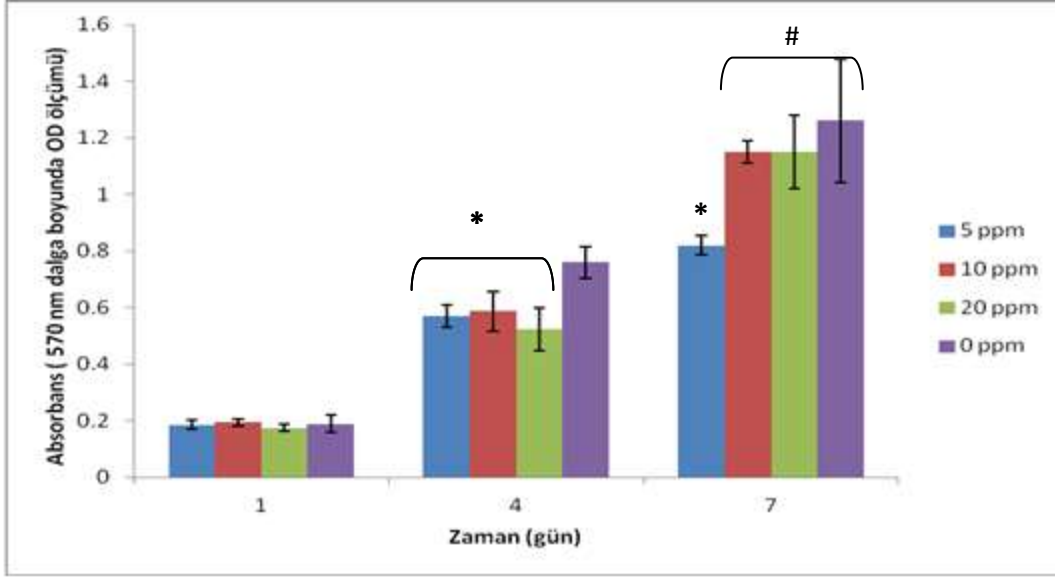
Şekil 44. A) Çapraz bağlı olmayan ve B) GTA buharıyla (3 %) 2 saat boyunca çapraz bağlanan nanofibröz matrikslerin gözenek boyutu dağılımı ve gözeneklilik analizleri

2.5. Nanoaltın In Vitro Biyouyumluluk Testleri ile İlgili Bulgular

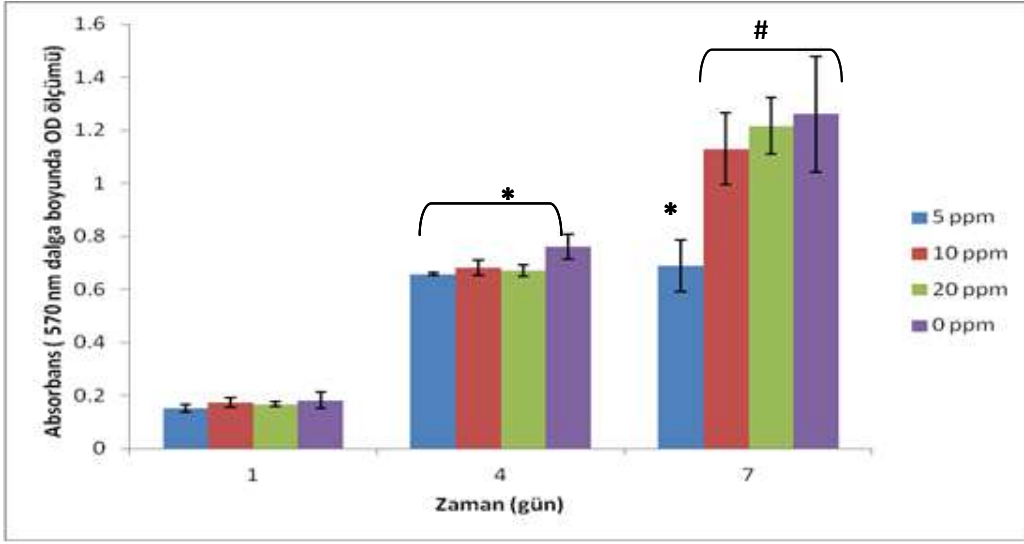
2.5.1. Altın Nanoparçacıklarının Keratinositler Üstündeki Sitotoksik Etkisi

Bir önceki proje dönemindeki bulgular sonucunda planlandığı üzere iki yeni grup hazırlanıp bu iki farklı altın grubu için (S7 ve S8) değişik konsantrasyonlarda (5, 10, 20 ppm) keratinosit hücrelerinde sitotoksikite testleri yapılmıştır (Şekil 45, 46). 1 günlük sonuçlara göre S7 ve S8 gruplarının farklı konsantrasyonlarında elde edilen optik yoğunluk değerleriyle kontrol grubu (0 ppm) arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu sonuç, bu boyutlarda üretilen altın nanoparçacıklarının 5-20 ppm konsantrasyonlarında keratinositler üstünde 1 günde sitotoksik bir etkisi olmadığını göstermektedir. Ayrıca her bir zaman periyodunda (1, 4 ve 7 gün) her bir örnek için (S7 ve S8) hücreler istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde artmıştır. 4. gün sonunda kontrolle nanoaltınlı gruplar arasında anlamlı bir fark oluşmuştur. Ancak 4. günde, diğer gruplar kontrolün % 68-77'si kadardır. Ayrıca 4. günde nanoaltınlı gruplar arasında anlamlı bir fark oluşmamıştır. 7 günlük inkübasyon sonrasındaki test sonuçlarına göre bütün gruplarda (5 ppm hariç) hücreler 7 günlük zaman içinde anlamlı bir şekilde çoğalmalarının yanında aynı zamanda kontrolle aynı düzeyde (% 90-100) bir proliferasyona ulaşmışlardır. Bu sebeple altın

nanoparçacıklarının bu boyutlarda (30-50nm) uzun inkübasyonlarda hücre sayısının artışına olumsuz bir etkisinin olmadığı, aksine nanoaltın konsantrasyonunun artmasıyla birlikte hücre artışının olumlu bir şekilde etkilenebileceği düşünülmüştür. Bütün bunlar birlikte değerlendirildiğinde üretilen bu altın nanoparçacık gruplarının hücreler üstünde sitotoksik bir etkisinin olmadığı bulunmuştur.



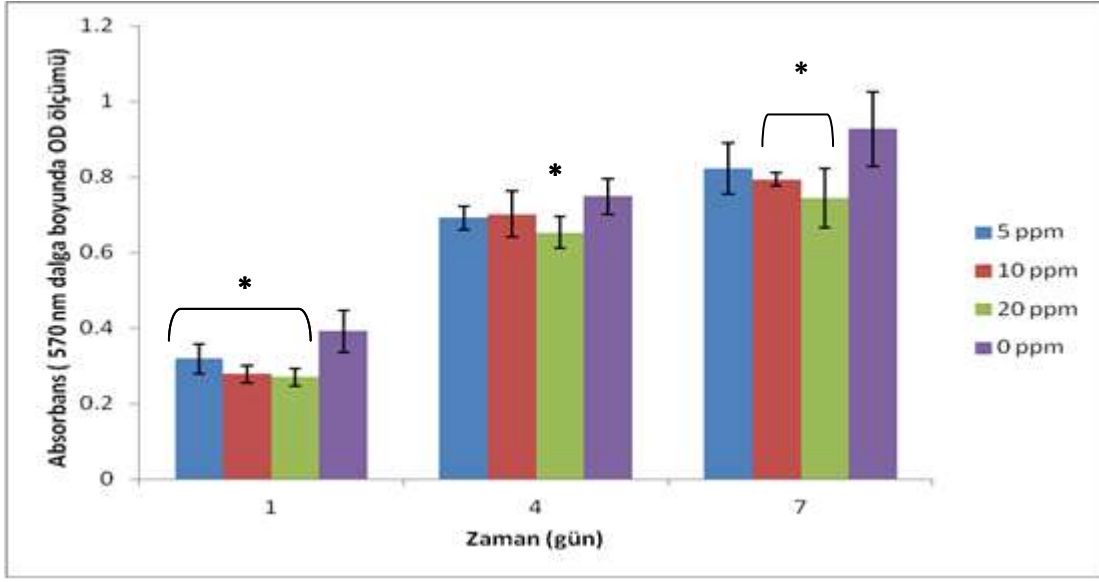
Şekil 45. Altın nanoparçacıklarının (S7 grubu) keratinositler üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi. *: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. #: Aynı zaman içinde 5 ppm ile arada anlamlı fark olduğunu göstermektedir $p < 0.05$.



Şekil 46. Altın nanoparçacıklarının (S8 grubu) keratinositler üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi. *: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. #: Aynı zaman içinde 5 ppm ile arada anlamlı fark olduğunu göstermektedir $p < 0.05$.

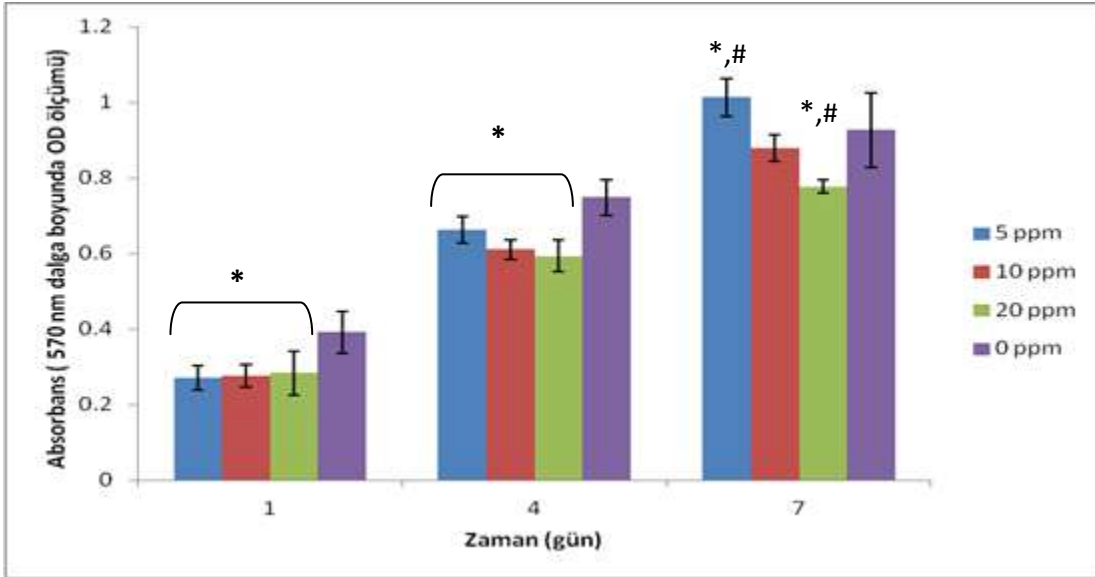
2.5.2. Altın Nanoparçacıklarının 3T3 Fibroblastlar Üstündeki Sitotoksik Etkisi

iki farklı altın grubu için (S7 ve S8) değişik konsantrasyonlarda (5, 10, 20 ppm) 3T3 fibroblast hücrelerinde sitotoksisite testleri yapılmıştır (Şekil 47, 48). 1. gün sonuçlarına göre S7 ve S8 grupları için kontrolle tüm doz grupları arasında anlamlı bir fark vardır. Ancak kontrole göre proliferasyon düşük değildir (% 68-81) Ayrıca, her bir zaman periyodunda (1, 4 ve 7 gün) her bir örnek için (S7 ve S8) hücreler istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde artmıştır. Genel olarak doz artışı olduğunda hücre proliferasyonu düşmüştür. S7 grubu için 4. günde 20 ppm (% 87), 7. gün ise hem 10 ppm (% 85) hem de 20 ppm (% 80) dozlarında kontrole göre optik yoğunluk (OD) değerleri düşmüştür. Ancak bu grupların kontrole göre OD oranları yüksektir. S8 grubu için 4. günde tüm doz grupları (% 69-72), 7. gün ise 20 ppm (% 83) ppm dozları kontrole göre anlamlı bir şekilde farklıdır. Bütün bulgular değerlendirildiğinde üretilen bu altın nanoparçacık gruplarının hücreler üstünde belirgin bir sitotoksik etkisinin olmadığı, ancak doz arttıkça hücre proliferasyon hızının azaldığı bulunmuştur.



Şekil 47. Altın nanoparçacıklarının (S7 grubu) 3T3 fibroblastlar üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi.

*: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p < 0.05$.

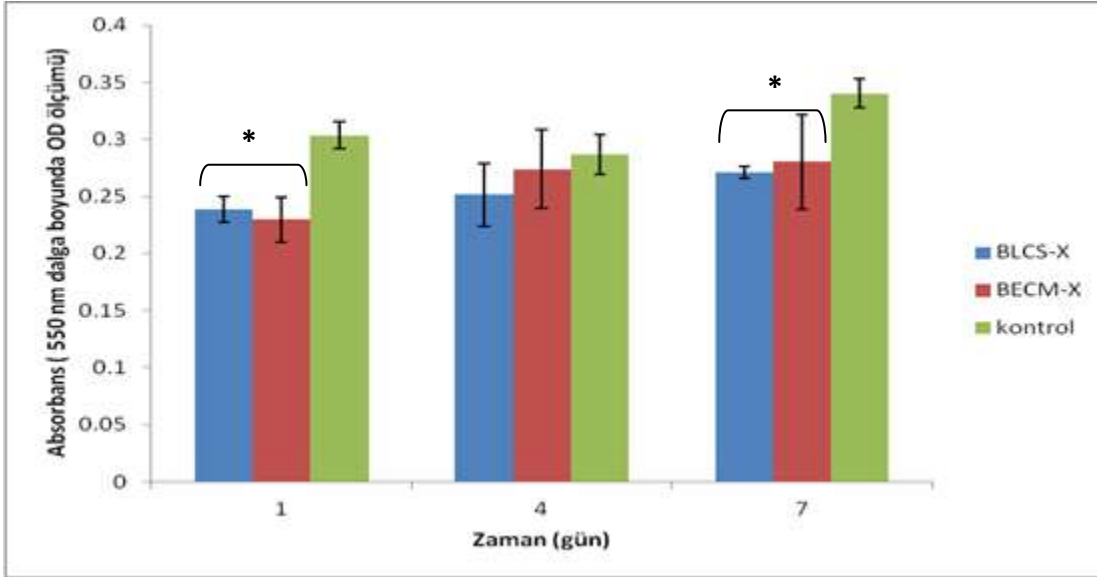


Şekil 48. Altın nanoparçacıklarının (S8 grubu) 3T3 fibroblastlar üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi.

*: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. #: Aynı zaman içinde gruplar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p < 0.05$.

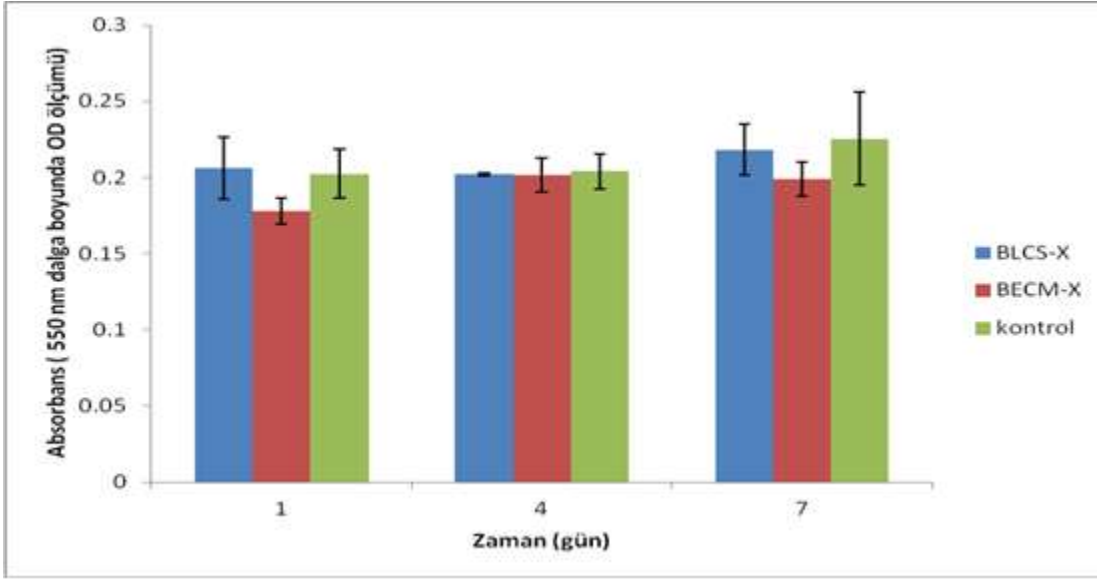
2.5.3. Altın Nanoparçacık ile Yüklü İskelelerin Sitotoksite Testleri (MTT Analizi)

Çapraz bağlı ve nanoaltın yüklü (S9) iskelelerden hücre kültür besiyerine farklı zamanlarda (1, 4 ve 7 günlük) salınan ürünlerin 3T3 fibroblastlar ve keratinositler üstündeki sitotoksik etkisine bakılmıştır (Şekil 49, 50). 1 ve 7 günlük BLCS-X ve BECM-X örneklerinin OD'si kontrol gruplarına göre anlamlı bir şekilde farklıdır. 4 günlük örnekler arasında anlamlı bir fark yoktur. Bütün bu sonuçlar değerlendirildiğinde test örneklerinin 3T3 hücreleri üstünde sitotoksik etkisi olmadığı görülmüştür (Şekil 49). BLCS-X ve BECM-X örneklerinden hücre kültür besiyerine farklı zamanlarda (1, 4 ve 7 günlük) salınan ürünlerin keratinositler üstünde sitotoksik etkisi olmadığı görülmüştür. Bu deneylerde keratinosit hücrelerinin artışında örneklerle kontrol grupları arasından anlamlı bir fark yoktur (Şekil 50).



Şekil 49. Altın nanoparçacıkları ile yüklü (S9 grubu) BLCS-X ve BECM-X iskelelerden farklı zaman periyotlarında (1, 4 ve 7 gün) salınan ürünlerin 3T3 fibroblastlar üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi.

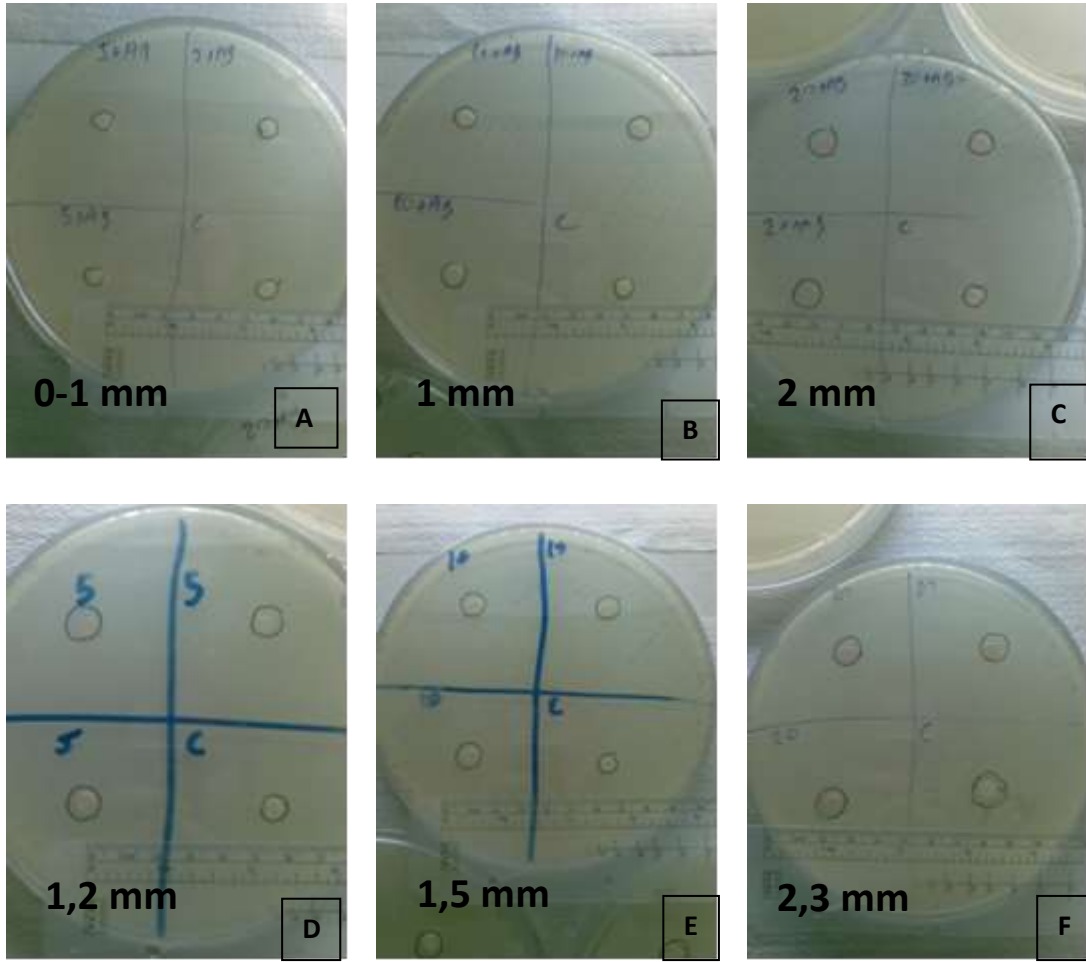
*: Aynı zaman içinde kontrol grubu ile arada anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. $p < 0.05$.



Şekil 50. Altın nanoparçacıkları ile yüklü (S9 grubu) BLCS-X ve BECM-X iskelelerden farklı zaman periyotlarında (1, 4 ve 7 gün) salınan ürünlerin keratinositler üstündeki sitotoksik etkisinin MTT analizi.

2.6. Altın Nanoparçacık Antibakteriyellik Testleri

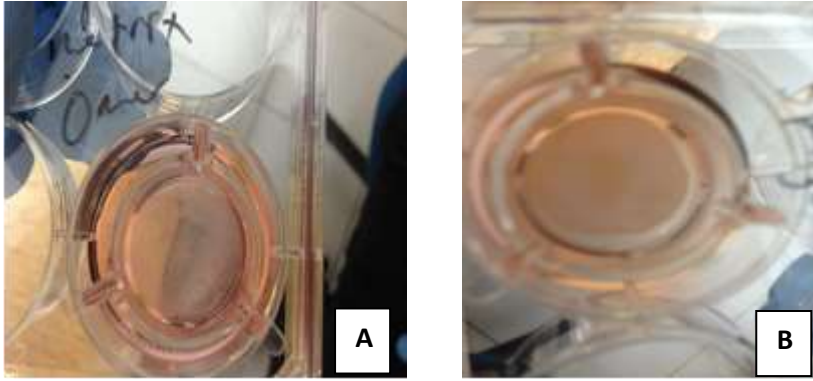
Altın nanoparçacıklarının *S.aureus* bakterisi üstündeki antibakteriyel etkisine, agar besiyerleri yüzeyinde bıraktığı şeffaf (bakteri büyümesini engelleyen) alan cetvelle ölçülerek bakılmıştır. Ölçüm sonuçları Şekil 51'de gösterilmiştir. Sadece nanoaltın içeren disklerin (6 mm) antibakteriyel etkisi nanoaltının konsantrasyonu (5 ppm- 20 ppm) arttırılınca artmıştır. Bu şeffaf alan en düşük konsantrasyonda nanoaltın içeren örneklerde belli belirsiz bir şekilde görülmüştür. Nanoaltının antibakteriyel etkisi antibiyotik eklenmesiyle birlikte daha artmıştır ve şeffaf alan daha belirgin bir şekilde görülmüştür. Bu sonuçlara göre S7 grubundaki nanoaltın ile yüklü disklerin (Şekil 51 A, B, C) S8 grubundaki altın ile yüklü disklerden (Şekil D, E, F) az bir farkla düşük antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu görülmüştür. Altının anti bakteriyel etkisinin daha belirgin gözlenebilmesi için Bunu daha iyi ölçülemek için nanoaltın ile birlikte antibiyotik de kullanılmış ve ikisinin birlikte etkisi ölçülmüştür. Altın konsantrasyonunun artığının antibiyotik etkisini arttırma eğilimi olduğu görülmüştür (bu sonuçlar rapora eklenmemiştir).



Şekil 51. Altın nanoparçacıkları ile yüklü disklerinin etrafında 1 gün sonra oluşan şeffaf zonun ölçülmesi (A, B, C; S7 grubu nanoaltının farklı dozlarını-5, 10, 20 ppm- içeren diskler. D, E, F; S8 grubu nanoaltının farklı dozlarını-5, 10, 20 ppm- içeren diskler

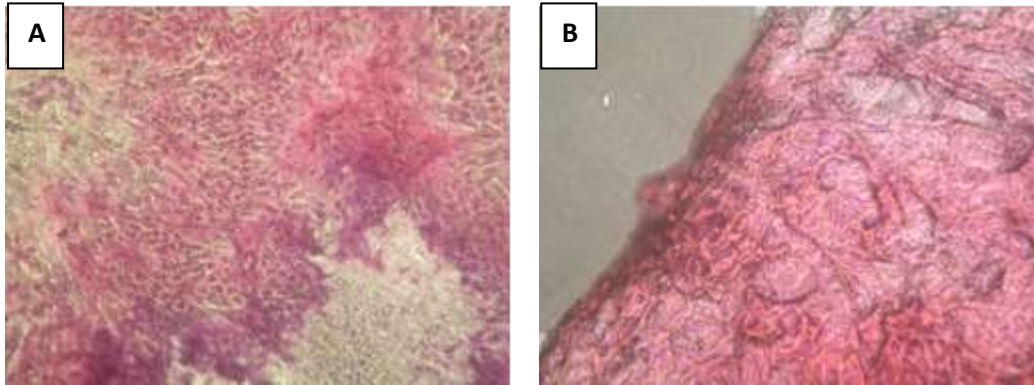
2.7. Deri İskelelerine Hücre Ekimi Çalışmaları (Ko-Kültür)

Hücre ekilmiş köpüğün nanofibröz matrikse kıyasla, hücre kültür vasatı içinde 37°C'de herhangi bir büzüşmeye uğramadığı görülmüş ve bu nedenle 5 günlük ko-kültür çalışmaları için daha uygun olduğu düşünülmüştür. Buna karşın nanofibröz matriksin aynı zaman zarfında hem boyutunda hem de kalınlığında azalma görülmüştür (Şekil 52). Bu nedenle, nanofibröz matriksin hücre ekim çalışmaları için daha kalın üretilmesi gerektiği anlaşılmıştır. İncert içinde filtre üstünde duran nanofibröz matriks alttan hücre kültür vasatını çekerken kalınlığındaki azalma yüzünden hava yüzüyle teması engellenmiştir.



Şekil 52. Hücre kültür insertleri içinde bulunan A) nanofibröz matriks, B) köpük fotoğrafları

Hemotoksilin ve Eosin boyaması yapılarak iskelerdeki hücrelerin görüntülenebilmesi için ODTÜ Merkezi laboratuvarında bulunan kriostatlı mikrotomla 10 μm 'luk kesitler alınması planlanmıştır. Ancak kriostatlı mikrotoma gönderilen örneklerden kesitler alınamamıştır. Bu nedenle nanofibröz matriks şeffaflaştığı için yüzeyinin boyanıp hücrelerin görüntülenmesi denenmiştir (Şekil 53 A). Yoğun bir keratinosit ve fibroblast hücre karışımı olduğu resimde net bir şekilde görülmektedir. Köpükten ise bir bistüri yardımıyla mümkün olduğunca ince kesitler alınmaya çalışılmış ve alınan bu kesitler Hemotoksilin ve Eosin boyaması yapıldıktan sonra lam ve lamel arasına sıkıştırılarak daha da inceltilmiş ve görüntü alınmıştır (Şekil 53 B). Hücre çekirdekleri (mor renkteki bölümler) görülmesine rağmen, kesitler yeteri kadar şeffaf olmadığı için hücreler arasında kesin bir ayırım yapmak güçtür.



Şekil 53. Ko-kültür çalışmaları yapılan A) nanofibröz matriks ve B) köpük üstündeki hücrelerin H& E boyaması ile görüntülenmesi. Pembe-kırmızı renk hücre sitoplazmasını ve kollajeni, mor renk ise hücre çekirdeğini göstermektedir.

Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada, deri yaralanmalarında kullanılabilecek iki katmanlı bir deri eşleniği tasarlanmıştır. Kronik ve akut deri yaralanmalarında kullanılan ticari ürünlere alternatif olabilecek ürünlere ihtiyaç vardır. Genel olarak kullanılan örnekler film, jel, köpük ve nanofibröz matriks şeklindedir. Özellikle köpük ve nanofibröz matriks formlarının deri doku mühendisliği uygulamaları için daha uygun olduğu düşünüldüğünden bu iki formda ürünler geliştirilmiştir. Bu projede iki farklı iki katmanlı deri eşleniği geliştirilmiştir. 1) Dermal katmanı liyofilize kollajen köpük, epidermal katmanı ise serisin/kollajen (1:2) membran olan iki katmanlı deri eşleniği (BLCS) ve bunun çapraz bağlı olanı (BLCS-X), 2) Dermal katmanı elektro-eğrilmiş kollajen matriks, epidermal katmanı ise serisin/kollajen (1:2) membran olan iki katmanlı deri eşleniği (BECM) ve bunun çapraz bağlı olanı (BECM -X). Bu iskelelere altın nanoparçacıkları yüklenerek ayrıca yapıların antibakteriyel özellik kazanması amaçlanmıştır. Yapılan laboratuvar karakterizasyon testlerine göre geliştirilen ürünlerden BLCS, BLCS-X ve BECM-X'in deri doku mühendisliği uygulamaları için uygun olduğu görülmüştür. Uzun vadede in vivo hayvan deneyleri ve ön klinik çalışmaların yapılması sonucunda, geliştirilen bu iskelelerin mevcut ticari ürünlere alternatif olabile potansiyelleri yüksektir.

Projenin birinci aşamasında, BLCS iskelelerin, daha sonraki aşamada da BECM iskelelerin laboratuvar testleri yapılmıştır. Bu testler; dengedeki su tutmaları (EDS), su buharı geçirgenliği hızı (WVTR), mekanik testler, hidrolitik ve in vitro biyobozunum testleri, morfolojik analizler (SEM), altın nanoparçacıklarının karakterizasyonları (CTEM, spektrofotometre) ve in vitro sitotoksitesite (MTT assay) ve antibakteriyellik çalışmalarıdır. Birinci optimizasyon çalışmalarından sonra, BLCS iskeleleri glutaraldehit çözeltisiyle (%3) and BECM iskeleleri de glutaraldehit buharıyla (%3) 2 saat boyunca çapraz bağlanmış ve BLCS-X, BECM-X iskeleleri olarak etiketlenmişlerdir. Çapraz bağlama işlemi iskelelerin hidrolitik ve in vitro biyobozunuma karşı direncini arttırmıştır. BLCS-X 37 °C'de fosfat tampon içinde 2 hafta boyunca neredeyse hiç bozunmazken, BECM-X 1 hafta içinde büyük oranda bozunmuştur. BECM-X iskelesinin dermal katmanının (nanofibröz matriks) 4 gün içinde tamamen bozunduğu, film katmanının ise hiç bozunmadığı gözlemlenmiştir. Diğer yandan, BLCS ve BECM sırasıyla 1 hafta ve 1 saat içinde tamamen çözünmüştür. Çapraz bağlı olmayan iskeleler (BLCS ve BECM), ve BECM-X iskelesinin dermal katmanının kollajenaz enzimi içinde 2 saat içinde tamamen bozunduğu; BLCS-X'in ise bozunuma 3 gün boyunca dayandığı görülmüştür. Bu testler sonucunda, BECM'in, doku mühendisliği uygulamaları için uygun olmadığı görülmüş ve bundan sonraki deneylerde sadece BECM-X'in analiz ve testleri yapılmıştır. Ayrıca daha

sağlam bir çapraz bağlı nanofibröz matriks elde edebilmek için in vitro çapraz bağlama metodunun denenmesi mümkündür. BLCS ve BLCS-X'in EDS değerleri arasında (10.26 ± 0.54 gr/gr ve 34.28 ± 2.84 gr/gr) anlamlı bir fark bulunmuştur. BECM-X'in EDS değeri (3.58 ± 0.58 g/g) bunlardan çok daha azdır. Nanofibröz matrikslerin daha az porlu yapıda ve yoğun olduğu bilindiğinden su tutma değerlerinin köpük yapıdaki iskelelere göre daha düşük çıkması beklenmektedir. BLCS, BLCS-X ve BECM-X'in WVTR değerleri (1300 gr/m²/day civarında) arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. WVTR değerleri, iskelelerin düşük-orta egzüde yaralar için uygun olduğunu göstermektedir. Çapraz bağlama işlemi iskelelerin hem çekme kuvvetini, hem de kırılma anındaki uzama oranını arttırmıştır; ama iskelelerin elastik modulus değerlerini istatistiksel açıdan anlamlı bir biçimde değiştirmemiştir. BECM-X'in mekanik özellikleri (çekme kuvvetini, kırılma anındaki uzama oranı ve elastik modulus) BLCS, BLCS-X iskelelere kıyasla derinin mekanik özelliklerine daha çok benzemektedir. Proje kapsamında farklı boyutlarda altın nanoparçacıkları sentezlenmiştir (10-100 nm). 10-50 nm boyutlarında ve 5-20 ppm'lik konsantrasyonlarda gerçekleştirilen ilk sitotoksisite deneylerine göre, düşük konsantrasyonlarda altın nanoparçacıklarının (5-10 ppm) hiçbir boyut grubu üzerinde sitotoksik etkisi yoktur. Ancak, sadece 50 nm boyuttaki grup, kontrol grubuyla (altınsız) yarışabilir düzeyde olumlu sonuçlar vermiştir. Bu sebeple, 20-50 nm arasında boyutları ve düzgün boyut ve şekil dağılımı olan altın nanoparçacıkları sentezlenmiştir. Bu yeni sitotoksisite deneylerine göre, hiçbir konsantrasyon (5, 10, 20 ppm) ve boyut grubunun (36, 42 nm) hücreler üstünde sitotoksik etkisi gözlemlenmemiştir ve iki boyut grubu da kontrol grubu kadar olumlu proliferasyon sonucu vermiştir. Genel olarak altın dozunun artışının keratinosit proliferasyonunda olumlu etki yarattığı söylenebilirken, 3T3 fibroblastlar üstündeki etkisi biraz olumsuzdur. Nanoaltın yüklü iskelelerden (BLCS-X, BECM-X) farklı zamanlarda (1, 4 ve 7 gün) çıkan ürünlere yapılan MTT analizleri sonucunda hücreler üstünde (3T3 fibroblast ve keratinosit) herhangi bir sitotoksik etki görülmemiştir. Antibakteriyellik testlerin sonucunda, disk diffüzyon metoduyla şeffaf alan ölçülmesi ile nanoaltının antibakteriyel etkisi görülmüştür.

Kaynaklar

- AKTÜRK O., Tezcaner A., Bilgili H., Deveci M.S., Gecit M.R., Keskin D., Evaluation of sericin/collagen membranes as prospective wound dressing biomaterial, *J. Biosci. Bioeng*, 112, 279-288, (2011)
- ARAMWIT P., and Sangcakul A., The effects of sericin cream on wound healing in rats, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71, 2473-2477, (2007).
- AUCOIN L., Griffith C.M., Pleizier G., Deslandes Y., Sheardown H., Interactions of corneal epithelial cells and surfaces modified with cell adhesion peptide combinations. *J Biomater Sci Polym Edn.* 13, 447-462, (2002).
- BALASUBRAMANI M., Kumar T.R., Babu M., Skin substitutes: a review, *Burns*, 27, 534-544, (2001).
- Boyce S.T., Design principles for composition and performance of cultured skin substitutes, *Burns*, 27, 523-533, (2001).
- BUTTAFOCO L., Kolkman N.G., Engbers-Buijtenhuijs P., Poot A.A., Dijkstra P.J., Vermes I., Feijen J., Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications, *Biomaterials*, 27, 724-734 (2006).
- CHEN P.J., Chang G.Y., Chen, J.K., Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. *Colloids Surface. A*, 313-314, 183-188, (2008).
- COURTMAN D.W., Errett B.F., Wilson G.J., The role of crosslinking in modification of the immune response elicited against xenogenic vascular acellular matrices, *J Biomed Mater Res*, 55, 576-586, (2001).
- DING T., Luo Z.J., Zheng Y., Hu X.Y., Ye Z.X., Rapid repair and regeneration of damaged rabbit sciatic nerves by tissue-engineered scaffold made from nano-silver and collagen type I. *Injury, Int. J. Care Injured*, 41, 522-527, (2010).
- DREZEK R., Lewinski N., Colvin V., Cytotoxicity of Nanoparticles Review, 4-1, 26-49, (2008).
- GRIFFITH M., Hakim M., Shimmura S., Watsky M.A., Li F., Carlsson D., Doillon C.J., Nakamura M., SUURONEN E., Shinozaki N., Nakata K., Sheardown H., Artificial human corneas: scaffolds for transplantation and host regeneration, *Cornea*, 21, 541-561, (2002).
- GÜMÜŞDERELİOĞLU M, Dalkıranoğlu S, Aydın RS, Cakmak S. A novel dermal substitute based on biofunctionalized electrospun PCL nanofibrous matrix, *J Biomed Mater Res A*, 98, 461-472, (2011).
- HAARER J.C, Dee K.C., Proteins and amino acid-derived polymers, *An introduction to biomaterials. The Biomedical Engineering Series*, ed: S.A. Guelcher and J.O. Hollinger, CRC Press, (2006). Pp. 122-128,

HAFEMANN B., Ghofrani K., Gattner H-G., Stieve H., Pallua N, Cross-linking by 1-ethyl-3-collagen/elastin membrane meant to be used as a dermal substitute: effects on physical, biochemical and biological features in vitro, *J Mater Sci Mater Med*, 12, 437–446, (2001).

HERNANDEZ-SIERRA J.F., Ruiz F., Pena D.C., Martinez-Gutierrez F., Martinez A.E., Guillon Ade J., Tapia-Perez H., Castanon G.M., The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold, *Nanomed, Nanotechnol. Biol. Med.*, 4, 237-240, (2008).

HUANG L., Nagapudi K., Apkarian R.P., Chaikof E.L., Engineered collagen-PEO nanofibers and fabrics. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 12, 979-993, (2001).

ISAAKS R., *Borrelia burgdorferi* bind to epithelial cell proteoglycans, *J Clin Invest*, 93, 809–819, (1994).

JANSSON K., Haegerstrand A., Kratz G., A biodegradable bovine collagen membrane as a dermal template for human in vivo wound healing, *Scand J Plast Reconstr Hand Surg*, 35, 369-375, (2001).

JONES I., Currie L., Martin R., A guide to biological skin substitutes. *British Journal of Plastic Surgery*, 55, 185-193, (2002).

JORGE-HERRERO E., Fernandez P., Turnay J., Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen, *Biomaterials* 20, 539-545, (1999).

KEARNEY J.N., Clinical evaluation of skin substitutes, *Burns*, 27, 545-551, (2001).

KHOR E., Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses, *Biomaterials*, 18, 95-105, (1997).

KOBAYASHI H., Ikada Y., Corneal cell adhesion and proliferation on hydrogel sheets bound with cell-adhesive proteins, *Curr Eye Res*, 10, 899–908, (1991).

KUNDU S.C., Dash B.C., Dash R., Kaplan D.L., Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: potential for biomedical and biotechnological applications. *Progress in Polymer Science*, 33, 998-1012, (2008).

LANONE S., Rogerieux F., Geys J., Dupont A., Malliot-Marechal E., Boczkowski J., Lacroix G., Hoet P., Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines, *Particle and Fibre Toxicology*, 6, 14, (2009).

Lee C.H., Singla A., Lee Y. ,Biomedical applications of collagen, *International Journal of Pharmaceutics* 221,1-22, (2001).

LEE J.E., Park J.C., Hwang Y.S., Kin J.K., Kim J.G., Suh H., Characterization of UV-irradiated dense/porous collagen membranes: morphology, enzymatic degradation and mechanical properties, *Yonsei Med J*, 42, 172-179 (2001).

LU S., Xia D., Huang G., Jing H., Wang Y., Gu H., Concentration effect of gold nanoparticles on proliferation of keratinocytes, *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 81, 406-411, (2010).

LV Q., Feng Q., Hu K., Cu F., Three-dimensional fibroin/collagen scaffolds derived from aqueous solution and the use for HepG2 culture, *Polymer*, 46, 12662–12669, (2005).

MA L., Gao C., Mao Z., Zhou J., Shen J., Hu X., Han C., Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering, *Biomaterials*, 24, 4833–4841, (2003).

MATTHEWS J.A., Wnek G.E., Simpson D.G., Bowlin G.L., Electrospinning of collagen nanofibers, *Biomacromolecules*, 3, 232-238, (2002).

MCKEON-FISHER K.D., Freeman J.W., Characterization of electrospun poly(L-lactide) and gold nanoparticle composite scaffolds for skeletal muscle tissue engineering, *J Tissue Eng Regen Med.*, 5, 560-568, (2011).

MI F.L., Wu Y.B., Shyu S.S., Chao A.C., Lai J.Y., Su C.C., Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release, *Journal of Membrane Science*, 212, 237-254, (2003).

NATH S., Kaittanis C., Tinkham A., Perez J.M., Dextran-coated gold nanoparticles for the assessment of antimicrobial susceptibility, *Anal. Chem.*, 80, 1033-1038, (2008).

O'BRIEN F.J., Harley B.A., Yannas I.V., Gibson L., Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds, *Biomaterials*, 25, 1077–1086, (2004).

OSBORNE C.S., Reid W.H., Grant M.H., Investigation into the biological stability of collagen/chondroitin-6-sulphate gels and their contraction by fibroblasts and keratinocytes: the effect of crosslinking agents and diamines, *Biomaterials*, 20, 283-90, (1999).

PAN Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Simon U., Schmid G., Brandau W., Jahn-Dechent W., Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles, *Nanoparticle Toxicity*, 3-11, 1941-1949, (2007).

PARK S-N., Kim H.O., Suh H., Evaluation of antibiotic-loaded collagen-hyaluronic acid matrix as a skin substitute, *Biomaterials*, 25, 3689-3698, (2004).

PARK S.N., Park J.C., Kim H.O., Song M.J., Suh H., Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking, *Biomaterials*, 23, 1205–1212, (2002).

PLOTHOWSKI M.C., Chevillard M., Pierrot D., Altemayer D., Zahn K.M., Colliot G., Puchelle E., Differential adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells in primary culture, *J Clin Invest*, 87, 2018–2028, (1991).

POWELL H.M., Supp D.M., Boyce S.T., Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes, *Biomaterials*, 29, 834-843, (2008).

PURNA S.K. Babu M., Collagen based dressings- a review, *Burns*, 26, 54-62, (2000).

RAMOS M., Castro M.C.R. ,Clinics in Dermatology, 20, 715-723, (2002).

RAY S., Mohan R., Singh J.K., Samantaray M.K., Shaikh M.M., Panda D., Ghosh P., Anticancer and antimicrobial metallopharmaceutical agents based on palladium, gold, and silver N-heterocyclic carbene complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, 48, 15042-15053, (2007).

RAYMOND Z., Pieter J.D., van Wachem Pauline B., Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen, *Biomaterials* 20, 921-931, (1999).

RHO K.S., Jeong L., Lee G., Seo B.M., Park Y.J., Hong S.D., Roh S., Cho J.J., Park W.H., Min B.M., Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing, *Biomaterials*, 27, 1452-1461, (2006).

SHAKESPEARE P.G., The role of skin substitutes in the treatment of burn injuries, *Clinics in Dermatology*, 23, 413-418, (2005).

SHARMA A., Tandon A., Tovey J.C.K., Gupta R., Robertson J.D., Fortune J.A., Klibanov A.M., Cowden J.W., Rieger F.G., Mohan R.R., Polyethylenimine-conjugated gold nanoparticles: Gene transfer potential and low toxicity in the cornea, *Nanomedicine Nanotechnology Biology and Medicine*, 11, 1-9, (2001).

SHUKLA R., Bansal V., Chaudhary M., Basu A., Ramesh R., Bhonde R.R., Sastry M., Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview, *American Chemical Society*, 21-23, 10644-10654, (2005).

SILVER F.H., Wound dressings and skin replacement. *Biomaterials, medical devices and tissue engineering: an integrated approach*, Chapman and Hall, London, (1994). Pp: 46-91,

STASHAK T.S., Farstvedt E., Othic A., Update on Wound Dressings: Indications and Best Use, *Clin. Tech. Equine Pract.*, 3, 148-163, (2004).

SUNG W.W., Hsu H.L., Shih C.C., Lin D.S., Cross-linking characteristics of biological tissues fixed with monofunctional or multifunctional epoxy compounds, *Biomaterials*, 17, 1405-1410, (1996).

Supp D.M., Boyce S.T., Engineered skin substitutes: practices and potentials, *Clinics in Dermatology*, 23, 403-412, (2005).

SWEENEY D.F., Xie R.Z., Evans M.D.M., Vannas A., Tout S.D., Griesser H.J., Johnson G., Steele J.G., A comparison of biological coatings for the promotion of corneal epithelialization of synthetic surface in vivo., *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 44, 3301–3309, (2003).

TİĞLİ R.S., Kazaroğlu N.M., Mav İ.Ş.B., Gümüşderelioğlu M., Cellular Behavior on Epidermal Growth Factor (EGF)-Immobilized PCL/Gelatin Nanofibrous Scaffolds, *J Biomater Sci Polym Ed.*, 22, 207-223, (2011).

TILLMANN B.W., Yazdani S.K., Lee S.J., Geary R.L., Atala A., Yoo J.J., The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction, *Biomaterials*, 30, 583-588, (2009).

TRAFNY E.A., Stepinska M., Antos M., Grzybowski J., Effects of free and liposome-encapsulated antibiotics on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to collagen type I, *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 2645–2649, (1995).

TSUBOUCHI K., Igarashi Y., Takasu Y., Yamada H., Sericin enhances attachment of cultured human skin fibroblasts, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, 403-405, (2005).

UMEMOTO T., Namikawa I., Binding of host-associated treponeme proteins to collagens and laminin: a possible mechanism of spirochetal adherence to host tissues, *Microbiol Immunol.*, 38, 655–663, (1994)

WESTERLUND B., Korbonen T.K., Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix, *Mol Microbiol*, 9, 687–694, (1993).

WITAYA-AREEKUL S., Prahsarn C., Development and in vitro evaluation of chitosan–polysaccharides composite wound dressings, *International Journal of Pharmaceutics*, 313, 123–128, (2006).

YEO I.S., Oh J.E., Jeong L., Lee T.S., Lee S.J., Park W.H., Min B.M., Collagen-based biomimetic nanofibrous scaffolds: preparation and characterization of collagen/silk fibroin bicomponent nanofibrous structures, *Biomacromolecules*, 9, 1106-1116, (2008).

ZHANG Y., Peng H., Huang W., Zhou Y., Yan D., Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.*, 325, 371-376, (2008).

ZHANG Y.Q., Applications of natural silk protein sericin in biomaterials, *Biotechnology Advances*, 20, 91-100, (2002).

ZHAORIGETU S., Yanaka N., Sasaki M., Watanabe H., Kato N., Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 71, 11-17, (2003).

ZHAROV V.P., Mercer K.E., Galitovskaya E.N., Smeltzer M.S., Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles, *Biophys. J.*, 90, 619-627, (2006).

ZHONG S., Teo W.E., Zhu X., Beuerman R.W., Ramakrishna S., Yung L.Y.L., An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture, *J Biomed Mater Res A.*, 79, 456-463, (2006).

ZHONG S., Teo W.E., Zhu X., Beuerman R., Ramakrishna S., Yung L.Y., Formation of collagen-glycosaminoglycan blended nanofibrous scaffolds and their biological properties, *Biomacromolecules*, 6, 2998-3004, (2005).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. DİLEK KESKİN
Proje No:	111M810
Proje Başlığı:	Deri Doku Mühendisliği: İki Katmanlı Nanoaltın Yüklü Deri Yedeklerinin Üretilmesi Ve Karakterizasyonu
Proje Türü:	Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	NUSRET TAHERİ
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. MÜHENDİSLİK F. MÜHENDİSLİK BİLİMLERİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/03/2012 - 01/03/2013
Onaylanan Bütçe:	25000.0
Harcanan Bütçe:	25000.0
Öz:	Projede, kollajen, PEO ve serisin proteinlerinden deri doku mühendisliği uygulamaları için iki katmanlı deri eşlenikleri (köpük ve elektroçözülmüş kollajen matrisi) geliştirilmiştir. Bunlara altın nanoparçacıkları yükleyerek, antibakteriyel özellik kazandırılmıştır. Biyomalzemelerin dengedeki su tutmaları (EDS), su buharı geçirgenliği hızı (WVTR), mekanik testler, hidrolitik ve in vitro biyobozunum testleri, SEM, in vitro sitotoksikite ve antibakteriyellik çalışmaları yapılmıştır. Sitotoksikite deneylerine göre, hiçbir konsantrasyon ve altın boyut grubunun (36, 42 nm) hücrelerde sitotoksik etkisi gözlemlenmemiştir.
Anahtar Kelimeler:	yara örtüsü, elektro-çözüme, liyofilizasyon, kollajen, serisin, altın nanoparçacık
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır