



**3 BOYUTLU ÇOK KATMANLI ELEKTROÇEKİM
YÖNTEMİYLE ÜRETİLEN NANOLİFLİ YÜZEYLERİN DOKU-
YAPI İSKELETİ OLARAK KULLANABİLİRLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yelit Suen DOĞRUOK



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**3 BOYUTLU ÇOK KATMANLI ELEKTROÇEKİM YÖNTEMİYLE
ÜRETİLEN NANOLİFLİ YÜZEYLERİN DOKU-YAPI İSKELETİ OLARAK
KULLANABİLİRLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yelit Suen DOĞRUOK

Prof. Dr. Aslı HOCKENBERGER
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TEKSTİL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2019

TEZ ONAYI

Yelit Suen DOĞRUOK tarafından hazırlanan “3 BOYUTLU ÇOK KATMANLI ELEKTROÇEKİM YÖNTEMİYLE ÜRETİLEN NANOLİFLİ YÜZEYLERİN DOKU-YAPI İSKELETİ OLARAK KULLANABİLİRLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Aslı HOCKENBERGER

Başkan : Prof. Dr. Aslı HOCKENBERGER
Bursa Uludağ Üniversitesi, Mühendislik
Fakültesi,
Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı
ORCID ID: 0000-0001-5186-9716

İmza

Üye : Prof. Dr. Hasan Basri KOÇER
Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa
Bilimleri Fakültesi,
Lif ve Polimer Mühendisliği Anabilim Dalı
ORCID ID: 0000-0003-2612-6712

İmza

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Şebnem DÜZYER GEBİZLİ
Bursa Uludağ Üniversitesi, Mühendislik
Fakültesi,
Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı
ORCID ID: 0000-0003-3737-5896

İmza

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü

22.10.19

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

22/09/2019

Yelit Suen DOĞRUOK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

3 BOYUTLU ÇOK KATMANLI ELEKTROÇEKİM YÖNTEMİYLE ÜRETİLEN NANOLIFLİ YÜZEYLERİN DOKU-YAPI İSKELETİ OLARAK KULLANABİLİRLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yelit Suen DOĞRUOK

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Aslı HOCKENBERGER

Nanolifler doğal hücre dışı matris (ECM) yapısını taklit edebilme, hücre çoğalmasına uygun ortam oluşturma, yüksek gözeneklilik ve spesifik yüzey alanı özellikleri sebebi ile doku iskeleleri ve medikal alanlarında kullanımları yaygındır. Yapılan araştırmalar sonucunda yara örtüsü, ilaç salınımı ve doku mühendisliği gibi alanlarda poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve Polikaprolakton (PCL) polimerlerinin biyobozunur ve biyoyumlu özellikleri sayesinde başarılı bir şekilde uygulandığı görülmüştür. Doku iskeleleri oldukça kompleks yapıda olup, çoklu katmanlardan oluşmaktadır ve üretim yöntemi olarak elektroçekim yöntemi yaygın kullanılmaktadır.

Bu çalışmada elektroçekim yöntemi ile üretilen PCL ve PLGA nanolifli yüzeylerin, 3 boyutlu ve çok katmanlı şekilde bir araya getirilerek deri doku mühendisliğinde kullanılabilirlikleri araştırılmıştır. Öncelikle PLGA ve PCL yüzeylerde elektroçekim aşamasında farklı parametreler denenerek hücre çoğalmasına destek olabilecek ECM yapısına benzer yüzey morfolojisine sahip yüzeyler oluşturulması amaçlanmıştır. Bu nedenle gözenekliliği ve lif inceliğini etkileyen farklı konsantrasyon, voltaj, besleme oranı ve sarım hızları belirlenerek nanolifli yüzeyler üretilmiştir. Üretilen yüzeylerin karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskobu (SEM), yüzey gözenekliliği ve gözenek boyutu analizleri ve temas açısı ölçümleri ile analiz edilirken, mekanik özelliği ise çekme testi ile analiz edilmiştir. Daha sonra üretilen yüzeyler üzerine normal insan fibroblast hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir. MTS analizi ve SEM analizi ile geliştirilen yüzeyler üzerinde hücre çoğalması durumu incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: elektroçekim, 3 boyutlu, doku iskeleti, polikaprolakton, polilaktik-ko-glikolik asit

2019, x+ 93 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

Search of Usability of Nanofiber Surfaces Produced by 3 Dimensional Multi-Layered Electrospinning Method As Tissue Structure

Yelit Suen DOGRUOK

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Textile Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ash HOCKENBERGER

Nanofibers have a wide variety of use as scaffolds in medical field due to their features of replicating ECM structure, providing proper environment for cell proliferation, high porosity and specific surface features. According to the studies, PLGA and PCL polymers are applied successfully, due to their biodegradable and biocompatible characteristics, as scaffold, wound-dressing, drug release and tissue engineering. Scaffolds are very complex structures which are formed of multilayers and they are manufactured, widely, using electro-spinning method.

We researched in this study, the usability of 3D and multilayer paired-up PCL and PLGA nanofiber layers manufactured using electro-spinning method in tissue engineering. First, by trying different parameters within electro-spinning phase on PLGA and PCL layers, we aimed to form similar layers with characteristics of surface morphology to ECM scaffold which can support cell proliferation. Therefore, we determined concentrations effecting the porosity and fiber thickness, voltage, feeding ratio, winding speed and manufactured nanofiber layers. The nanofiber surface characterization was analysed using SEM (Scanning Electron Microscope), surface porosity and contact angle and mechanical characteristics was analysed by a tensile/tension test. Then the human dermal fibroblast cells were seeded on the manufactured nanofiber surfaces and the cell proliferation study was performed with an MTS analysis and SEM analysis.

Key words: electrospinning, 3D, tissue scaffold, polycaprolactone, poly lactic co glycolic acid

2019, x + 93 pages.

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitim hayatım boyunca bilgi ve tecrübesiyle her konuda gösterdiği büyük ilgi ve destek için, üzerimde büyük emeği bulunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Aslı HOCKENBERGER'e,

Bu çalışmanın gerçekleşebilmesi için desteğini ve emeğini esirgemeyen, değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Şebnem DÜZYER GEBİZLİ'ye,

Tezimin disiplinler arası konusu sayesinde, araştırmama katkıda bulunan, deneyim ve bilgilerinden yararlandığım Dr. Havva TEZCAN ve Arş. Gör. Işıl Ezgi ERYILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bu zorlu ama ulaşılabilir dönem boyunca beni asla yalnız bırakmayan aileme, özellikle motivasyonumu her zaman yüksek tutmak ve her aşamada beni desteklemek için çabalayan sevgili eşim Timur Veysel DOĞRUOK'a teşekkürlerimi sunarım.

Yelit Suen DOĞRUOK

22/09/2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. DOKU MÜHENDİSLİĞİ	4
2.2. DERİ DOKU MÜHENDİSLİĞİ	10
2.3. DERİ YAPISI	14
2.3.1. Epidermis	15
2.3.2. Dermis	17
2.3.3. Hipodermis	18
2.4. DOKU İSKELETİ ÜRETİM YÖNTEMİ	19
2.4.1. Faz Ayrımı	22
2.4.2. Çözücü Döküm-Parçacık Uzaklaştırma	22
2.4.3. Gazla Köpüklendirme	23
2.4.4. Kendiliğinden Birleşme (Self-Assembly) Metodu	24
2.4.5. Dondurarak kurutma	24
2.4.6. Katı serbest form üretim teknikleri (SFFT) (3D yazıcılar, Bioplatterler)	25
2.4.7. Elektroçekim Yöntemi	26
2.5. DOKU İSKELETİNDE KULLANILAN POLİMERLER	35
2.5.1. Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) Polimerleri	37
2.5.2. Polikaprolakton (PCL) Polimerleri	39
2.6. DOKU İSKELETİNDE KULLANILAN HÜCRELER	40
2.6.1. Kök Hücreler	41
2.6.2. Fibroblastlar	42
2.6.3. Keratinositler	44
2.7. DOKU İSKELETİ TİCARİ ÜRÜNLER	46
3. MATERYAL VE YÖNTEM	49

3.1. Materyal.....	49
3.2. Yöntem	50
3.2.1. Elektroçekim Yöntemi	50
3.2.2. Nanolifli Yapılı Doku İskelelerin Karakterizasyonu	57
3.2.3. PLGA- PCL Doku İskelelerine Hücre Ekimi.....	61
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	67
4.1. Nanoliflerin Yüzey Karakterizasyonu Sonuçları.....	67
4.1.1. PLGA Nanolifleri Yüzey Karakterizasyonu	67
4.1.2. PCL Nanolifleri Yüzey Karakterizasyonu	69
4.2. SEM Analizi Sonuçları.....	70
4.3. Nanolifli Doku Çatılarının Yüzey Gözenekliliği Ölçümü	77
4.4. Temas Açısı Ölçümleri.....	79
4.5. Nanoliflerin Mekanik Karakterizasyonu Sonuçları.....	80
4.6. Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları	81
4.6.1. Hücre Hattının Karakterizasyon Çalışmaları ve MTS Analizi	81
4.6.2. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) analizi.....	83
5. SONUÇLAR.....	86
KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	93

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
ϵ -kaprolakton	Epsilon kaprolakton
μ	mikro
T _c	Kristalizasyon sıcaklığı
T _g	Camsı geçiş sıcaklığı
T _m	Erime sıcaklığı
V	Voltaj
V	Hacim
Θ	Temas açısı
v/v	Hacim/Hacim oranı
w/v	Ağırlık/Hacim oranı
Kısaltmalar	Açıklama
ECM	Extracellular Matrix (Hücre Dışı Matris)
DMF	Dimetilformamid
DCM	Diklormetan
THF	Tetrahidrofur
PLA	Poli Laktik Asit
PLGA	Poli (d,l-laktik-ko-glikolik asit)
PGA	Poli Glikolik Asit
PCL	Poli kaprolakton
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
UV	Ultraviyole
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tampon Çözeltisi)
MTS	Hücre Çoğalma Analizi
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
NSF	Ulusal Bilim Vakfı
EtOH	Etanol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Nanolifli doku iskelelerinin gözenekli yapısı (Fatemeh H. ve Hamid M. 2016)	6
Şekil 2.2 Doku mühendisliği yaklaşımı (Dvir 2014).....	8
Şekil 2.3 Deri katmanları genel görünümü (Akturk, 2015).....	11
Şekil 2.4 Deri doku mühendisliği yaklaşımı (Metcalf ve ark. 2007).....	12
Şekil 2.5 Deri Katmanları (https://www.dreamstime.com/layers-healthy-human-skin-hair-follicle-sweat-sebaceous-glands-epidermis-dermis-hypodermis-muscle-tissue-vector-image123014475 , 2019)	15
Şekil 2.6 İnsan Derisi (a) şematik epidermis katmanları (LCSD 2014) (b) epidermis katmanları histolojisi (UCSF 2014)	16
Şekil 2.7 Dermis katmanlı yapısı (https://slideplayer.com/slide/11716447/ , 2019).....	17
Şekil 2.8 a) PLGA-collagen çapraz bağlama yöntemi; b) ipek doku iskelesi gaz köpükleme metodu; c) PLA süper kritik CO ₂ ile muamele; d) 15% PLLA köpükleri faz ayrımı yöntemi; e) ısıtma yöntemiyle PGA liflerinin mesh yapıya getirilmesi; f) çapraz bağlama ile sünger matriksi; g) çapraz bağlama yöntemiyle köpük iskele yapıları; h) elektroçekim yöntemiyle üretilen PLLA/1,2-dikloretan doku iskeleleri; i) Stereolitografi tekniğiyle üretilen doku iskeleleri; j) 3d yazıcılarla üretilen kalsiyum silikat doku iskeleleri; k)FDM teknolojisiyle üretilen gözenekli doku iskeleleri; l) Bio plotter tekniğiyle üretilen PCL doku iskeleleri SEM görüntüleri (C. Dutta 2017).	20
Şekil 2.9 Faz Ayırma Yöntemi (Ramakrishna ve ark. 2005).....	22
Şekil 2.10 Çözücü dökümü/parçacık uzaklaştırma yönteminin şematik gösterimi (Duzyer 2014)	23
Şekil 2.11 3D yazıcılarla üretilen doku iskeleleri a)makroskopik görünümü, b)SEM görüntüsü (Wang 2016).....	25
Şekil 2.12 Taylor'ın elektroçekim deney düzeneği (Çınar 2013).....	27
Şekil 2.13 Elektroçekim Yöntemi (a) Sıvı polimer çözeltisi, (b) Yüksek voltaj güç kaynağı, (c) İğne ucunda damlacığın aldığı koni formu, (d)Jetin izlediği kararsızlık bölgesi, (e) Toplayıcı üzerinde oluşan nanolifli yüzey. (Doshi ve Reneker, 1993, Kozanoğlu 2006).....	28
Şekil 2.14 Artan voltaj ile kılcal boru ucundaki damlanın şeklinde meydana gelen değişiklik, (a) $\theta=110^\circ$, (b) $\theta=107^\circ$, (c) $\theta=104^\circ$, (d) $\theta=100^\circ$ 'deki damlanın şekli, (e) jetin fişkırması, (f) jetin sürekli hale gelmesi (Larrondo ve Manley 1981)	29
Şekil 2.15 Sırasıyla Glikolid ve Laktidler (Baykara 2009)	37
Şekil 2.16 Düşük Mw'lı PLGA Sentez Şeması (Baykara 2009)	37
Şekil 2.17 Yüksek Mw'lı PLGA Sentez Şeması (Baykara 2009)	37
Şekil 2.18 PLGA'nın Kimyasal Formülü (Baykara, 2009)	38
Şekil 2.19 PCL sentezi (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pcl_synthesis.png , 2019).	39
Şekil 2.20 Fibroblast hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (https://www.creative-bioarray.com/filter/fibroblast-cell-and-media-12.html , 2019).....	43
Şekil 2.21 Keratinosit hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (https://www.news-medical.net/health/Basal-Cells-Keratinocytes-and-Melanocytes.aspx , 2019).....	45
Şekil 3.1 Geliştirilmekte olan deri doku iskelesi	51

Şekil 3.2 Elektroçekim sisteminin şematik şekli ve üretilen iskelelerin hücre ekilerek kültürlenmesi.....	52
Şekil 3.3 U.Ü. Tekstil mühendisliği Laboratuvarı'nda bulunan elektroçekim düzeneği.....	53
Şekil 3.4 Electronic Digital Micrometer görüntüsü.....	53
Şekil 3.5 Carl Zeiss marka taramalı elektron mikroskobu.....	57
Şekil 3.6 a) KSV Attension ThetaLite Yüzey Gerilimi-Temas Açısı Ölçüm Cihazı b) U.Ü. Tekstil Mühendisliği Laboratuvarı'nda bulunan temas açısı ölçüm cihazı ile yapılan ölçümlerden bir görüntü.....	59
Şekil 3.7 Shimadzu marka AG-X PLUS model cihazı.....	60
Şekil 3.8 a. MTS Proliferasyonu- formazan kristallerine dönüşüm b. Hücre canlılığı göre renk değişimi (https://slideplayer.biz.tr/slide/11471433/ , 2019).....	63
Şekil 3.9 Berthold Technologies marka Tristar ² S LB 942 marka çoklu okuyucu (https://www.berthold-bio.com/microplate-readers/details/product/tristar2-lb-942/action/show.html , 2019).....	64
Şekil 3.10 RNA izolasyon aşamaları, b. DU-730 UV/Vis Spektrofotometre (Beckman Coulter) (http://www.exiqon.com/ls/documents/scientific/rna-isolation-kit-manual-cell-and-plant.pdf , 2019; https://www.opticsplanet.com/beckman-coulter-du-700-series-uv-vis-spectrophotometers-beckman-coulter-a23616.html , 2019).....	65
Şekil 4.1 PLGA1 kodlu yüzeylerin SEM görüntüleri.....	71
Şekil 4.2 PLGA2 kodlu yüzeylerin SEM görüntüleri.....	71
Şekil 4.3 PLGA3.3 kodlu yüzeylerin SEM görüntüleri.....	71
Şekil 4.4 PLGA3.1. kodlu yüzeylerin SEM görüntüleri.....	72
Şekil 4.5 PLGA3.2. kodlu yüzeylerin SEM görüntüleri.....	72
Şekil 4.6 PLGA3.4. kodlu yüzeylerin SEM görüntüleri.....	72
Şekil 4.7 PCL1 kodlu yüzeyin SEM görüntüleri.....	75
Şekil 4.8 PCL2 kodlu yüzeyin SEM görüntüleri.....	76
Şekil 4.9 PCL3 kodlu yüzeyin SEM görüntüleri.....	76
Şekil 4.10 3 katmanlı nanolif doku iskelelerinin 3 tekrarlı mekanik test analizi.....	80
Şekil 4.11 PCL1 ve PCL3 nanolif doku iskelelerinin hücre çoğalma görünümü.....	81
Şekil 4.12 PLGA3.3 nanolif doku iskelelerinin hücre çoğalma görünümü.....	82
Şekil 4.13 PCL1 kodlu yüzeylere ekilen fibroblast hücrelerinin 3. , 7. ve 14. gün SEM görüntüsü.....	83
Şekil 4.14 PCL3 kodlu yüzeylere ekilen fibroblast hücrelerinin 3. , 7. ve 14. gün SEM görüntüsü.....	84
Şekil 4.15 PLGA3.3 kodlu yüzeylere ekilen fibroblast hücrelerinin 3. , 7. ve 14. gün SEM görüntüsü.....	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Elektroçekim prosesine etki eden parametreler	29
Çizelge 2.2 Deri Doku İskeleleri Bazı Ticari Örnekler	46
Çizelge 3.1 PLGA ile Yapılan Çalışmalarda Daha Önce Elde Edilen Veriler	54
Çizelge 3.2 PCL ile Yapılan Çalışmalarda Daha Önce Elde Edilen Veriler	56
Çizelge 4.1 PLGA nanolifli yüzeylerin üretim parametreleri.....	69
Çizelge 4.2 PCL nanolifli yüzeylerin üretim parametreleri.....	70
Çizelge 4.3 Farklı parametrelerle üretim denemesi gerçekleştirilen PLGA nanoliflerin çapları.....	74
Çizelge 4.4 Farklı parametrelerle üretim denemesi gerçekleştirilen PLGA nanoliflerin kalınlıkları	75
Çizelge 4.5 Farklı parametrelerle üretim denemesi gerçekleştirilen PCL çapları ve yüzey kalınlıkları	76
Çizelge 4.6 PLGA ve PCL nanolifli yüzeylerin gözenekliliği ve gözenek boyutları	77
Çizelge 4.7 PLGA ve PCL nanolifli yüzeylerin temas açısı ölçümleri	79

1. GİRİŞ

Doku mühendisliği, hastalık ve yaralanmalar sonucunda fonksiyonunu kaybeden dokuları yenilemek ve fonksiyonlarını sürdürmek amacıyla mühendislik, tıp ve malzeme bilimi gibi birçok disiplinden yararlanarak biyomalzemeler, hücreler ve büyüme faktörleri kombinasyonlarıyla geliştirilen, gelecek vaat eden bir alandır.

Doku mühendisliğinde amaç doğal veya sentetik destek yapılar üzerine, yaşayan hücrelerin ekilmesiyle in vitro hücre kültürünü başlatmak, destek yapılar üzerinde gelişimini sağlamak ve organizmanın implante edilebilir parçalarını oluşturarak in vivo ortamda alıcıya trasplantasyonu gerçekleştirmektir (Mohd ve ark 2015; Nerem 1992). Doku mühendisliğinin son zamanlarda ilgi görmesinin en büyük sebebi, hayvansal dokuların vücut içerisine uygulanmasında insan vücudu tarafından reddi söz konusudur. Aynı durum, farklı materyallerden geliştirilmiş protezlerde ise doku gelişimine olanak sağlamaması ve yine insan vücudu tarafından reddedilmesi şeklinde görülmektedir.

Doku mühendisliği yaklaşımından yararlanarak geliştirilen doku iskeleleri, doğal ekstra sellüler matrisi (ECM) taklit ettiği ölçüde başarılı olduğu kabul edilir. Geliştirilen yüzeyler hücrelerin tutunma, büyüme ve çoğalma sürecini destekleyen bir yapı olmalıdır. Bu malzemelerin, iltihap oluşumuna neden olmaması, bağışıklık sistemine zarar vermemesi, kanserojen olmaması, hücre zehirlenmesine neden olmaması gereklidir. Bu sayede, implantasyon sonrası patolojik reaksiyonları tetiklemeyecektir (Martina 2007). Aynı zamanda geliştirilen yüzeylerin mekanik özelliklerinin uygulanan kişide normal aktivitelerini engellememesi ve yüzeyin kendisinin de deforme olmaması beklenmektedir. Doku oluşumu sağlandıktan sonra bu yüzeylerin vücut içerisinde parçalanabilir olmalıdır. Bu nedenle kullanılacak malzemenin biyolojik olarak bozunabilen yapıda olması gerekmektedir.

Doku mühendisliği alanında en çok çalışılan iskelet yapılar kemik, kırık, deri ve kas gibi dokulara yöneliktir. Deri, insan vücudunun en büyük organıdır ve 3 katmanlı yapısı sayesinde insan vücudunu mikrobiyal, mekanik ve kimyasal etkiler dış etmenlerden korur. Son 30 yılda insan derisini taklit eden doku iskeleti yapılarının geliştirilmesine

yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Doku yapı iskeleti doğal ekstra sellüler matrisin (ECM) görevini görerek, hücre bağlanmasını ve çoğalmasını destekleyen ideal yapılardır. İdeal bir doku iskeleti, hücreler için uygun fiziksel yapı sağlamalı, yeni hücre oluşumunu sağlamak için gözenekli olmalıdır (100 nm ve daha büyük çaplı, %80-90 gözenekli yapı).

Nanolifler sağladıkları yüksek yüzey gözeneklilik, geniş yüzey alan ve mekaniksel özellikler sebebiyle savunma tekstilleri, endüstriyel (filtrasyon) tekstiller, tarım tekstilleri ve tıbbi tekstiller gibi birçok kullanım alanı bulmuştur. Tıbbi tekstil uygulamalarında doku mühendisliği ve ilaç salınım uygulamaları en çok kullanıldığı alandır. Doku mühendisliği alanında yapılan araştırmalarda nanolif üretiminde en fazla kullanılan yöntemler; faz ayırma yöntemi, “self-assembly” kendiliğinden düzenlenme ve elektroçekim yöntemleridir.

Elektroçekim yöntemi, kullanım kolaylığı, diğer yöntemlere göre seri üretime daha yatkın olması, kullanımı çok geniş bir polimer çeşitliliği ile farklı alanlara yönelik uygulamalarda yüzeye istenilen fonksiyonelliğin kazandırılması gibi avantajları sayesinde en çok kullanılan teknik olmuştur. Elektroçekim yöntemi, polimere uygulanan elektrik alan sayesinde nanometreden mikrometreye kadar değişen elyaf çaplarıyla, düzenli ya da düzensiz yönelimli lifli tabakalar oluşturulması esasına dayanır. Diğer üretim yöntemlerinden farklı olarak parametrelerde yapılan değişiklikler ile istenilen özellikte yüzey morfolojisi ve gözenek çapı/çap dağılımı çalışılabilmektedir.

Ayrıca biyoaktif moleküllerin etkin yükleme yöntemleri kullanılarak normalden çok daha düşük bir dozda yükleme ile lokal olarak ve kontrollü bir şekilde salımına imkan vermesi, “multifonksiyonel” özellikteki bu sistemlerin doku mühendisliği araştırmalarında kullanım potansiyelini arttırmaktadır (Tıgılı ve ark. 2010).

Doku iskeleti çalışmalarında kullanılan biyopolimerler genellikle yapısal olarak doğal ve sentetik, fonksiyonel olarak da biyolojik olarak bozunur ve biyolojik olarak bozunmaz olmak üzere iki ayrı sınıfta değerlendirilir. Kolajen, elastin ve ipek gibi proteinlerden ve aljinat, kitosan ve hyaluronik asit gibi polisakaritler doğal ve biyobozunur polimerler iken; naylon, polietilen (PE), polipropilen ve poliakrilat, biyobozunmaz sentetik

polimerlerdir. PLA, poli (glikolik asit) (PGA), poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve poli (ϵ -kaprolakton) (PCL) ise doku mühendisliğinde en çok kullanılan biyobozunur sentetik polimerlerdir.

PCL düşük maliyet, yavaş bozunma oranı, iyi derecede viskoelastik ve reolojik özelliklere ve düşük immünojenliğe sahip bir polimerdir. PLGA ise, mükemmel biyouyumluluk ve iyi esnekliğe sahip en yaygın olarak kullanılan biyobozunur polimerlerden biridir ve medikal alanda kullanımında uzun bir geçmişi vardır. PCL ve PLGA Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış polimerler olduğundan; kırıkdam, kan damarı, kemik ve cilt doku mühendisliğinde büyük ilgi görmektedir.

Tüm bu bilgilerden yola çıkarak tez kapsamında derinin 3 katmanlı yapısını taklit edecek biçimde, her bir katman için farklı biyobozunur polimerlerden üretilen nanolifli yüzeylerin, doku-yapı iskeleti olarak kullanılabilirlikleri incelenmiştir. Çalışmada öncelikle PLGA ve PCL polimerlerinden elektroçekim yöntemiyle üretim aşamasında çeşitli parametreler denenerek bu parametrelerin doku-yapı iskelelerin yüzey morfolojilerine etkisi gözlenmiştir. Sonrasında karakterizasyon çalışmaları altında taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi yapılmış, yüzeylerin gözenek oranı ve çap dağılımına bakılmış ve temas açısı ile yüzey ıslanabilirliği ölçülmüştür. Doku-yapı iskelelerin mekanik özellikleri çekme testleri ile analiz edilmiştir. Son olarak karakterize edilen yüzey üzerine normal insan dermal fibroblast hücrelerin ekim işlemi gerçekleştirilerek, in vitro hücre kültürü deneyleri ile hücrelerin çoğalma durumu incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, önerilen tez kapsamında PLGA ve PCL nanolifli doku-yapı iskelelerinin deri doku mühendisliği alanında kullanılabilirliğinin incelenmesine yönelik yapılan literatür çalışmalarına yer verilmiştir. İlk olarak doku mühendisliği, derinin yapısı ve özellikleri hakkında bilgi verilmiş, deri doku hasarını tedavi etmek amacıyla geliştirilen deri doku iskeleleri çalışmalarına değinilmiştir. Bununla birlikte, doku-yapı iskeleti üretim yöntemleri, kullanılan polimerler, kullanılan hücreler ile ilgili yapılan kaynak araştırmaları hakkında bilgi verilmiştir. Ardından elektroçekim üretimi hakkında genel bilgi verilmiş ve deri doku mühendisliği alanında ticari olarak sunulan ürünler değerlendirilmiştir.

2.1. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Doku mühendisliği ilk kez Amerika Ulusal Bilim Kurumu tarafından 1987'de tanımlanmıştır (Mohd Hilmi & Halim 2015). 1960'lı yılların ortasında yanık tedavisi için yapay deri doku iskelesi olarak lifler kullanılmıştır. 1970'li yıllarda kanın pıhtılaşmasını sağlayan ajanların keşfedilmesiyle birlikte, organik polimerlerin ve jellerin biyouyumluluğu hakkında yeni araştırmaları doğurmuştur. 1981 yılında kondroitin ile çapraz bağlanma yoluyla elde edilen kollajen üzerine silikon ile kaplanarak yine yanık tedavisinde kullanılmıştır. Yaşanan gelişmeler, 1998 yılında modern doku mühendisliğinin temelini oluşturan, kök hücre teknolojisini geliştirmenin yolunu açmıştır. Hücre nakline yönelik doku iskelelerin işlevselliğini artırmak için yapılan araştırmalar hızla devam etmektedir (Sampath K. Nune ve ark. 2017).

Doku mühendisliği; konvansiyonel tedavilerin dezavantajlarını aşarak; doku ve organ fonksiyonunu iyileştirmek, korumak veya geliştirmek için biyolojik ikame maddelerin geliştirilmesine odaklanan mühendislik ve yaşam bilimleri ilkelerini uygulayan disiplinler arası bir alandır. Belirli bir hasar sonucunda ya da doğuştan gelen hastalıklar sonucunda hasar gören doku veya organlar yerine doku içerisinde yer alan ekstra sellüler matris (ECM) görevi görerek yeni hücre oluşumuna destek olan yapılardır. Geçtiğimiz yıllarda, bu spesifik alanın ilerlemesinin devam etmesi, halihazırda insanlarda kullanılan

(örn., Cilt ve kıkırdak) veya klinik denemelere giren (örn., Mesane ve kan damarları) implante edilebilir dokuların oluşturulmasına yol açmıştır.

Ekstra sellüler matris (ECM); kimyasal ve fiziksel olarak protein ve glikozaminoglikanların çapraz bağlanması ile oluşan ve hücrelerin göç organizasyonunu sağlayarak hücre oluşumunu destekleyen bir yapıdır. ECM'nin lifli ve gözenekli yapısı, hücre tutunması ve göçü üzerinde etkilidir. Sentetik ECM doku iskelelerin, benzer gözenekliliğe sahip bir şekilde hücrelerin göçünü sağlaması ve sinyallerin doğru hücrelere ileterek hücre oluşumunu destekleyici fonksiyonları taklit etmesi beklenmektedir.

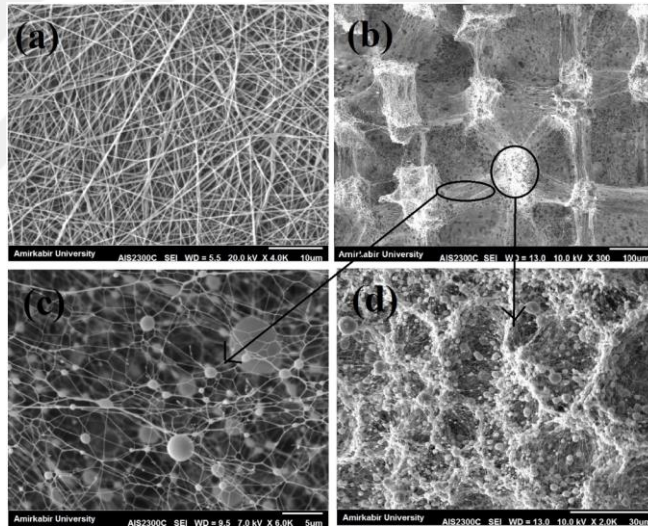
Biyomalzemeler, kök hücreler, büyüme faktörleri ve biyomimetik alanlardaki bilimsel gelişmeler, işlenmiş hücre dışı matris yapı iskelelerinin, hücrelerin ve biyolojik olarak aktif moleküllerin kombinasyonlarını üretmek için eşsiz fırsatlar yaratmıştır.

Doku iskeleleri; porlu, hidrojel yapılı, lifli, kompozit, mikrokürel ve hücreli olmak üzere farklı yapılarda geliştirilmektedir. Bu destek yapıların tipleri seçilirken özellikle hücre dağılımı, besinlerin difüzyonu ve hücrelerin hücre içi iletişimlerinin düzgün bir şekilde sağlanmasına dikkat edilmelidir (Vunjak ve ark 1998). Özellikle nanolifli doku iskeleleri ECM gibi nanoboyutta gözenek yapısına sahip olup, hücre tutunmasını, göçünü ve çoğalmasını sağlamaktadır. Bu nedenle kıkırdak, kemik, deri vb. uygulamalarda en çok tercih edilen doku-yapı iskeleti olarak karşımıza çıkmaktadır.

Doku mühendisliğinde yeni doku tasarım stratejisindeki en temel kriter; kullanılacak polimerin “biyouyumlu” olmasıdır. Seçilen malzemenin doku-yapı iskelelerinde iltihabı ve toksisiteyi önlemek için önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir. Ardından kullanılacağı dokuya/organa uygun hücre belirlenmesi ve uygulandığı alanda yeni hücre doku oluşumu sağladıktan belirli bir süre sonra vücut içerisinden atılabilen/parçalanabilir olan “biyobozunur” özellikte olmasıdır. Bu özellik, dokuların yenilenmesinin zamanında gerçekleşmesi açısından önemlidir. PLA, PGA ve PLGA gibi sentetik polimerler ve kitozan ve aljinat gibi birçok biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, medikal uygulamalarda yüksek oranda biyolojik olarak tamamlayıcılık göstermektedirler (Khang

ve ark. 1997). Doku iskelesinde kullanılan polimerlerin bozunma hızı; polimerin kimyasal yapısı, hidroliz sonucu ayrılabilen sağlam olmayan bağları, hidrofiliklik/hidrofobiklik seviyeleri, kristal yapıda olma veya olmama morfolojisi, kopolimer oranı ve moleküler ağırlığı gibi özelliklerine bağlıdır (Ye ve ark. 1997).

Doku iskelelerinin üç boyutlu yapısıyla, doku oluşumunu destekleyen bir yapı olmasının yanı sıra; hücrelerin tutunup çoğalabilmesi için yüksek gözeneklilik, gözenek boyutu ve geniş yüzey alanını sağlaması gerekmektedir. Yüksek gözeneklilik ve gözenek boyutu hücre ekimini kolaylaştırırken, hücre ve besinlerin yapı boyunca düzgün dağılımını ve taşınmasını sağlar. İdeal gözenek büyüklüğü; neovaskülarizasyon için 5µm (Brauker ve ark. 1995), fibroblastların büyümesi için 5-15 µm (Klawitter & Hulbert 1971), yetişkin memeli derisi geliştirmek için 20-125 µm olmalıdır (Yannas ve ark. 1989).



Şekil 2.1 Nanolifli doku iskelelerinin gözenekli yapısı (Fatemeh H. ve Hamid M. 2016)

Üç boyutlu doku iskeleleri organların ve dokuların normal işlevsel boyutlarında yenilenmesine olanak sağlar. Destek yapıların geometrisi hücre tutunması ve farklılaşması açısından çok önemlidir. Hücre yüzeyinde reseptörlerin tutunma bölgeleri; hücre farklılaşması, doku oluşumu ve yenilenmesi ile ilgilidir (Midwood ve ark. 2004; Tran ve ark. 2004).

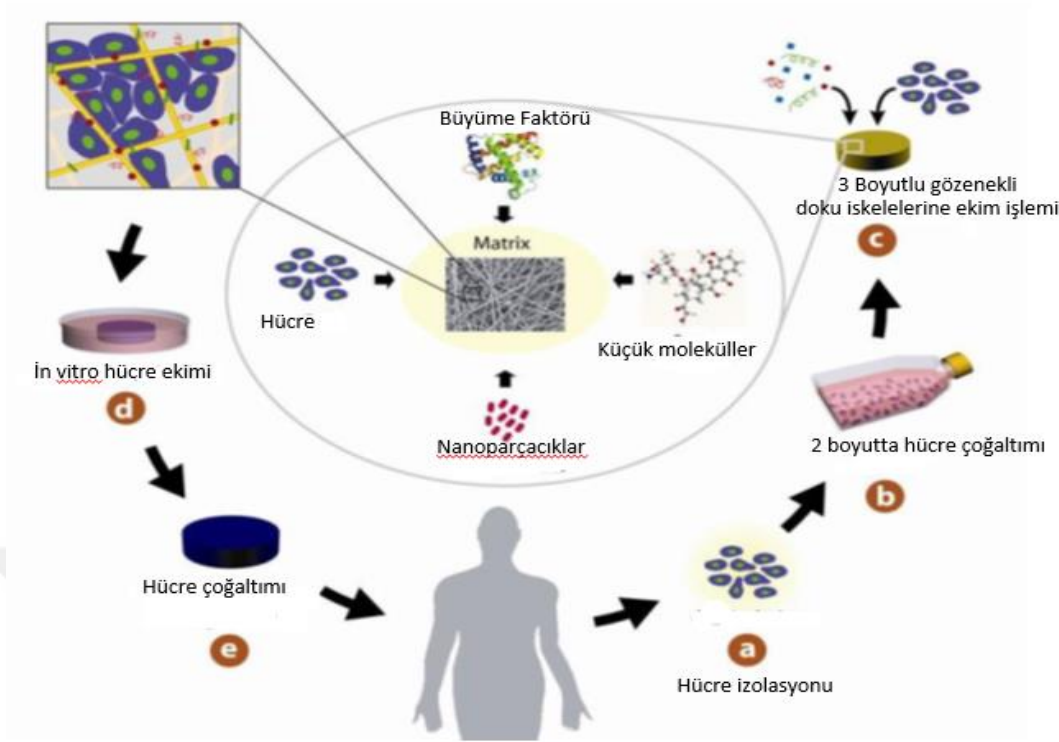
Özetle, doku iskeleleri;

- Hücre tutunması ve hücre oluşumu için, uygun gözenek boyutlarına sahip olması,
- Vücut içerisine implant aşamasında ve vücut içerisindeyken herhangi bir iltihaplı ya da toksik özellik oluşmasını önlemek için biyolojik olarak uyumlu olması,
- Yeni doku oluşumuna yardımcı olmak için biyolojik olarak parçalanabilir olması,
- Hücrelere uygun ortam sağlamak için iyi mekanik özelliklere sahip olması

gerekmektedir.

Bunlardan yola çıkarak temel strateji biyoreaktör teknolojilerinden de faydalanarak; üretilen doku iskelesini (yapay hücre dışı matris tabakası) doğal dokulara monte edebilirliklidir. Vücudumuzdaki her doku ya da organ, bir mikro çevre oluşturmak için bir hücre dışı matriste (ECM) bulunan parankimal hücrelerden (fonksiyonel hücreler) ve mezenkimal hücrelerden (destek hücrelerinden) oluştuğu için bu mantıklıdır. Bu mikro ortamlar topluca dokularımızı ve organlarımızı oluşturur. Dokuların ve organların geliştirilmesi ve bakımı açısından, vücudumuz "biyoreaktör" görevi görüp hücre ve ECM mikro ortamlarını biyomekanik kuvvetlere ve biyokimyasal sinyallere maruz bırakmaktadır (Barnes ve ark. 2008).

Temelde, farklı polimerlerle geliştirilen doku iskeleti üzerine laboratuvar ortamında hücre ekimi yapılır ve hücre çoğalması için uygun ortam şartları sağlanır. Hücre çoğalmasının sağlanmasıyla vücuda implante edilen doku iskeletinin vücut içerisinde uyum sağlaması ve doku gelişimi sağlandıktan sonra vücut içerisinde atılması beklenmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Doku mühendisliği yaklaşımı (Dvir 2014)

Doku iskelelerine in vitro ortamda ekilen hücrelerle doku rejenerasyonu 3 temel işlemde incelenmektedir;

1. 3- boyutlu doku iskelelerinin hazırlanması,
2. Hücrelerin tutunmasını sağlamak ve biyouyumluluklarını arttırmak üzere yüzey modifikasyonu gerçekleştirmek,
3. Hücrelerin çoğalarak, doğal doku oluşumunu sağlaması

şeklindedir.

Bu nedenle öncelikle iskelenin uygulanacağı doku tipine göre gerekliliklerin belirlenmesi, bunun neticesinde uygun polimer ve hücre seçimi yapılması gerekmektedir.

Fonksiyonel doku mühendisliği ürünlerinin geliştirilmesi için ECM'yi taklit edebilecek bir doku iskelesi gerekir. Doku mühendisliğindeki güncel araştırmalar neticesinde, in vivo ya da in vitro olarak, biyolojik olarak parçalanabilir bir iskele yapısı içerisinde hücrelerin yeni dokular oluşturmaya yönelik pek çok yöntem geliştirilmiştir.

Nanoteknolojinin gelecek kuşağın gelişiminde önemli bir bileşen olacağı öngörülmektedir (Barnes ve ark. 2008).

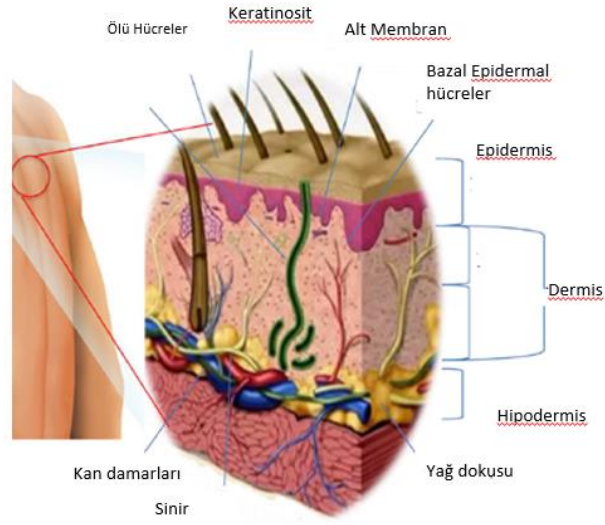
Doku mühendisliğinde bilim insanları doku iskelesi ve yaralı onarım / bakım ürünlerinin geliştirilmesine yönelik bir çözüm olarak nanoteknolojiye, özellikle nanoliflere yönelmişlerdir. Günümüzde, sadece birkaç işlem tekniği, nano ölçekte lifli doku iskeleleri başarıyla üretebilir. Doku mühendisliği uygulamaları için bu nanolifli yapıların karakterizasyonu, hücre-ECM etkileşimlerini anlamada çok önemlidir (Barnes ve ark. 2008).

Elektroçekim yöntemiyle üretilen nano ölçekli yapı iskelelerinin avantajları; yüksek yüzey / hacim oranı, yüksek gözeneklilik sayesinde gözenek daha iyi hücre tutunabilirliği, kolay tekrarlı üretilebilirlik ve çok çeşitli polimerlerle çalışma fırsatı sunun bir yöntemdir. Nanolifli iskele mimarisi, doğal ECM dokusunu tam anlamıyla taklit eder; bu nedenle, elde edilen hücre-matris etkileşimlerini in vitro olarak güçlendirir (Kaur 2019).

2.2. DERİ DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Deri doku mühendisliği, “deri dokusunda meydana gelen hasarların giderilmesi” ne yönelik araştırmaların yapıldığı alt bir disiplin dalıdır. Bir kadavradan alınan deri parçaları, bağışıklık sisteminin etkisiyle vücut tarafından birkaç hafta içinde reddedilebilmektedir. Sentetik malzemeler ise vücut tarafından yabancı olarak algılanarak bağışıklık sistemini harekete geçirmektedir. Bu nedenlerden dolayı, vücudun rahatlıkla kabul edeceği ve her an temin edilebilecek deri ikamelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen deri yapı iskeletleri bu ihtiyaçları karşılamaktadır (Kazaroğlu 2009).

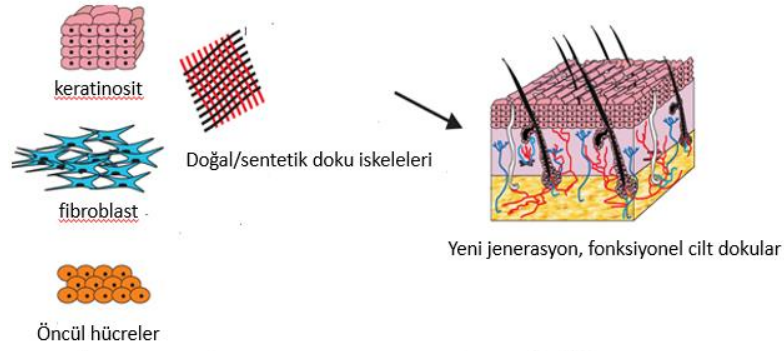
İnsan vücudunun en büyük organı olan deri, mikroplar ve çeşitli patojenlere karşı vücudun ilk savunma hattı olarak görev yapmaktadır. Ek olarak deri; termoregülasyon, nem tutma, bağışıklık koruması, hissi sağlama ve kendini iyileştirme gibi çeşitli işlevleri yerine getirir. İnsan derisi üç katmandan oluşur: epidermis (en dışta), dermis (ortada) ve hipodermis (daha derin). Epidermis, bazal proliferatif tabakaya sınırlı melanositler ve epidermal kök hücreleri ile birlikte farklılaşma aşamalarında bulunan keratinositlerden oluşan, 0.2 mm kalınlığında, paketlenmiş haldeki hücre kılıfıdır. Ayrıca, epidermisin içinde 4 katman, yani, stratum bazal, stratum spinosum, stratum granulozum, stratum korneum bulunur. İkinci katman olan dermis, cilde duyuşal ve mekanik özellikler kazandırır. Epidermis ve dermis arasında, bir ECM bileşimine (kolajen III, IV ve VII; lamininleri ve fibrilini oluşturan) sahip olan ayırıcı bazal membran tabakası mevcuttur. En alttaki katman olan hipodermis (deri altı tabaka), adipoz dokudan oluşur ve cildin mekanik ve termoregülatör özelliklerini kontrol eder (Kaur 2019) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Deri katmanları genel görünümü (Akturk, 2015)

Dünya Sağlık Örgütü' ne (WHO) göre yanıklardan kaynaklanan ölümcül yaralanmalar sonucunda yılda yaklaşık 180.000 ölüm meydana gelmektedir. Sadece Hindistan' da yılda orta ila ciddi yanıktan muzdarip 1.000.000' den fazla insan vardır. Küresel yara bakım pazarının 2017 yılında 18,35 milyar USD' den 2022 yılına kadar 22,81 milyar USD' ye yükselmesi beklenmektedir. Tedavi maliyetinin çok yüksek olmasının yanı sıra, uzun süreli tıbbi bakım gerekliliği ve duygusal travma gibi maddi ve manevi zararları bulunmaktadır (Kaur 2019).

Son 30 yılda insan derisini taklit eden yerine geçen maddeleri geliştirmek için birçok çalışma yapılmıştır. Bu 3 boyutlu yapılar, akut ve kronik yaraların iyileşmesini desteklemek amacıyla klinik vakalarda kullanılmakta ve hücre matrisi etkileşimlerini sağlayan mikro ortamları oluşturmaktadırlar. ECM' nin karmaşık yapısı ve derinin katmanlı yapısı, geleneksel doku mühendisliği yaklaşımlarını kullanarak doğal cilt yapısını taklit etmeyi zorlaştırır (Kaur 2019).



Şekil 2.4 Deri doku mühendisliği yaklaşımı (Metcalf ve ark. 2007)

İdeal bir deri doku iskelesi; hücre bağlanmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlamak için uygun fiziksel ve kimyasal yapıya ve yüzey özelliklerine sahip olmalıdır. Bu yapıları üretmek için çeşitli doğal ve sentetik malzemeler kullanılarak, hedef doku ihtiyacına yönelik hücrelerle bir araya getirilir (Kaur 2019).

Deri doku iskelesinde deri anatomisinin hiyerarşik karmaşıklığı; malzeme özellikleri (sertlik, pürüzlülük, ıslanabilirlik) ve bozulma oranı bakımından bileşimsel uyumsuzluk; çeşitli hücre sayıları, hücre tipleri, her katmandaki matris gradyanları, çeşitli bağışıklık tepkileri ve çeşitli üretim yöntemleri gibi biyolojik komplikasyonlar gösterebilmektedir. Ek olarak, hastaya özgü deri ikamelerinin üretilmesi için yeni biyomalzemelerin bulunmasıyla birlikte, artan işlem maliyetleri, ölçeklenebilirlik ve in vivo koşullar altında yapıların stabilitesi ile ilgili konular bazı endişelere yol açmıştır (Kaur 2019).

Deri dokusu mühendisliği, verimli deri rejenerasyonu için gerekli tüm biyokimyasal mekanizmaları ve morfolojik özellikleri sağlayan biyomimetik yapı iskelelerinin geliştirilmesini sağlar. Nanoyapılı malzemeler nano ölçekli ve gözenekli lifli yapısı sayesinde, hücrelerin yapışabileceği, çoğalabileceği, serbestçe göç edebileceği ve yeni doku oluşumunu doğal hücre dışı matrise (ECM) yakından benzeyen yapıların geliştirilmesine izin verdiği tercih edilen yapılardır. Günümüzde ticari olarak halen deri ikamesi yerine biyolojik olarak emilemez yapılar kullanılmaktadır. Bu nedenle, yeni oluşturulan doku tarafından yavaşça emilebilen ve geçici konak vazifesini görerek hücre oluşumu için tüm gereklilikleri sağlayan biyolojik olarak emilebilir iskelelerin geliştirilmesine daha fazla odaklanılmaktadır (Keirouz 2019).

Doku iskele üretimi için farklı yöntemler vardır ve elektroçekim yöntemi en kolay ve en ekonomik yöntemlerden biridir. 1930'lu yıllardan beri, elektroçekim işlemi, farklı polimerlerden doku iskelesi üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanılacak doku tipine göre gözeneklilik, biyouyumluluk, yüksek spesifik yüzey alanı ve iyi mekanik özelliğe sahip mikro-nanolif tabanlı iskeleler üretir. Yapısal olarak, kimyasal olarak ve mekanik olarak, dokuların benzeri bir hücre dışı matrisi (ECM) taşırlar (Ghosal ve ark. 2016).

Elektroçekim üretimi, malzeme seçimindeki esneklik, biyobozunurluk, biyoaktivite ve antimikrobiyal/bakteri aktivitesi gibi fonksiyonel materyal özelliklerini ayarlamayı mümkün kılar. Poliglikolik asit (PGA), polilaktik asit (PLA) ve bunların kopolimerleri olan poli (laktid-ko-glikolid asit) (PLGA), poli (ϵ - kaprolakton) (PCL) ve poliüretan (PU) gibi sentetik polimerler, elektroçekim yöntemiyle doku iskeleleri ve yara örtüleri gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kollajen, fibronektin, laminin, aljinik asit ve kitosan gibi diğer doğal polimerler de nanofiber iskele üretmek için elektrospunlanabilir (Ghosal ve ark. 2016). Doku mühendisliği uygulaması için kullanılan en yaygın sentetik polimerler, polyester ailesidir.

Doku mühendisliğinde kullanılan deri ikameleri genellikle epidermis ve dermis tabakalarında oluşan defektleri tedavi etmeye yönelik yaklaşımlar içermektedir. Epidermal tabakanın rejeneratif, dermal tabakanın non-rejeneratif olmasından dolayı, dermal tabaka olmadan yapılan tedavilerin kullanım alanı sınırlıdır. Dermis tabakası, yapısında kollajen ve elastin yapıları, kapiler kan damarları, sinirler, kıl kökleri gibi bileşenler barındırdığından, yapısal ve işlevsel olarak orjinaline yakın bir dermis tabakası oluşturmanın birçok zorluğu mevcuttur (Kazaroğlu 2009).

Üç katmanlı deri yapılar, doğal insan derisine en yakın taklit yapılar olarak kabul edildiğinden son yıllarda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Dermis ve epidermis ile birlikte hipodermal adipoz dokuyu içeren yapılar geliştirilmeye olanak bulunmuştur. Kober ve diğ. sırasıyla hipodermis, dermis ve epidermisin eşdeğeri için adipoz türevli kök hücreleri (ADSC'ler), fibroblastları ve keratinositleri fibrin matrisinde biriktirerek fibrin esaslı üç katlı bir deri yapısını üretmiştir. Yapay dokular, doğal insan derisine benzer bir

morfoloji göstermiştir. Başka bir grup, benzer bir hücre kombinasyonu kullanılarak tasarlanan üç katmanlı bir cilt yapısı için insan plazması kullanmıştır (Kaur 2019).

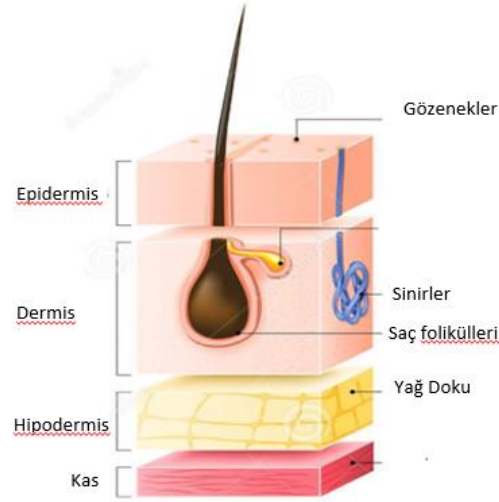
Kısaca deri doku mühendisliği ile geliştirilecek iskeleler (i) uygun mekanik özelliklere sahip olmalı, (ii) uygulama sonrası hızlı doku oluşumunu desteklememeli ve (iii) ayrıca güçlü bir dermis-epidermis bağlantısı yaratmalıdır.

2.3. DERİ YAPISI

Deri, insan vücudunun en büyük organıdır ve insan vücudunu dış ortamdan gelecek etkilere karşı koruma görevi görmektedir. Vücudu, patojenlere, mikroorganizmalara, termal, mekanik ve kimyasal etkilere karşı korurken, vücut ısısını da muhafaza etmektedir. Ağırlığı, yetişkin bir insanda vücut ağırlığının %10'una kadar ulaşabilirken yüz ölçümü ise 1,8-2 m² arasında değişmektedir. Derinin kalınlığı da vücutta bulunduğu bölgeye göre değişiklik göstermektedir. Bu 0,5-2 mm arasında olmasına rağmen, el içi ve ayak tabanında 4-6 mm'ye kadar kalınlaşabilir, göz kapaklarında ise 0,1 mm'ye kadar incebilir (Dalkıranoglu 2011).

Anatomik olarak deri 3 tabakadan oluşur; epidermis (cildin dış katmanı-estetik görünümü sağlayan yapı), dermis (ara katman- cildin mekanik desteğini sağlayan yapı) ve hipodermis (en alt katman- subkutan yağ tabakası) (Şekil 2.5).

- Epidermis tabakası içerisinde; Keratinosit, melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri bulunur.
- Dermis tabakasında; kan damarları, sinir uçları, saç/kıl kökleri, ter ve yağ bezleri içerir.
- Hipodermis tabakasında; özellikle yağ tabakasının bulunduğu bölgedir. Kan damarları ve sinirler bulunur.



Şekil 2.5 Deri Katmanları (<https://www.dreamstime.com/layers-healthy-human-skin-hair-follicle-sweat-sebaceous-glands-epidermis-dermis-hypodermis-muscle-tissue-vector-image123014475>, 2019)

2.3.1. Epidermis

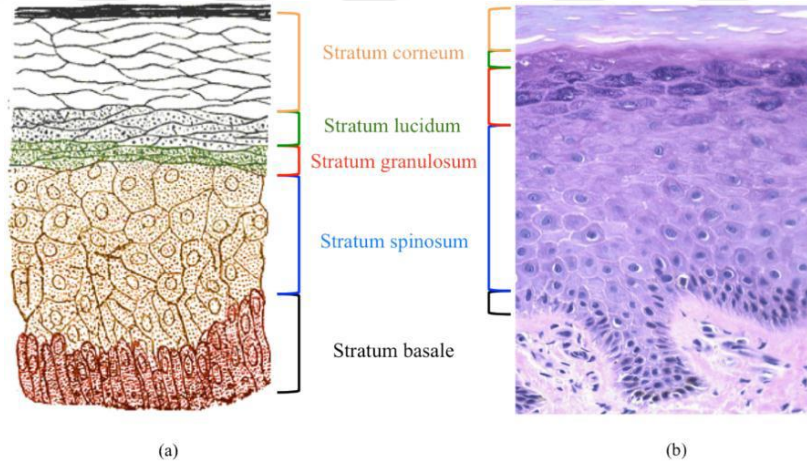
Derinin en dış katmanı olup, aşırı su kaybını önlemek, UV ışınlarına karşı korumak ve vücudu toksinlerden korumak işlevleridir. Epidermis tabakası içerisinde kan damarları yer almamaktadır. Keratinositler epidermisin %95'ini oluşturan hücreler olup, kendi içerisinde üstten aşağıya; stratum bazal>stratum spinosum>stratum granulosum>stratum korneum şekilde 4 farklı tabakadan oluşmaktadır.

Stratum bazal: Keratinosit ve keratin hücreleri en dış tabakada yer almaktadır. Keratinosit hücreleri mitoz yoluyla bölünerek çoğalır; bir keratinosit bazal tabakada kalırken, diğeri göç yoluyla üs tabakaya göç eder. Keratinositlerin yanı sıra bağışıklık sisteminin ön savunması olan Langerhans hücreleri, sinir uçları ile bağlı olan Merkel hücreleri ve melanin pigmentinden ve UV radyasyonu absorblanmasından sorumlu melanositler (pigmentasyondan sorumlu) bulunmaktadır (Dalkıranoğlu 2011).

Stratum spinosum: Stratum bazal üzerinde yer alan keratinositler, stratum spinosumunu oluşturmak için çoğalır (Balasubramani ve ark. 2001). Keratinositler üst yüzeye ulaştıklarında yapısal olarak farklılaşarak keratin sentezlemeye başlar.

Stratum granulosum: Stratum spinosumun yukarısında, granüler hücrelerin düzleştiği ve sitoplazmalarının keratohyalin granüllerinin, düzensiz boyut ve şekilde doldurulduğu stratum granulosum bulunur. Keratinositler bu tabakaya geçtiklerinde yapısal değişiklikler göstermeye ve keratin sentezlemeye devam ederler.

Stratum korneum: Epiderminin en dış katmanı ve hücrelerin öldüğü kısım stratum korneumdur. Stratum korneumun kalınlığı, vücudun bir bölgesi için gereken koruma miktarına bağlı olarak değişir (Murphy 2004). Bu katmanda içi tamamen keratinle dolu korneosit adı verilen ölü hücreler bulunmaktadır. Korneositler, yeni hücre oluşumuna yer açmak üzere deri yüzeyinden pulcuklar halinde ölü derileri uzaklaştırmaktadır.

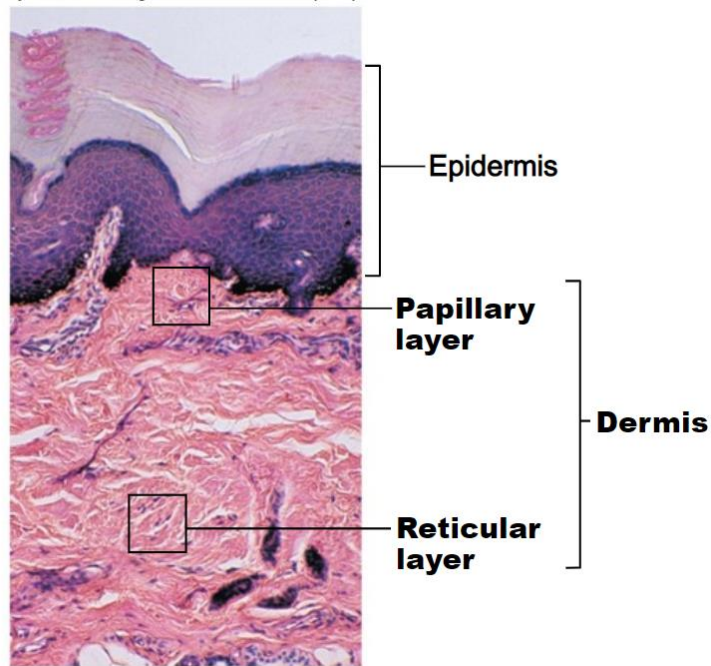


Şekil 2.6 İnsan Derisi (a) şematik epidermis katmanları (LCSD 2014) (b) epidermis katmanları histolojisi (UCSF 2014)

2.3.2. Dermis

Dermis, derinin mukavemetini, esnekliğini ve elastikiyetini sağlar. Hasar gören epidermisin onarımı için gerekli tüm bileşenlere sahiptir. Dermisi oluşturan ana hücre ise fibroblasttır ve düzensiz bir dokudur. Kollajen tip I' ce zengin olan bu tabakada; elastin, fibrilin, hyaluronik asit ve proteoglikanlar olan ekstra sellüler matriks içerikleri bulunur. Kollajen lif demeti halinde deriyi güçlendirerek sağlıklı olmasını sağlarken, elastin lifleri cildin esnekliğinden sorumludur (Geesin ve Berg 1991). Makrofajlar, trombositler ve kök hücreler de dermisin içinde bulunur (Silver 1994).

Dermis; papiller dermis ve retiküler dermis olmak üzere iki kısımdan oluşur. Retiküler dermis papiller dermise göre daha asellülarize (hüresiz) yapıdadır ve içerdiği kollajen ile elastin fibrillerden dolayı adeta yoğun bir ağ örgüsü formundadır. Bu özelliğiyle, retiküler dermis deriye elastikiyet ve gerginlik sağlar (Dalkıranoglu 2011).



Şekil 2.7 Dermis katmanlı yapısı (<https://slideplayer.com/slide/11716447/>, 2019)

Dermis, hücre göçü için bir iskele görevi görür. Besin ve oksijen iletiminin geçişini kontrol eder. Bu önemli yaşamsal fonksiyonlara ek olarak dermis, kan akışını kontrol ederek cildin ısınısını da düzenler ve yapı içerisinde hissi sağlayan sinirleri içerir (dokunma, ağrı, sıcak ve soğuk) (Falanga ve Faria 2007).

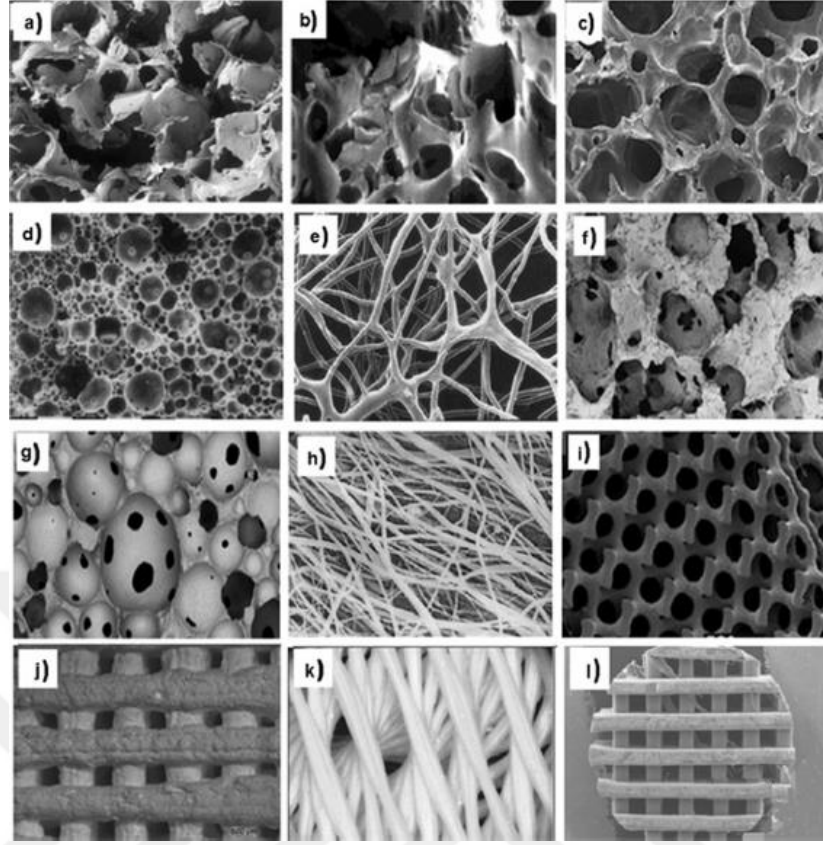
2.3.3. Hipodermis

Derinin en alt tabakası olan hipodermis adiposit denilen, yağ hücrelerinin meydana gelir (Ryan ve ark. 2007) Cildi altta yer alan organlara bağlayan yapı, daha büyük kan damarları ve sinirler içerir, böylece cildin termoregülasyonuna ve mekanik özelliklerine de katkıda bulunur (Metcalf ve ark. 2007).

2.4. DOKU İSKELETİ ÜRETİM YÖNTEMİ

Doku iskeleti hasar gören dokuların tedavi edilmesi ve yeni doku oluşumunun sağlanması amacıyla kullanılan, ECM'yi taklit eden destek yapılarıdır. Bu nedenle kullanılacağı hedef dokunun fonksiyonel özelliklerini devam ettirecek şekilde karakteristik özellikleri ve kullanılan polimere uygun üretim şekli belirlenmelidir. Üretim teknikleri; dondurarak kurutma, faz ayrımı, gaz köpüklendirme, ekstrüzyon, eriyik kaplama, çözücü dökme-parçacık uzaklaştırma, 3D yazıcı teknolojisi ve elektroçekim yöntemi şeklinde çok çeşitlidir.

Sunulan tez kapsamında deri doku iskeleti geliştirilmesi hedeflendiğinden üretim tekniklerine deri doku iskeleti özelinde bakmak daha doğrudur. Son on yılda mikro ve nano-imalat ve karakterizasyon teknikleri alanında gelişen teknoloji ile farklı üretim yöntemleri ortaya çıkmıştır ve klasik üretim yöntemlerinden çok daha kullanışlıdır. Gelişmiş üretim teknikleri özellikle çok yönlülük, tekrarlanabilirlik ve farklı parametrelerle çalışma olanağı ile iskele karakteristik özelliklerini çalışmak için fırsat sunmuştur. Farklı malzemeler, istenilen mukavemet özellikleri, gözenek boyutu ve dağılımı gibi hedef ECM mimarisine göre kontrol edilebilir. Hızlı prototipleme (RP) ve elektroçekim, nanopartiküller ve nanolifler vasıtasıyla nano boyutta doku iskelelerin üretimini sağlayan yaratıcı seçeneklerdir (C. Dutta 2017).



Şekil 2.8 a) PLGA-collagen çapraz bağlama yöntemi; b) ipek doku iskelesi gaz köpükleme metodu; c) PLA süper kritik CO₂ ile muamele; d) 15% PLLA köpükleri faz ayrımı yöntemi; e) ısıtma yöntemiyle PGA liflerinin mesh yapıya getirilmesi; f) çapraz bağlama ile sünger matriksi; g) çapraz bağlama yöntemiyle köpük iskele yapıları; h) elektroçekim yöntemiyle üretilen PLLA/1,2-dikloretan doku iskeleleri; i) Stereolitografi tekniğiyle üretilen doku iskeleleri; j) 3d yazıcılarla üretilen kalsiyum silikat doku iskeleleri; k)FDM teknolojisiyle üretilen gözenekli doku iskeleleri; l) Bio plotter tekniğiyle üretilen PCL doku iskeleleri SEM görüntüleri (C. Dutta 2017).

Nano ölçekli doku iskeleleri, ECM'nin hücre oluşumunu sağladığı mikro çevreyi taklit ederek hücre büyümesini en etkili sağlayan yapılardır. Ulusal Bilim Vakfı (NSF) çapı birkaç nanometre ile 100 nm çapının altında yer alan liflere nanolif olarak sınıflandırmıştır ($1\text{nm}=10^{-6}\text{ mm}$).

Nanolifler mikro gözenekli destek yapılar ile birleştirildiğinde hücre tutunmasını, çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını sağlamaktadırlar ve bu şekilde doku mühendisliği uygulamaları için istenen özellikleri yüksek oranda göstermektedirler. Bu yüzeyler konvansiyonel liflere göre küçük gözeneklere ve yüksek yüzey alanlarına sahip

olduğundan doku mühendisliği alanında sıklıkla kullanılmaktadır. Destek yapılar olarak kullanılan nanolifler kas iskelet doku mühendisliği de dahil olmak üzere kemik, kırık, iskelet kası, deri, vasküler, nöral doku mühendisliği ve ilaçların, proteinlerin ve DNA'nın kontrollü salınımında kullanılmaktadırlar (Sirkeci 2016).

Nanolif üretimi için en çok kullanılan üç teknik vardır; elektroçekim, kendiliğinden birleşme ve faz ayırma yöntemleridir. Elektroçekim yöntemi, doku mühendisliğinde en çok kullanılan ve en umut verici yöntemlerden birisidir. Elektroçekim yöntemi kolay bir yöntem olduğundan çok farklı polimerlerden nanolifli yüzeyler üretilebilir.

Yapılan çalışmalarda PLGA elektrospun iskelelerinin, in vitro kültürde 5 gün süreyle fibroblastların yaşadığı ve çoğaldığı gösterilmiştir. Araştırmacılar bu materyali kullanarak, deri dokusu mühendisliği uygulamalarına yönelik fibroblast kültürünü sağlamak amacıyla 100-200 µm gözenek büyüklüğüne ulaşabilmektedir. Chen ve ark. 5-40 µm kadar düşük gözenek boyutlarına sahip PLGA elektrospun yapı iskelelerinde 7 gün sonra insan dermal fibroblastlarının ve daha sonra kolajen tip I sentezinin infiltrasyonunu başarıyla göstermiştir. Başka bir çalışmada, kollajenden yapılmış elektrospun iskeleleri, dondurarak kurutulmuş doku iskelelere kıyasla murin modellerinde oluşturulan tam kalınlıktaki yaraları %22 oranında önemli ölçüde azaltan hücre büyümesini göstermiştir. Park ve diğ. tarafından yapılan çalışmada ipek-polietilen oksit (PEO) elektrospun elyaflarında tuz (NaCl) kristalleri kullanarak elde edilen iskelelerin, in vitro olarak iki katlı deri oluşumunu destekleyecek kadar büyük gözenek boyutlarına (250-300 µm) sahip olduğu gözlenmiştir (Kaur 2019).

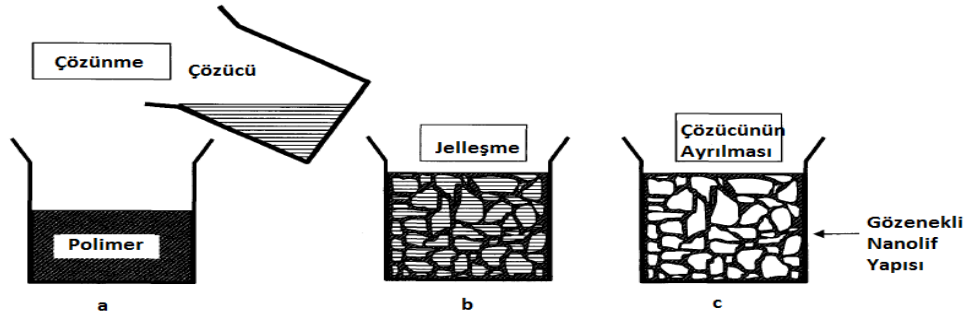
Yapılan birçok çalışmada elektroçekim işlemi, kontrol edilebilir nano-mikro ölçekli yapılar ve kimyasal özellikler içeren doku iskelelerini geliştirmede tercih edilen bir teknik olarak ortaya çıkmaktadır. Bu teknoloji kısaca, bir polimer çözeltisinden nanolif oluşumunu sağlamak için elektrostatik kuvvetler vasıtasıyla toplayıcı yüzey üzerine liflerin biriktirilmesi yöntemidir. Ortaya çıkan yapılar kas-iskelet sistemi, deri ve vasküler dokular da dahil olmak üzere bir dizi dokuyu taklit etmek için uyarlanabilir. Çok çeşitli olarak doğal ve sentetik biyolojik olarak parçalanabilir polimerler bu yöntem ile üretilebilmektedir (Kennedy ve ark. 2017).

2.4.1. Faz Ayrımı

Faz ayrımı gözenekli polimer zarları üretmek için bir üretim tekniği olarak yıllardır kullanılmaktadır. Bu yöntem: polimer çözücü ve çözücü olmayan bileşenlerden oluşan homojen polimer çözeltisinin termodinamik yöntemle polimerce zengin ve fakir fazlara ayrılarak gözenekli bir yapı elde edilmesi esasına dayanmaktadır (Can 2015).

Bu prosesdeki ana mekanizma fiziksel uyumsuzluktan dolayı fazların ayrımıdır. Daha sonra bu fazlardan biri (çözücü) çıkartılır ve geriye tek bir faz kalır. Yapılan araştırmalara göre proses; polimer çözünmesi, jelleşme, çözücü ekstrüzyonu, donma ve yüksek vakumda donarak kuruma adımlarından oluşur (Düzyer 2014).

Diğer tekniklerden farklı olarak faz ayrılması çok özel ekipman gerektirmeyen basit bir işlemdir (Ravichandran 2012). % 90'dan daha büyük gözeneklilik ve 20'den 200µm arasında değişen gözenek boyutu ile doku iskeleleri bu yöntem ile üretilebilir. Bu yöntemin dezavantajı oluşan matriste gözenek yapısı kapalıdır (Patel 2011).

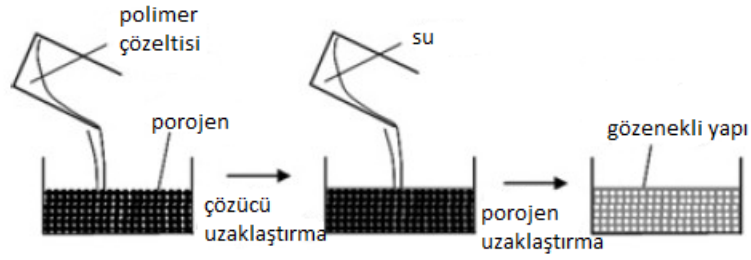


Şekil 2.9 Faz Ayrım Yöntemi (Ramakrishna ve ark. 2005)

2.4.2. Çözücü Döküm-Parçacık Uzaklaştırma

Bu yöntemde; organik çözücüde çözünen polimer, şeker, inorganik tuz, parafin küreler gibi porojen granüllerle karıştırılır ve önceden belirlenmiş bir üç boyutlu kalıba dökülür. Polimer- porojen oranı, nihai yapının gözeneklilik miktarı ile doğrudan bağlantılı olurken, kullanılan porojen parçacıkların boyutu iskele gözenek boyutlarını etkilemektedir. Çözücü döküm, 2 mm kalınlığa kadar 3 boyutlu gözenekli doku iskelelerinin

hazırlanmasını sağlar. Bu teknik kullanılarak % 93'e kadar gözeneklilik ve ortalama gözenek çapı 500 µm'e varan son derece gözenekli iskeleler elde edilebilir (Can 2015).



Şekil 2.10 Çözücü dökümü/parçacık uzaklaştırma yönteminin şematik gösterimi (Duzyer 2014)

Bu üretim tekniği de faz ayırma yöntemindeki gibi özel ekipmana gerek kalmadan üretiminin kolay olmasıdır. Dezavantajları ise; organik çözücülerin doku iskelesi üzerine ekilen hücrelere herhangi olası hasarı önlemek amacıyla tamamen uzaklaştırılması gerektiğidir. Ayrıca sadece düz levha veya boru şeklinde yapıların oluşturulabilmesi, porojen partiküllerin yapıdan uzaklaştırılmasının zor olması nedeniyle iskele hazırlamanın zaman alıcı olması, polimer içinde toksik çözücünün kalma ihtimali, polimere tutunan diğer moleküllerin ve proteinlerin çözücüler nedeniyle bozunma riskinin olmasıdır (Can 2015).

2.4.3. Gazla Köpüklendirme

Bu yöntem doku mühendisliği uygulamalarında organik çözücü etkisini ortadan kaldırma amacıyla tercih edilmektedir. Proses, polimer karışımından karbondioksit vasıtasıyla köpük oluşturulması esasına dayanır. Bu teknik kullanılarak 100 µm gözenek boyutu %93'e kadar gözeneklilik ile polimer süngerler üretilebilir (Can 2015).

Sıcaklık ve basınç değişimleri ile gözenek boyutları değiştirilebilir. Bu yöntemin dezavantajı, gözenekler arasındaki bağlantıların az olması, dolayısıyla yüzeyin daha az gözenekli olmasıdır (Düzyer 2014).

2.4.4. Kendiliğinden Birleşme (Self-Assembly) Metodu

Kendiliğinden birleşme; Küçük moleküllerden basit blokların kurulmasıyla nanoboyutta liflerin oluşturulmasını ifade etmektedir ve lif çapları 7-100 nm aralığında değişmektedir. Birçok önemli biyolojik bileşenin oluşumu herhangi bir dış etki olmadan, kendiliğinden gerçekleşmektedir. Fakat kendiliğinden montaj karışık, birkaç polimer konfigürasyonu ile sınırlı bir laboratuvar prosesidir (Düzyer 2009).

Deri doku mühendisliğinde; peptidlerin kendiliğinden düzenlenmesi (self-assembly) yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde, peptidlerin, hidrojen bağları, iyonik bağlar, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals etkileşimleri ile gerçekleşen kendiliğinden düzenlenmesi prosesi, doku mühendisliği alanında üç boyutlu peptid doku iskelelerinin hazırlanma yöntemlerinden biridir. Bu yöntemin diğer üretim tekniklerine göre daha kompleks bir yöntem olması nedeniyle yöntem günümüzde çok fazla tercih edilmemektedir (Dalkıranoglu 2011).

2.4.5. Dondurarak kurutma

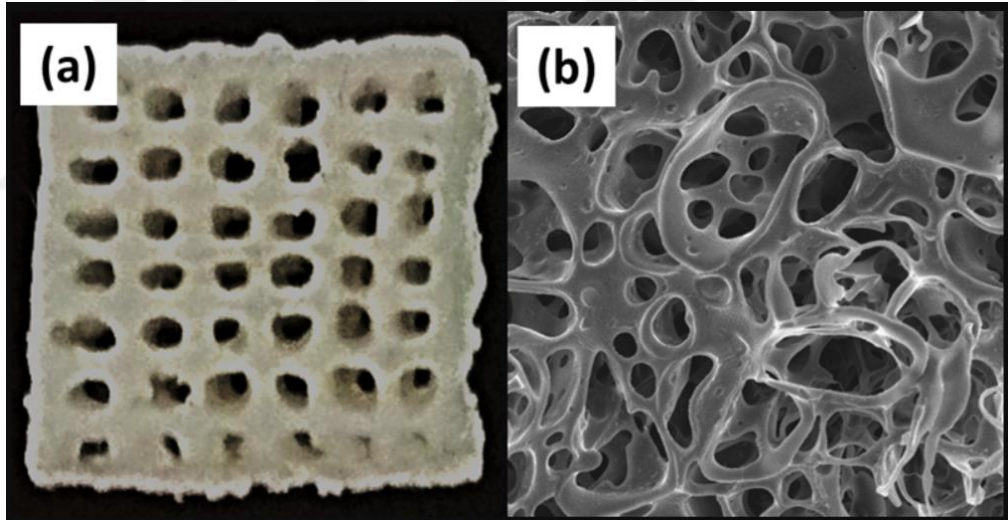
Dondurarak kurutma yöntemi rejeneratif tıp uygulamalarında doku iskeleleri oluşturmak için kullanılmaktadır ve genellikle solüsyon olarak asetik asitin kullanılması ile birbirine bağlı gözenekler elde edilir (Sirkeci 2016).

Bu yöntem ile gözenekli ve üç boyutlu polimerik yapılar oluşturulabilir. Düşük sıcaklıklarda, vakum altında çalıştırılan cihaz donmuş olan çözücünün süblimleşmesini ve daha sonrasında cihazın iç duvarlarında kristallenmesini veya yoğuşmasını sağlamaktadır (Düzyer 2014). Bu yöntemin dezavantajı; doku iskelelerin kapalı bir gözenek yapısına sahip olmasıdır (Nam & Park 1999).

2.4.6. Katı serbest form üretim teknikleri (SFFT) (3D yazıcılar, Bioplatterler)

Katı serbest formlu üretim (SFFT), bilgisayar destekli tasarım ile istenilen yüzeyin bilgisayara işlenerek ısı, ultraviyole ışık veya bağlayıcı çözeltiler yoluyla üretimin yapılması esasına dayanır (CAD ve CAM). Üç boyutlu yazıcılar, bir yapının tabakalar halinde üst üste işlendiği bir teknolojidir.

Geleneksel üretim teknolojilerine kıyasla doku iskelesinin gözeneklilik ve gözenek boyutu kontrolü daha iyi sağlanır. Doku iskelesi üretiminde kullanılan SFF üretim teknolojisi; 3D baskı, stereolitografi, seçici lazer sinterleme ve püskürterek çıkarma bazlı sistemlerden farklıdır. Bu teknikler; birbiriyle bağlantılı gözenekli yapı ile tekrarlanabilir iskeleleri üretmek için kullanılmaktadır. Özellikle kemik doku mühendisliğinde ilgi çeken bir teknoloji olmuştur.



Şekil 2.11 3D yazıcılarla üretilen doku iskeleleri a) makroskopik görünümü, b) SEM görüntüsü (Wang 2016)

2.4.7. Elektroçekim Yöntemi

Dilimize Elektro Lif Çekimi (Cengiz 2006), Elektroçekim (Düzyer ve Hockenberger 2008) gibi terimlerle giren Elektroçekim, nanolif eldesi için geliştirilen yöntemlerden en yaygın ve avantajlı olanıdır (İkiz 2009). Nanolif üretim yöntemleri arasında elektrostatik yöntemle elde edilen lifler istenilen tüm özellikleri sağlayabilmekte, lif inceliği kontrol altında tutulabilmektedir. Bu yöntemde, polimer çözültisi veya lif eriyiğinden lif eldesi için elektrostatik kuvvet kullanılmaktadır.

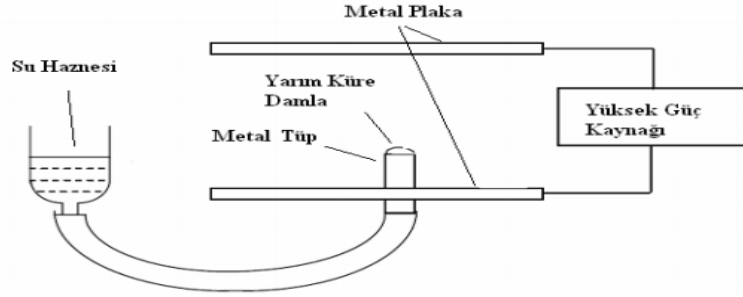
Elektroçekim yönteminin ortaya çıkmasına girdi sağlayan ilk çalışmalar 1600'lü yıllara kadar dayanmaktadır. 1822 yılında Lord Rayleigh, elektrik yüküne sahip damlaların elektroçekim işlemi sırasında gösterdiği düzensiz hareketler üzerine çalışma yapmasıyla başlamıştır (Chun 2005). Rayleigh, yalıtılmış bir yüklü damlacığın kararlılığı üzerine teorik bir çalışma yapmış olup yükün, kararlılığı sağlayan yüzey geriliminin üstünde bir değere ulaştığında damlacığın kararsız hale geldiğini ve parçalanmanın gerçekleştiğini belirtmiştir (Yarin ve ark. 2001).

Elektroçekim tekniğinin ilk patenti 1902 yılında J. F. Cooley tarafından alınırken, yöntemin iplik çekimine uygun yeni bir düzenek buluşunun sahibi olarak Formhals tarafından 1934 yılında patent alınmıştır. İplik çekimi üzerine çok fazla çalışma yapılmasına rağmen çözültinin uzaklaşması ve lif oluşması aşamasında yaşanan sorunlar nedeniyle beklenen önemi kazanamamıştır (Düzyer 2014).

1940'lı yıllarda bilim insanları tarafından elektroçekim yöntemiyle üretilen liflerin filtre olarak uygulanması sonucunda, ilk ticari filtre ürünü olarak "Petryanov filterleri" adıyla pazara sunulmuştur. 1974 yılında Martin ve Cockshot tarafından, elektroçekim yöntemiyle üretilen yara örtüleri kullanılmaya başlanırken, 1978 yılında Annis ve ark. tarafından yapılan çalışmada, ilk kez implante edilebilir damar doku çalışmaları literatüre kazandırılmıştır.

1960'larda jet oluşum prosesinde temel çalışmalar Taylor tarafından başlatılmıştır. Taylor elektriksel alanı uygulandığında iğne ucunda oluşan polimer damlasının şeklini

incelemiştir. Düze ucunda oluşturulan damlanın önce yarı küresel bir yüzeye sahip olduğunu, artan elektriksel kuvvet ile birlikte damlanın konik bir şekil aldığını ve daha sonra jetlerin bu koninin tepesinden çıktığını gözlemlemiştir. Jetin bu konik şekli diğer araştırmacılar tarafından “Taylor konisi” olarak adlandırılmıştır (Düzyer 2009).



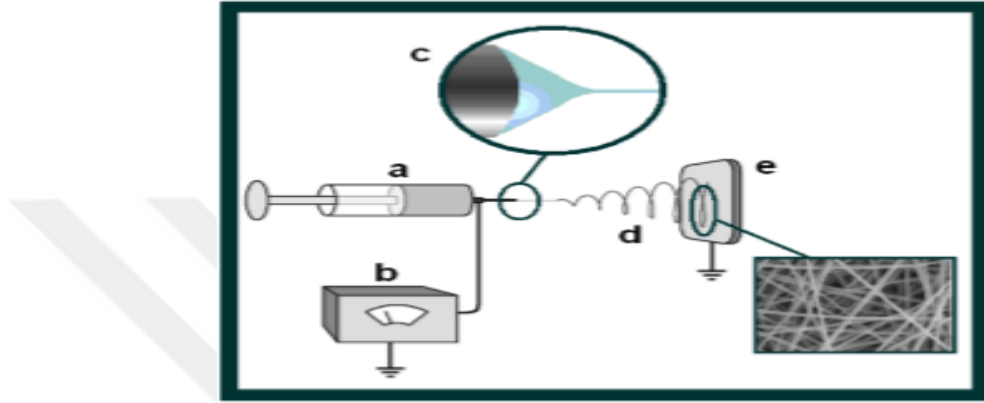
Şekil 2.12 Taylor'ın elektroçekim deney düzeneği (Çınar 2013)

Bilim insanları tarafından çok farklı alanlara yönelik çalışmaların ortaya çıkması nedeniyle teknolojiye olan ilgi artmıştır. 2003 yılında Sun ve ark., ilk core-shell elektroçekim teknolojisiyle literatüre yeni bir üretim tekniği kazandırmıştır. Smit ve ark. tarafından elektroçekim yöntemiyle sürekli iplik eldesi çalışmalarının başarılı olması sonucunda 2005 yılında bu alanda ilk kez başarılı bir çalışma bilimsel dergide yayınlanmıştır. Nicast tarafından damar dokuları üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, 2008 yılında CE belgesine sahip ve uygulanabilir (AVflo™ Vascular Access Graft) doku iskeleleri pazara sunulmuştur. Kompozit malzemelerin son yıllarda ilgi görmesi sonucunda 2012 yılında Kilwell NZ Xantu tarafından elektrospon nanolif bazlı kompozit malzemelerin başarı ile elde edilmesiyle, tüketici kullanımına sunulan ilk nanolif kompozit yapı olmuştur.

Elektroçekim, polimerler, kompozitler ve seramikler gibi çok çeşitli materyallerden ultra ince lifler oluşturmak için kullanılan basit ve etkili bir üretim tekniğidir. Bu teknik, elektriksel olarak yüklenmiş sıvı polimerin topraklanmış bir yüzey üzerinde sürekli lif formunda konumlanması esasına dayanır. Patent literatüründe ilk örnekleri 20. yüzyılın başlarında görülen ancak, özellikle 90'lı yılların ortalarından sonra akademik çevrelerin oldukça ilgisini çeken elektroçekim yöntemi, yeniden doğmuş eski bir teknolojidir (Kozanoğlu 2006, Andradıy 2008, Chronakes 2005). Bu yöntemle, çapları 3 nm'den 1

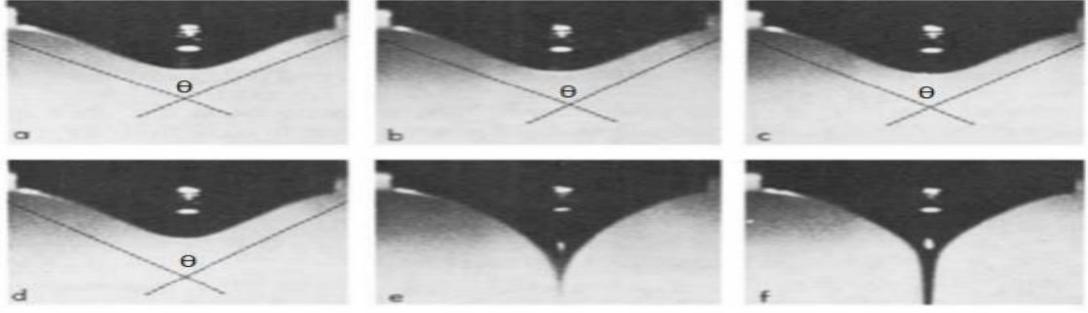
mikron ve üzerine kadar değişen kalınlıklarda nanoliflerin pek çok polimerden başarıyla elde edildiğinden söz edilmektedir (Huang ve diğ. 2003).

Bir elektroçekim düzeneğinde temel olarak yüksek voltaj güç kaynağı, besleme ünitesi (şırınga, düze, metal iğne vs), topraklanmış bir toplayıcı (plaka, silindir, disk vs) ve sıvı polimer olmak üzere 4 ana eleman bulunur (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Elektroçekim Yöntemi (a) Sıvı polimer çözeltisi, (b) Yüksek voltaj güç kaynağı, (c) İğne ucunda damlacığın aldığı koni formu, (d)Jetin izlediği kararsızlık bölgesi, (e) Toplayıcı üzerinde oluşan nanolifli yüzey. (Doshi ve Reneker, 1993, Kozanoğlu 2006)

Eriyik ya da çözelti halindeki sıvı polimer, kılcal bir borudan beslenir. Devredeki elektrotlardan biri polimere diğeri toplayıcıya bağlanır. Bir yüksek voltaj güç kaynağı vasıtası ile polimer çözeltisine çok yüksek değerlerde (50 kV'a kadar çıkılabilir) voltaj uygulanır. Böylece iğnenin ucunda asılı kalan çözelti damlacığının yüzeyi elektriksel olarak yüklenir. Uygulanan voltaj arttıkça polimer damlacığı, koni formunu (Taylor konisi) alır. Voltaj kritik bir değere ulaşıp damlacıktaki yüklerin itme kuvvetleri, yüzey gerilimi kuvvetlerini yendiğinde Taylor konisinin ucundan ince bir jet baş gösterir. Bu polimer jeti, önce kararlı daha sonra kararsız (spiral) bir yol izleyerek karşısında bulunan topraklanmış toplayıcıya doğru akar. Bu esnada, içindeki çözücü buharlaşır ve ardında nano boyutta çaplara sahip yüklü bir polimerik lif bırakır. Oluşan bu sürekli nanolifler, toplayıcı plaka üzerinde rastgele konumlanır ve bir dokusuz yüzey oluşturur (Doshi ve Reneker 1993, Kozanoğlu 2006).



Şekil 2.14 Artan voltaj ile kılcal boru ucundaki damlanın şeklinde meydana gelen değişiklik, (a) $\theta=110^\circ$, (b) $\theta=107^\circ$, (c) $\theta=104^\circ$, (d) $\theta=100^\circ$ deki damlanın şekli, (e) jetin fişkırması, (f) jetin sürekli hale gelmesi (Larrondo ve Manley 1981)

Elektroçekimde oluşan jetten doğru sıvı akışını tanımlamak için, polimerin viskoelastik özelliği, yük relaksasyon zamanları ve çözücü buharlaşma oranı gibi değişkenler göz önünde bulundurulmalıdır (Düzyer 2014).

2.4.7.1. Elektroçekim Yöntemine Etki Eden Parametreler

Elektroçekim yönteminde uygulanan parametreler, nihai nanolif yüzeyinin tüm morfolojik ve mekanik özelliklerine etki etmektedir. Bu nedenle üretime başlanmadan önce üretilecek yüzeylerin kullanım alanına göre beklenen özelliklerinin düzgün bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Elektroçekim yöntemi kolay olmasının yanı sıra üretimi etkileyen üç farklı ana grupta parametre bulunmaktadır (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1 Elektroçekim prosesine etki eden parametreler

Çözelti Parametreleri	Proses Parametreleri	Ortam Parametreleri
Moleküler ağırlık	Uygulanan voltaj	Sıcaklık
Polimerin yapısı	Toplama plakasının hareketliliği	Basınç
Çözelti Viskozitesi	Düze çapı (mikrometre)	Rutubet
Çözelti Elektriksel İletkenliği	Toplama plakası ile düze arasındaki mesafe	

Çözelti parametrelerinin etkisi;

Elektroçekim ile üretime başlamadan önce polimere uygun çözücünün belirlenmesi gerekmektedir. Oluşturulacak çözeltinin geliştirilecek nanolifli yüzey morfolojisi ve mekanik özelliklerini etkilediği bilinmektedir.

Moleküler ağırlık ile elektriksel özelliklerin viskozite, yüzey gerilimi, elektriksel iletkenlik ve dielektrik kuvveti üzerinde önemli bir etkisi vardır. Yapılan çalışmalarda, çok düşük moleküler ağırlıktaki polimer çözeltilerin liften çok boncuklanma eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir ve yüksek moleküler ağırlıktaki nanolif çözeltilerinden ortalama daha geniş çaplar elde edilmiştir (Deitzel ve ark. 2001; Heikkila ve Harlin 2008; Megelski ve ark. 2002).

Polimer konsantrasyonu ve çözelti viskozitesi arasındaki ilişki genellikle polimer doğasına (yapı ve moleküler ağırlık gibi) ve polimer çözeltinin içerisindeki moleküller içi etkileşime (polimer-polimer, polimer-çözücü, çözücü-çözücü, v.b.) bağlıdır. Düşük viskozitenin boncuk oluşumunu arttıran yönde etkilediği bilinmektedir. Düşük viskozitelere, yüksek miktarda çözücü molekülü bulunur ve daha az zincir karışıklığı oluşur. Bu durum yüzey geriliminin polimer jeti boyunca etkin olmasına neden olur ve böylece oluşan lif boyunca boncuklar görülür. Viskozite arttırıldığında, çözelti içindeki polimer zinciri karışıklığı artar ve polimer jeti üzerindeki yükler çözeltiyi tamamıyla gerdirebilir. Artan viskozite ile birlikte, lif çapı da artar (Düzyer 2014).

Çözelti iletkenliği, elektro-eğirme yöntemiyle üretilmiş lif çapını yüksek oranda etkileyen bir polimer çözeltisi özelliğidir. Çözeltinin iletkenliği, çözeltinin bir elektrik akımı taşıma kabiliyeti olarak tanımlanabilir (Yener ve ark. 2011). Çözelti iletkenliği fazla olan polimerlerde iyonların fazla olmasından dolayı yük taşıma kapasitesi artar ve bu da uygulanan elektrik alan ile daha fazla gerilime sebep olur. Yeterli düzeyde iletkenlik görülüyorsa, lif oluşumu gözlenmeyebilir.

Elektroçekimin gerçekleşmesi için, elektriksel olarak yüklü çözelti, kendi yüzey gerilimini aşması gerekmektedir. Fakat polimer jeti toplama yüzeyine doğru hareket

ederken, yüzey gerilimi nedeniyle jet boyunca boncuk oluşumu gözlenebilir. Yüzey gerilimi, birim sıvı kütlesi başına yüzey alanını düşürmeye yönelik çalışır. Bu durumda, serbest çözücü moleküllerinin konsantrasyonu yüksek olduğunda, çözücü moleküllerinin bir araya gelme ve yüzey gerilimi nedeniyle küresel şekil alma eğilimi daha fazla olur. Yüzey gerilimlerinin etkisini azaltmak için, düşük yüzey gerilimine sahip çözücüler veya çözeltiyeye yüzey aktif maddeler kullanılabilir (Düzyer 2014).

Proses parametrelerinin etkisi;

Proses parametreleri yüzeydeki lif oluşumuna etkileyen en önemli parametreler olduğu bilinmektedir.

Voltaj, proses parametreleri içerisinde lif morfolojisini doğrudan etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Çözeltinin akış hızına bağlı olarak, Taylor konisinin kararlı olabilmesi için yüksek voltaj gerekmektedir. Elektroçekim jetindeki Coulomb itici kuvvet, viskoelastik çözeltiyi esnetmektedir. Eğer uygulanan voltaj yüksekse, oluşan yoğun yük, iğne ucundan daha fazla hacimde çözelti çıkmasına ve oluşan jetin hız kazanmasına neden olmaktadır. Bu durum daha ince liflerin elde edilmesine neden olur (Kazaroğlu 2009).

Daha yüksek voltaj değerlerinde, boncuk oluşma eğiliminin daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılan araştırmalarda, artan voltaj ile oluşan boncukların çubuk şeklinden küresel şekle doğru değiştiği görülmüştür (Düzyer 2014).

Düze ucu-toplayıcı arası mesafe değişimi ile birlikte toplayıcıya ulaşma süresi, çözücünün uzaklaşma süresi ve polimer jetinin karasız bölgede kalma süreleri değişir. Bu nedenle, Elektroçekim yöntemi ile üretilen nanoliflerin yapı ve morfolojisi, düze-toplayıcı mesafesinin değişiminden oldukça etkilenir. Düze ucu ile toplama yüzeyi arasındaki mesafe değiştirilerek, polimer jetinin elektriksel alanda kalma süresi ve elektriksel alanın gücü değiştirilir. Düzgün liflerin oluşması için, çözücünün elektriksel alan içinde tamamen uzaklaşması gereklidir. Düze ucu ile toplama yüzeyi arasındaki mesafe azaltıldığında, jetin hareketi daha kısa mesafede gerçekleşir. Aynı zamanda elektriksel alanın şiddeti artırılmış olur. Bu durum, jetin ivmelenmesini artırır ve

çözücünün uzaklaşması için yeterli süre sağlanamaz. Sonuç olarak, toplama yüzeyi üzerinde birbirine yapışmış liflerden oluşan bir yüzey elde edilir (Düzyer 2014).

Elektroçekim işlemi sırasında düze ucu ile toplayıcı arasında bir elektrik alan oluşmaktadır. Birçok elektroçekim düzeneğinde alüminyum folyo gibi iletken bir malzemedan yapılan toplayıcı plaka, kaynak ile toplayıcı arasında kararlı bir potansiyel farkı oluşturacak şekilde elektriksel olarak topraklanmıştır (Kazaroğlu 2009). Elektroçekim sisteminde kullanılan toplayıcı tipi düz plaka, çubuk, döner silindir, keskin kenarlı disk vb. gibi pek çok farklı şekilde olabilir. Farklı tipteki toplayıcılar, lif morfolojisi üzerinde de etkili olur (Teo ve ark. 2006).

Toplayıcının durağan veya hareketli olması liflerin yönlenmesinde etkilidir. Bu toplayıcılar özellikle, DMF gibi kaynama noktası yüksek çözücüler için kullanışlıdır, böylece fiberler toplayıcı üzerinde ıslak kalmamaktadır (Kazaroğlu 2009).

Besleme oranı, elektroçekim için gerekli olan çözelti miktarını belirler. Belirli voltaj değerinde, Taylor konisinin oluşması için gerekli olan belirli bir besleme oranı vardır. Besleme oranı arttırılırsa, düze ucundan daha fazla miktarda çözelti çekildiği için, lif çapında veya boncuk boyutlarında artış görülür. Bazı durumlarda, besleme oranı nanolif oluşturmaya yetecek kadar olsa bile, damlama problemi gibi sorunlar oluşabilir. Yüksek kaliteli lif oluşumunu sağlamak için, besleme oranı; polimer/çözücü seçimi ve konsantrasyona bağlı olarak belirlenmelidir (Düzyer 2014).

Düze çapının küçük olması durumunda tıkanmaya bağlı olarak boncuk oluşumuna neden olduğu bulunmuştur. Oluşan lif çapında da azalmaya neden olmaktadır. Aynı voltaj değerinde, jet oluşumunun sağlanabilmesi için daha yüksek Coloumb kuvvetlere ihtiyaç bulunmaktadır. Sonuç olarak, jetinin hızı düşerken çözeltiye, toplayıcıya gitmeden önce, gerilmesi ve uzaması için daha fazla zaman tanımaktadır. Düze çapının çok küçük olduğu durumlarda, iğne ucundan çözelti damlasının çıkışı mümkün olmayabilir (Ramakrishna ve ark. 2005).

Ortam parametrelerinin etkisi;

Sıcaklık: Çözeltinin sıcaklığı, çözücünün buharlaşma oranının yükselmesine böylelikle polimer çözeltisinin viskozitesinin artmasına etki etmektedir.

Nem: Ortamın nemi, kullanılan çözücü tipine ve polimer çözeltisinin hidrofilitesine göre, her bir polimer çözeltisini farklı olarak etkiler. Sulu çözeltiler, nemden en fazla etkilenen çözeltilerdir. Bu çözeltilerde çözeltideki suyun ve atmosferin etkileşime girmesi olağandır. Yüksek nem oranlarında, su molekülleri lifin yüzeyi üzerinde yoğunlaşabilir. Sonuç olarak, özellikle uçucu çözücülerle hazırlanan polimer çözeltilerinde lif morfolojisi çok etkilenir. Yapılan araştırmalarda, artan nem ile lif yüzeylerinde gözenekler oluştuğu gözlenmiştir (Düzyer 2014).

Atmosfer Tipi: Elektroçekim ortamındaki hava bileşiminin işlem üzerine etkisi bulunmaktadır. Farklı gazlar, yüksek elektrostatik alan içerisinde farklı davranış göstermektedirler. Örneğin, helyum yüksek elektrostatik alan altında parçalanarak, çekimi imkansız hale getirmektedir (Kazaroğlu 2009).

Basınç: Kontrollü ortam koşullarında, basıncın elektroçekim jeti üzerine olan etkisini incelemek mümkündür. Genel olarak, elektroçekim jeti etrafındaki basıncın düşmesi işlemi olumsuz yönde etkilemektedir (Kazaroğlu 2009).

Elektroçekim yönteminin avantajları;

- Ultra ince nanolifler üretilebilir. 5-1000 nm çapında liflerin bir gramı ile 10-1000 m²'lik bir alanı kaplayabilmek mümkündür. Konvansiyonel malzemelerde 1 m²/g civarındadır.
- Artan yüzey alanı, fonksiyonel gruplarından azami faydalanma olanağı, molekül tutma kapasitesinde artış, iyon ve katalitik üretiminde geniş fayda sağlamaktadır.
- Lif çapının düşük olmasına bağlı olarak daha iyi filtrasyon verimliliği, daha yüksek su absorblama yeteneği, yüksek gözeneklilik, yüksek su buharı transferi,

geliştirilmiş toksik kimyasal direnç ve nefes alabilirlik özelliklerine sahip yüzeyler elde edilir.

- Maliyeti düşüktür. Bu yöntem ile üretilen polimerik, karbon ve seramik nanolifleri, karbon ve diğer nanotüplerle kıyaslandığında, maliyet ve tek adımda üretim açısından avantajlıdır.
- Polimerden doğrudan dokusuz yüzey kumaş elde edilebilir. Alternatif olarak tek tek lif ya da nanoliflerden mikron seviyede iplikler elde edilebilir.

Elektroçekim yöntemi dezavantajları;

- 1930'lardan beri bilinmesine karşın düşük ürün eldesi, düşük ve düzgün olmayan moleküler oryantasyon, düşük mekaniksel özellikler ve büyük çap düzensizliği ya da dağılımı nedeniyle pek kullanılmamıştır.
- Elektroçekim yöntemi ile üretilen lifler küçük çaplı olması sebebiyle, nanolifli dokusuz yüzeyin kalınlığı da oldukça küçüktür. Bu yüzden düşük mekanik özellikleri kullanımlarını sınırlandırır. Bu işlemin üretim verimi, genelde birim saatte birim düze deliğinden geçen polimerin gram cinsinden miktarı ile ölçülür ve lif mukavemetinin çok düşük olduğu tahmin edilmekle beraber ölçülmesi de oldukça zordur.
- Her ne kadar çapı 3-5 nm olan liflerin üretilebilirliğinden bahsediliyorsa da, 50 nm'den daha küçük çaptaki lifler üniform olmayan bir yapıya sahip olmaktadır. İnce çapa sahip liflerde, çözücünün buharlaşması ve polimer jet stabilitesinin sağlanamaması, üzerinde çalışılması gereken konulardır.
- Elektroçekim yöntemi ile ilgili yapılan bilimsel yayınların önemli bir bölümünü, prosesle, çözeltiyle ve çevreyle ilgili parametrelerin jet oluşumu, lif çapı ve yüzey özelliklerine etkileri üzerine yapılan çalışmalar oluşturmaktadır. Pek çok çalışma ise, poliüretan, kollajen, kitin, kitosan/kollajen, selüloz, poli(vinil alkol), poli(metil metakrilat), poliamid 6 ve diğer nanolif üretme tekniklerinde kullanılabilen tüm polimerlerin elektroçekim için uygun olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar, nanoliflerin filtrasyon, kompozit ve biyomedikal gibi uygulama alanlarında kullanımının mümkün ve avantajlı olduğunu göstermektedir (Üstündağ 2016).

2.5. DOKU İSKELETİNDE KULLANILAN POLİMERLER

Doku iskeleleri, hücre tutunması, hücre proliferasyonu ve göçü, ECM sentezi ve farklılaşması yoluyla hücrelerin ve diğer biyolojik faktörlerin taşıyıcısı olarak işlev görerek, fonksiyonel doku oluşmasını sağlayan üç boyutlu bir yapıdır. Doku iskelesinde kullanılacak biyomateryal seçimi, doku mühendisliği yaklaşımının en kritik unsurlarındandır. Biyomedikal kullanımda biyomateryallerin seçilme kriterleri bu materyallerin kimyasına, moleküler ağırlığına, çözünmesine, yapısına ve şekline, hidrofilitik/hidrofobiklik özelliğine, kayganlığına, yüzey enerjisine, suyu absorbe etmesine ve erozyon mekanizmasına bağlıdır (Paulla & Suschek 2011).

Doku iskelesinden beklenen tüm fonksiyonellikleri (yüksek gözeneklilik, geniş yüzey alan, mekaniksel özellikler) sağladıkları için biyomateryal olarak polimerler tercih edilmektedir. Kullanılacak polimerin seçiminde temel kriter “biyoyumluluk” tur. İkincil olarak kullanım yerine ve amacına uygun olarak diğer kriterler dikkate alınmaktadır. Örneğin, doku iskelesi temelli doku mühendisliği yaklaşımında, yeni doku oluşuncaya kadar hücrelere destek sağlayacak yapay hücre dışı matriks (doku iskelesi-scaffold) fabrikasyonunda kullanılacak polimerler için “biyobozunurluk” şarttır. Bu tür uygulamalarda doğal polimerler, sentetik polimerler, seramikler veya bunların karışımları kullanılmaktadır (Gümüşderelioğlu 2016).

Doğal polimerler iki ana alt gruba ayrılabilir; polisakkaritler (aljinat, kitosan, nişasta, selüloz), polipeptitler ve proteinler (kolajen, ipek fibroin, albumin). Bu polimerler düzenli bir şekilde, ECM’ yi taklit ederek hedef dokuyu tarafından tanınabilir ve standart hücresel fonksiyonları desteklerler. Ancak zayıf mekanik özellikleri vardır ve biyolojik olarak yeniden emilebilirlikte sınırlı kontrol söz konusudur (Hokmabad ve ark. 2017).

Sentetik polimerler, sahip oldukları yüksek mekanik özellikler, gözeneklilik ve kullanım alanına göre ayarlanabilir biyobozunma oranları sayesinde doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu polimerler içerisinde; poli (glikolik asit) (PGA), poli (laktik asit) (PLA) ve bunların kopolimerleri poli (laktik-ko glikolik asit) (PLGA) ve poli (ϵ -kaprolakton) (PCL) gibi klinik uygulamalar için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)

onayına sahip olan bu polimerler son yıllarda doku mühendisliği alanında hızla odak noktası olmuştur. PLGA gibi kopolimerlerde bileşen miktarı değiştirilerek bozunma hızları isteğe göre ayarlanabilir.

Avantajlarının yanı sıra biyolojik olarak tanınırlıklarının az olması ve bozunma sırasında çıkan ürünlerin bazıları metabolik yollarla emilebilirken, bazılarının toksik olma ihtimali dezavantajlarıdır (Sirkeci 2016). Ayrıca, sentetik biyobozunur polimerlerin çoğu hidrofobik yüzey yapıdadırlar, ancak doku iskele uygulamaların ideal hücre ortamını sağlamak için hidrofilik yüzey oluşturulması gereklidir (Senthamizhan ve ark. 2017).

Biyoseramikler, hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfat (TCP), bazı silikat ve fosfat camları ile cam seramikleri, düşük biyoyumluluk ve biyobozunurluk özelliği sebebiyle doku mühendisliğinde kullanımı sınırlıdır. Fizyolojik sıvılar ile reaksiyona girerek sert ve yumuşak doku ile hücresel aktivite yoluyla sert etkileşimler yaratırlar. Bu nedenle doku mühendisliği uygulamalarında yumuşak doku iskelelerinde kullanımı sınırlı kalmıştır (Hokmabad ve ark. 2017).

Birkaç mikrometreden 100 nm ya da daha azına kadar değişen çaplarda polimerik nanolifli doku iskeleleri, ECM lifli yapıların fizyolojik boyut aralığına düşebilen elektroçekim yöntemiyle kolayca üretilebilir. Ayrıca, elektroçekim elyaf membranlarının yüksek gözenekliliği ve oksijeni geçirgen özelliği ile doku mühendisliği uygulamaları için uygun olmasını sağlar (Liu ve ark. 2014).

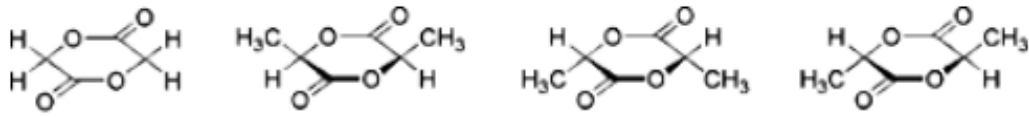
Polikaprolakton ve poli (laktid-ko-glikolid) (PCL/PLGA) polimerlerinden oluşturulan hibrid malzemeler hücre proliferasyonunu ve doku oluşumunu destekleyen mükemmel bir biyoyumlu bileşiktir. Bu nedenle literatürde, deri rejenerasyonu, mesane rejenerasyonu ve kemik rejenerasyonu çalışmalarında PCL/PLGA harmanları araştırılmıştır. Yapılan araştırmalar, PCL ve PLGA'nın kök hücre çoğalmasını destekleyebildiğini göstermiştir (Hiep ve ark. 2017).

Sunulan tez kapsamında polikaprolakton ve polilaktik-ko-glikolik asit polimerleri kullanılmış olmaları nedeniyle bu polimerler için detaylı açıklamalara yer verilmiştir.

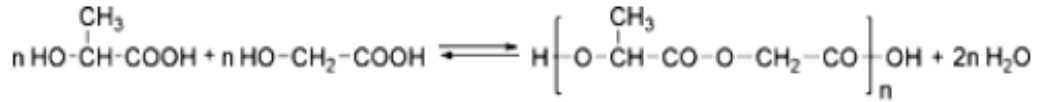
2.5.1. Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) Polimerleri

Biyobozunur polimer olarak adlandırılan PLGA, laktik asit (α -hidroksi propanoik asit) ve glikolik asit (hidroksi asetik asit) polimerlerinden başarılı bir şekilde sentezlenerek elde edilmiş kopolimer halindedir. Bu iki polimerin avantajlarını tek bir yapıda taşıyan bu polimerin özelliği; daha uzun bir bozulma süresine, daha iyi mekanik mukavemete ve artan hidrofobikliğe sahip olmasıdır.

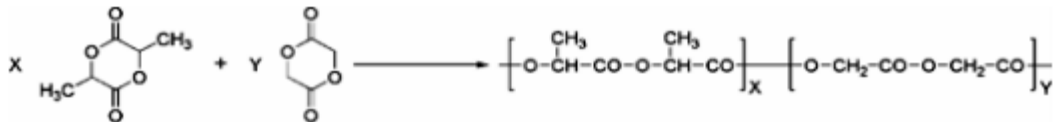
Laktik asit ve glikolik asidin direkt polikondensasyonu (poliesterifikasyonu) ile düşük M_w 'lı PLGA sentezlenmektedir. Laktik asit ve glikolik asit oligomerlerinin termal degradasyonu sonucu laktik ve glikolik asitlerin siklikdiesterleri olan laktid ve glikolid meydana gelmekte ve bunların, çinko oksit tozu, Lewis asitleri (örn. antimon triflorür) veya organometalik bileşikler (örn. alüminyum veya stannus oktat) gibi katalizörler varlığında direkt polikondensasyon veya halka yarılma polimerizasyonu ile de orta ve yüksek M_w 'lı PLGA polimeri sentezlenmektedir (Baykara 2009).



Şekil 2.15 Sırasıyla Glikolid ve Laktidler (Baykara 2009)



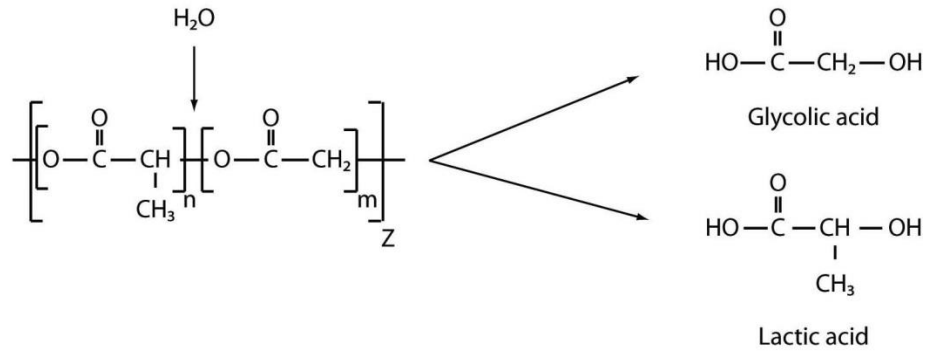
Şekil 2.16 Düşük M_w 'lı PLGA Sentez Şeması (Baykara 2009)



Şekil 2.17 Yüksek M_w 'lı PLGA Sentez Şeması (Baykara 2009)

PGA, PLA ve bunların kopolimerleri olan PLGA doku mühendisliğinde en sık kullanılan lineer alifatik polyester ailesidir. İyi mekanik özellikleri, toksik olmayan biyolojik bozunma ürünleri ve ayarlanabilir biyolojik bozunma süreleri nedeniyle doku mühendisliği için umut verici bir malzemedir (Zhao ve ark. 2016).

Kopolimeri oluşturan monomerlerin oranları değiştirilerek, farklı molekül ağırlığında, farklı fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özelliklerde PLGA polimerleri elde edilebilmektedir. Liflerin mekanik özellikleri ve bozunması, PGA ve PLA homopolimerlerinden oldukça farklıdır. PGA, nispeten hidrofilik doğasından dolayı in-vivo ya da sulu çözeltilerde hızlıca bozulur ve iki ile dört hafta arasında mekanik bütünlüğünü kaybeder. PLA'da tekrar eden ekstra metil grubu (PGA ile karşılaştırıldığında) bulunduğundan, onu daha hidrofobik yapar ve daha düşük bir hidroliz oranına yol açar. Bu nedenle PLGA'nın sudaki bozunma özelliği kopolimerin molekül ağırlığına ve laktik:glükolik oranına bağlıdır.



Şekil 2.18 PLGA'nın Kimyasal Formülü (Baykara, 2009)

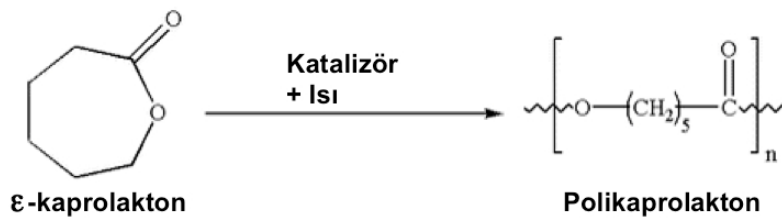
Yüksek glükolik asit içeriği ve düşük molekül ağırlığı, biyobozunma oranını artırmaktadır. PLGA'nın kristal yapısı kopolimer zincirindeki iki monomer bileşenin molar oranına bağlıdır. PLGA'da, % 70'den az PGA içeren kopolimerler amorfur ve diklorometan, etil asetat gibi organik çözücülerde kolaylıkla çözünürler. PLGA'nın yapısında bulunan ester bağları su içerisinde hidroliz olmaktadır. 50/50 oranındaki poli (laktid-ko-glikolid) (PLGA) yaklaşık olarak 1-2 ay, 75/25 oranındaki PLGA 4-5 ay ve 85/15 oranındaki PLGA 5-6 ayda bozunur. Bozunma esnasında asidik ürünler oluşmakta

ve bu ürünler doğal metabolik yollarla organizmadan atılmalarına rağmen hastalarda düşük inflamasyon reaksiyonlarına yol açabilmektedir. Düşen pH, polimerin bozunma hızının da artmasına neden olmaktadır.

PLGA FDA onaylı bir polimerdir ve sahip olduğu biyouyumluluk ve biyobozunurluk özellikleri sayesinde deri doku rejenerasyonu, kalp doku rejenerasyonu ve ilaç taşıyıcı sistemler olmak üzere birçok doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır. Ayrıca PLGA destek yapılarının fibroblastlar, kondrositler ve düz kas hücreleri olmak üzere farklı birçok hücre tipinin büyümesinde gerekli olan doku çatısı yüzeyini sağladığı ispatlanmıştır (Langer 2007).

2.5.2. Polikaprolakton (PCL) Polimerleri

Alifatik poliester ailesinin diğer bir üyesi olan PCL; yarı kristalin yapıda olan sentetik bir polimerdir. Poliester ailesine mensup PLA, PGA ve PLGA ile karşılaştırıldığında PCL hidrofobik özelliğinden dolayı, düşük degradasyon hızına sahip olması nedeniyle doku iskelesi üretiminde daha az kullanılmaktadır. Fakat, hidroliz atağına karşı sahip olduğu gelişmiş dirence rağmen diğer biyobozunur polimerlerden daha düşük fiyata sahip olduğundan, elektroçekim ile nanolif üretimi için cazip bir polimerdir (Kazaroğlu 2009).



Şekil 2.19 PCL sentezi (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pcl_synthesis.png, 2019).

PCL sentezi, ε-kaprolaktonun 170°C'de azot atmosferinde, dibütil kalay oksit (Bu₂SnO) katalizörünü, halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenmektedir (Şekil 2.20). ε-kaprolakton, çok sayıda farklı monomerle de (etilen oksit, stiren, metil metakrilat, vinil asetat vb.) kopolimerleştirilebilmektedir. Bu özellikleri sayesinde PCL, doku

mühendisliği çalışmalarında hem tek başına, hem de diğer polimerlerle birlikte görev alabilmektedir (Dalkıranoglu 2016).

PCL, Amerikan Gıda ve İlaç Federasyonu (FDA) tarafından insan vücudu ile uyumlu olduğu onaylanmış, doku mühendisliği ve kontrollü ilaç salımı uygulamalarında film, kompozit, insan yapı iskelesi, nanoparçacık, mikroküre, hidrojel gibi formlarda yaygın olarak kullanılan biyobozunur bir polimerdir (Dalkıranoglu 2016).

Kloroform, Diklormetan (DCM), dimetilformadi (DMF), tetrahüdrofuran (THF) gibi pek çok çözücü ile çözelti oluşturulabilen ve kolaylıkla elektroçekim işlemi uygulanabilmektedir. PCL endotel hücrelere karşı çok iyi biyoyapışma ve tutunma özelliği göstererek, hücrelerin yaşayabilmeleri, büyümeleri ve çoğalmaları için uygun ortamı sağlar (Johanas 2008). Bu özelliğiyle PCL özellikle yara örtücü ve doku mühendisliği uygulamaları için iyi bir adaydır (Doğan 2012).

2.6. DOKU İSKELETİNDE KULLANILAN HÜCRELER

Doku iskelesinin uygulanacağı alanda orijinal doku fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için doku tipine uygun hücre seçimi yapılmalıdır. Üç tip hücre kaynağı söz konusudur; otolog hücreler, allojenik hücreler ve zenojenik hücreler. **Otolog hücreler** hastanın kendisinden elde edilen hücrelerdir. Bu hücrelerin transplantasyonu sonrasında immünolojik reaksiyona neden olmamaları nedeniyle doku mühendisliği çalışmaları için ideal kullanıma sahiptir. Ancak hastadan alınan hücrelerin az sayıda olması dezavantajlarıdır ve bu nedenle doku mühendisliğinde kullanımı kısıtlı kalmaktadır. **Allojenik hücreler** ise, aynı türdeki farklı bir bireyden elde edilen hücrelerdir. Uygun maliyetle daha fazla sayıda hücrenin elde edilebilmesine imkan tanınması, allojenik hücrelerin kullanımını avantajlı kılmaktadır. Ancak bu uygulamanın hastada immün cevap oluşturma ve hastalık geçişi olma riski bulunmaktadır. Diğer hücre kaynağı ise farklı türdeki canlılardan elde edilen **zenojenik hücrelerdir**. Bu hücre grubu immün cevap oluşturma, hastalık ve hayvansal virüs gibi patojen faktörleri hastaya taşıma riski gibi önemli dezavantajlara sahiptir (Pachence ve Kohn. 2000; Murugan ve Ramakrishna 2007).

Son yıllarda hücre kaynağı olarak çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir diğer hücre kaynağı **kök hücrelerdir**. Kök hücreler ise sınırsız bölünebilme, kendini yenileyebilme ve birçok farklı fenotipe dönüşebilme özelliğine sahip hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler, kemik iliği ve kordon kanından elde edilen kök hücreler, günümüzde bilinen üç temel kök hücre kaynağıdır (Kazaroğlu 2009).

Deri doku mühendisliğinde araştırma amaçlı olarak sıklıkla allojenik ve zenojenik hücreler kullanılmaktadır. Allojenik hücreler, yara örtüsü olarak üretilmiş ticari ürünlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Hastanın kendisinden alınan otojenik hücre kullanımı da mevcuttur (Kazaroğlu 2009).

2.6.1. Kök Hücreler

Kök hücreler, kendi kendini yenileme özelliğine sahip hücrelere verilen isimdir. Elde edildikleri dokuların özelleşmiş hücrelerine farklılaşabildikleri gibi özel biyolojik sinyallerle fenotipik olarak prekürsöründen farklı özel hücreye farklılaşabilirler (Ural 2006).

Kök hücreler uzun süre bölünebilme ve kendi kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahiptirler, özelleşmemişlerdir fakat özelleşmiş hücrelere dönüşmek üzere kaynak oluşturabilir yapıdadırlar; yani farklılaşabilme özelliğine sahiptirler. Ayrıca kök hücreler hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrar çoğaltabilirler ve in vivo koşullarda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmamış kuşaklara katkı sağlayabilirler (Ural 2006).

Embriyonik kaynaklı kök hücre izolasyon metotlarına göre, klinik kullanım açısından, embriyonik kaynağa göre daha sınırlı bir farklılaşma karakteristiği olan erişkin kaynaklı kök hücre izolasyon yöntemleri de son yıllarda hızlı bir şekilde artış göstermiştir.

Erişkin kök hücreler, kemik iliği, kalp, böbrek, beyin, deri, göz, gastrointestinal sistem, karaciğer, pankreas, akciğer, meme, over, prostat ve testis gibi organlarda tespit

edilmiştir. Erişkin kök hücreler, mikroçevrelerindeki değişiklikleri takiben proliferere olabilirler veya daha olgun ve dokuya özel hücre tiplerine farklılaşabilirler (Ural 2006).

Epidermal Kök Hücreler:

Bir erişkin kök hücre alt grubu olarak epidermal kök hücreler, kıl folikülü ve epidermis içerisinde yer alırlar. Bu hücreler klasik olarak yavaş sikluslu, uzun süre yaşayabilen ve deride kese bölgesinde bulunan hücrelerdir. Gen ekspresyon çalışmaları kese bölgesinde bulunan epidermal kök hücrelerde çok sayıda kök hücre belirteci ve yolağı göstermiştir. Epidermisteki kök hücreler epidermal katların rekonstrüksiyonunda esas hücre kaynağıdır. Epidermal kök hücrelerin izolasyonu, kültürü ve üretimi deri hastalıklarının tedavisinde kullanılan doku mühendisliği için önemlidir (Köse 2010).

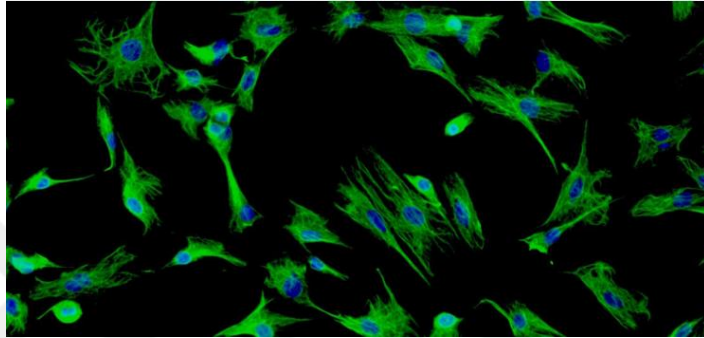
Bugün epidermiste, pilosebase ünit etrafında yer alan epidermal kök hücreler; sabit lokalizasyonlu, yüksek derecede proliferasyon gösterebilen holoklon hücrelerdir. Epidermiste yer alan tüm keratinositlerin %4-8'ini kaplayan, yüksek çekirdek/sitoplazma oranına sahip, uzun dönem proliferatif kapasiteli olabilen bu hücreler bugün saptanabildiği kadarı ile yara iyileşmesindeki uyarı ile harekete geçme dışında oluştukları ilk andan itibaren hücre bütünlüğü ve yapısını hiç değiştirmeden yıllarca sabit bir şekilde durabilmektedirler. Epidermal kök hücrelerle ilgili ilk araştırmaların başladığı 15 yıl önce, bu hücrelerin interfolliküler alanda, sebase gland etrafında ve kıl kökü papillasında olduğu saptanmıştı. Bugün ise, özellikle dermal papilla ve dış kök kılıfında yerleşen hücrelerden geliştirilen uyarılmış pluripotent kök hücrelerden embriyonik kök hücre özelliklerini taşıyan keratinosit, melanosit ve fibroblast üretmek olasıdır (Köse 2015).

2.6.2. Fibroblastlar

Fibroblast hücreler, bağ dokusunun temel hücreleridir ve hücre dışı matris (ECM) proteinlerinin birincil kaynağıdır. Ayrıca kollajen ve elastinin sentezini gerçekleştirmektedir. Fibroblastın bağ dokusunda aktif olmayan haline fibrosit adı verilmektedir (Green ve Rheinwald 1977). Fibroblastların morfolojisi, fonksiyonlarına ve

etki bölgelerine bağlıdır. Belirli bir bölgeden çıkarılan fibroblastlar, orijinal konumlarını "hatırlayabilir" ve vücuttaki başka bir yere nakledildiklerinde işlev görebilirler (<https://www.creative-bioarray.com/filter/fibroblast-cell-and-media-12.html>, 2019).

Fibroblastlar tipik olarak oval yassı çekirdeğe sahip iğ şeklindeki hücrelerdir. Akciğerde, genellikle epitel veya endotele yakından uygulanan çok karmaşık çok hücreli ortamlarda bulunurlar (A. Murray ve ark. 2009).



Şekil 2.20 Fibroblast hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (<https://www.creative-bioarray.com/filter/fibroblast-cell-and-media-12.html>, 2019)

Sentezledikleri matris metalloproteinaz enzimleri (MMPs) aracılığıyla bağ dokudaki kollajen ve elastin fiber döngüsünü (sentez ve yıkım) gerçekleştirirler. Temel görevi ECM'in yıkımı olan MMP'lerin dokuların şekillenmesi, anjiyogenez, morfogenez ve yara iyileşme sürecinde önemli rol oynadıkları bilinmektedir (Vu ve ark. 2000).

Literatürde, otolog ya da allojenik kaynaklardan elde edilen fibroblast hücreleri ve fibroblast hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilen oldukça fazla sayıda deri doku mühendisliği araştırması mevcuttur (Auger ve ark. 2004; Abbasi ve ark. 2008; Tıgılı ve ark. 2010).

2.6.3. Keratinositler

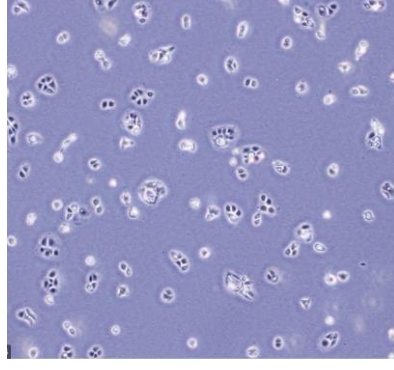
Keratinositler, epidermis olarak adlandırılan derinin en dış tabakasında bulunur. Epidermis %95 keratinosit hücrelerinden oluşur. Bazal tabakadaki hücrelere bazen bazal keratinositler veya bazal hücreler denir (<https://www.news-medical.net/health/Basal-Cells-Keratinocytes-and-Melanocytes.aspx>, 2019).

Keratinositler, epidermisin bazal tabakasında doğarlar ve olgunlaşırken dış tabakalara göç ederler ve uçta farklılaşırlar. Keratinositler stratum korneum'u veya deri en dış (ölü) katmanını oluşturur. Keratinositler, cildin bütünlüğünü koruyan yapısal bir protein olan keratin üretir.

Diğer birçok hücre tipinde olduğu gibi, keratinosit düzensizliği hastalığa yol açabilir. Bunlardan, sedef hastalığı, keratinositlerin hiperproliferasyonundan kaynaklanan çok yaygın bir cilt hastalığıdır (<https://www.lifelinecelltech.com/keratinocytes-barrier-to-the-outside-world/>, 2019).

Bu hücrelerinin temel amacı, mikrobiyal, viral, fungal ve parazitik gibi patojenlere karşı karşı korur. Ayrıca, UV radyasyonuna karşı koruma sağlarken ısı, nem ve su kaybını da önler. Epidermal asitlenme, DNA yıkımı, yağ asidi metabolizması ve taşınımı, lokal immün yanıtlar, hücre yenilenmesi, kök hücre farklılaşması ve tümör oluşumu gibi derinin bir dizi fenomenini araştırmak için kullanılırlar. Ayrıca hücre dışı matris içindeki sinyal iletiminde önemli bir rol oynar (<https://www.news-medical.net/health/Basal-Cells-Keratinocytes-and-Melanocytes.aspx>, 2019).

Keratinositler, immünomodülatörler olarak işlev görür ve herhangi bir kesik veya yaralanma olmadığında, iltihabı tetikleyen önleyici sitokinler üretir; Son olarak, yaralanmalara cevap olarak, Langerhans hücreleri keratinositler tarafından aktive edilir. Deri enfekte olduğunda, Langerhans hücreleri, yırtılmış ciltten vücuda giren mikrobiyal antijenlere etki eden ilk hücreler olan antijen sunan hücreler gibi performans gösterir.



Şekil 2.21 Keratinosit hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (<https://www.news-medical.net/health/Basal-Cells-Keratinocytes-and-Melanocytes.aspx>, 2019)

Keratinosit, pigment üreten melanosit ve fibroblastların normal vücut hücrelerinden veya kanserli deri dokularından elde edilen hücre hatları da amaca göre kolay temin edilebilir olduklarından deri doku mühendisliği ve yara örtüsü uygulamalarında sıkça kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda kullanılan hücre hatlarından bazıları; normal vücut hücrelerinden elde edilen 3T3 (fare fibroblastı), L929 (fare fibroblastı), insan dermal fibroblastı (HDF) olarak sıralanabilir. Bu hücre hatları, hücre-polimerik matris etkileşimlerini gözlemleyebilmek için deri doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar (Kazaroğlu 2009).

2.7. DOKU İSKELETİ TİCARİ ÜRÜNLER

Günümüzde, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından klinik uygulamalar için pek çok doku mühendisliği ürünü onaylanmıştır. İlk deri doku mühendisliği ürünü olan TransCyte® 1997 yılında onaylanmış, bunu takiben 1998 yılında yine doku mühendisliği yaklaşımıyla geliştirilen ve ilk allojenik özellikteki ürün olan Apligraf®'ın FDA onayı alması ve klinik uygulama aşamasına geçmesi, 2002 yılında ise ağır yanıkların tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanan Integra®'nın medikal ürün pazarına sunulması izlemiştir.

Ticari olarak temin edilebilen cilt ikameleri, aselüler (örneğin, AlloDerm® ve Integra®) ve hücresele greftler olarak sınıflandırılabilir. Hücresele deri ikameleri, hedefledikleri deri katmanına göre ayrıca sınıflandırılabilir:

- (a) epidermal (CellSpray, MySkin),
- (b) dermal (Hyalograft 3D, Dermagraft®, AlloDerm, Integra®)
- (c) epidermal-dermal kompozit (PermaDerm™, Apligraf®)

Çizelge 2.2 Deri Doku İskeleleri Bazı Ticari Örnekler

Epidermal	Dermal	Epidermal-dermal kompozit
MySkin® Destekleyici silikon membran üzerinde otolog keratinosit hücrelerinin kültürasyonu ile üretilen bu ürün, nöropatik ve diyabetik ayak ülserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Derin yaralanmalarda, deri greftleri ile desteklenerek yara yatağına uygulansa da, tam anlamıyla dermal	Dermagraft® İnsan kökenli neonatal fibroblastların poliglaktin film üzerinde kültüre edilmesi ile hazırlanmaktadır. Fibroblastlar film üzerinde çoğalırken vitronektin, tenaskin, kollajen ve diğer ECM elemanı glikozaminoglikanları sentezlerler. Bu esnada poliglaktin film hidroliz sonucunda bozunmaya başlar. Yaralı bölgeye keratinosit	Apligraf® Sığır kökenli Tip-I kollajen jel matris ve bu matrisin yüzeyinde sırasıyla allojenik neonatal keratinosit hücrelerinin oluşturduğu epidermis yapısı ve alt tabakada allojenik neonatal fibroblastları içeren bir üründür. Venöz ülserler, diyabetik ülserler ve skleroderma (bağ dokudaki kollajen artışına bağlı gelişen

<p>iyileşmeyi sağlayamadığı kaydedilmiştir (Dalkıranoglu, 2011)</p>	<p>göçünü uyarması, fibrovasküler onarımı desteklemesi ve raf ömrünün uzun olması (6 ay) önemli bir özelliğidir. Diyabetik ülserlerin ve venöz ülserlerin tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen bu ürünün, hücrelerin allojenik olması nedeniyle immün reaksiyon gelişimi riski taşınması ve yüksek maliyetli olması gibi olumsuz özellikleri de mevcuttur [Mansbridge, 2007].</p>	<p>kronik ve otoimmün bir hastalık) yaralarının tedavisi için uygun özelliktedir(Dalkıranoglu, 2011).</p>
<p>CellSpray® Alt kültürü yapılan keratinosit hücrelerinin hastaya nakledileceği zaman hücre hasatının yapılarak yara yatağına spreyleneceği şeklindeki uygulamadır. Klinik Hücre Kültürü Şirketi (Perth, Avustralya) tarafından geliştirilen metodun, kısmi kalınlıktaki yaralara erken dönem müdahale ile olumlu etkiler geliştirdiği bildirilmiştir. Yara yatağına acil hücre takviyesi sağlayarak yara kapanmasını desteklese de, tam kalınlıktaki ve geniş</p>	<p>Alloderm® Dondurarak-kurutma tekniği uygulanarak hücreler hâle getirilen kadavra derisinden hazırlanan dermal matris bileşenidir. Yara yatağına kolaylıkla uygulanabilir ve hücre içermediği için immün yanıt oluşumuna neden olmaz. Periodontal cerrahide ve dermal kayıpları içeren yaralanmalarda uygulandığı belirtilmiştir. Damarlanmayı ve dermal rejenerasyonu indükleyen ECM elemanlarını bünyesinde barındırdığından dolayı dermal yapılanma için iskelet</p>	<p>PermaDerm™ Kollajen substrat üzerinde kültürlenmiş otolog fibroblastlardan ve keratinositlerden oluşan hem epidermal hem de dermal bileşenleri içerir. Dermal ve epidermal tabakaların kalıcı olarak değiştirilmesi ile tek adımlı bir prosedür olma avantajına sahiptir. Bununla birlikte, henüz herhangi bir klinik çalışma bildirilmemiştir (Komal Vig ve Ark, 2017).</p>

<p>çaplı yaralarda uygulanamamaktadır (Dalkıranoglu, 2011).</p>	<p>görevi üstlenmektedir(Dalkıranoglu, 2011).</p>	
	<p>Integra® Derin yanık yaralarının tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen bu ürün, yara yüzeyinde hızlı bir şekilde nem kontrolü ve bakteriyal koruma sağlar. Silikon membran yüzeyin, sığır tendon kollajeni ve bir glikozaminoglikan olan kondroitin-6- sülfat ile desteklenmesiyle üretilir. Vaskülarizasyonu takiben 3 haftalık bir süre boyunca yara yatağında, onarım dokusu “neodermis” şekillenmesinde astar görevi üstlenir. Yaraya naklinden sonra silikon membran uzaklaştırılır (Dalkıranoglu, 2011).</p>	
	<p>Hyalograft 3D® Bu üründe, kültürlenmiş fibroblastlar, bir 3D hyaluronik asit türevi iskeleye ekilir (Komal Vig ve Ark, 2017).</p>	

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada sentetik polimerlerden olmak üzere iki çeşit polimer kullanılmıştır. SIGMA ALDRICH firmasından Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve Polikaprolakton (PCL) cipsleri ticari olarak elde edilmiştir. Molekül ağırlığı 66.000-107.000, kopolimer oranı (75:25) olan Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) cipsini çözmek için Bursa Teknik Kimya'dan alınan tetrahidrofuran (THF) ve dimetilformamid (DMF) kimyasalları kullanılmıştır. Molekül ağırlığı 80.000 olan Polikaprolaktan (PCL) cipslerini çözmek için de ilk olarak Bursa Tekstil Kimya'dan alınan, diklormetan (DCM) ve dimetilformamid (DMF) kimyasalları kullanılmıştır.

1. deney için %15'lik PLGA çözeltisinde 1,5 gram PLGA, 4,25 DMF, 4,25 gram THF oluşan çözelti yaklaşık 2 saatlik bir sürede 60 °C'de manyetik karıştırıcıda elde edilmiştir.
2. deney için %10'luk PCL çözeltisinde 2 gram PCL, 10,8 gram DMF ve 7,2 gram DCM'den oluşan 20 gramlık çözelti yaklaşık 2 saatlik bir sürede 40 °C'de manyetik karıştırıcıda elde edilmiştir.
3. deney için %15'lik PLGA çözeltisinde 1,5 gram PLGA, 4,25 DMF, 4,25 gram THF oluşan çözelti yaklaşık 2 saatlik bir sürede 60 °C'de manyetik karıştırıcıda elde edilmiştir.
4. deney için %10'luk PCL çözeltisinde 2 gram PCL, 10,8 gram DMF ve 7,2 gram DCM'den oluşan 20 gramlık çözelti yaklaşık 2 saatlik bir sürede 40 °C'de manyetik karıştırıcıda elde edilmiştir.
5. deneyde %20'lik PLGA çözeltisinde 2 gram PLGA, 4 gram DMF, 4 gram THF eklenerek oluşturulan 10 gramlık çözelti yaklaşık 2 saatlik bir sürede 60 °C'de manyetik karıştırıcıda elde edilmiştir.
6. deneyde %20'lik PLGA çözeltisinde 1,18 gram PLGA, 2,36 gram THF, 2,36 gram DMF eklenerek yaklaşık 2 saatlik bir sürede 60°C'de manyetik karıştırıcıda elde edilmiştir.

Doku çatısı olarak kullanılmak üzere üretilen nanolifli PLGA ve PCL yüzeylere fibroblast (ATTC Primary Cell Fibroblast Basal Medium) hücrelerinin ekimleri yapılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Elektroçekim Yöntemi

Elektroçekim yönteminde polimer çözeltisinden lif çekimi için elektriksel kuvvetlerin polimer cinsine bağlı olarak belirli bir oranda gerçekleşmesi gerekmektedir. Kuvvet, çözeltinin yüzey gerilimini aştığında çözeltiden çıkan polimer iğne ucuna ulaştığında elektriksel kuvvetin etkisine uğrayarak Taylor konisini oluşturur ve toplayıcıya doğru hareket ederken katılaşır. Bunun sonucunda toplayıcı yüzey üzerinde ultra ince polimerik lifler oluşur.

Bu çalışmada, sağladığı gözenekli yapı, ince lif olanağı, yüksek yüzey alanı / hacim oranı ve ayarlanabilir gözenek boyutu dağılımı sayesinde çeşitli travmalar sonucu hasara uğramış deri dokusunun ikamesi yerine kullanılabilen nanolifli yüzeyler üretebilmek için elektroçekim yönteminden faydalanılmıştır.

Nanolifli yüzey üretimi aşamasında yüzey morfolojisine birçok parametrenin etki ettiği bilinmektedir. Bunlardan ilki polimer ve çözücüsünün seçimidir. Doku mühendisliğinde kullanılacak polimerin biyolojik olarak uyumlu ve biyobozunur olması beklenmektedir. Literatürde pek çok malzemenin doku mühendisliğinde uygulaması vardır ancak malzeme seçimi kullanım amacına göre değişmektedir. Önerilen tezde PLA ve PLGA polimerlerinin kopolimeri olan ve yüksek gözeneklilik olanağı ile iyi derecede biyouyumluluğa sahip olması nedeniyle PLGA polimeri kullanılmıştır. Bununla birlikte diğer katmanları oluşturmak amacıyla; iyi mekaniksel özellikleri, düşük maliyeti, biyouyumlu ve biyobozunur özelliklerinin iyi olduğu PCL polimeri kullanılmıştır. Polimer seçimi sonrasında uygun çözücünün belirlenmesi için literatür ışığında PCL polimeri için DCM ve DMF çözücüleri, PLGA polimeri içinse DMF ve THF çözücüleri kullanılmıştır.

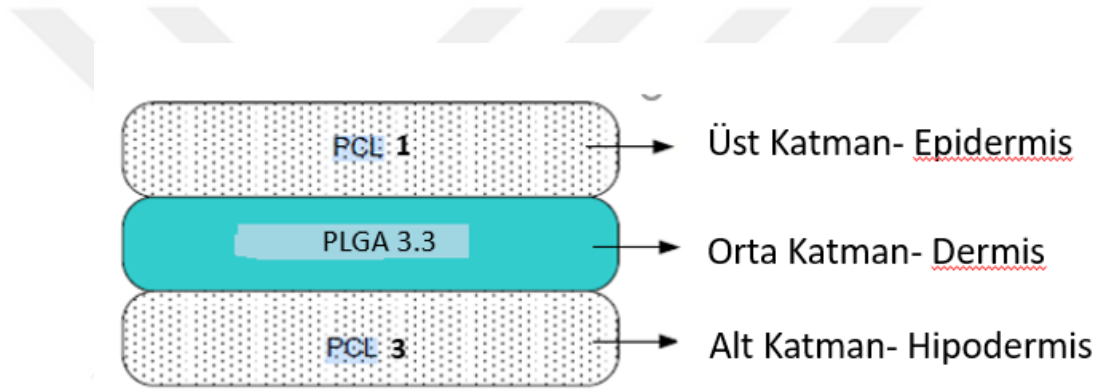
Deri yapısı 3 katmanlı olmasından kaynaklı farklı polimerler ve farklı parametreler (pompa hızı, toplayıcı plaka ile enjektör ucu arasındaki mesafe, polimer besleme hızı, polimer için uygun çözücü/çözücü sistemi gibi önemli parametreler) denenerek doku iskele yapısını ikame edebilecek yüzeyler çalışılmıştır. Homojen lif çapı dağılımına sahip,

boncuk oluşumu içermeyen ideal özellikteki nanoliflerin işlem parametreleri değiştirilerek optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nanolif iskelelerin mekanik özellikleri de belirlenmiştir.

Bu amaçla,

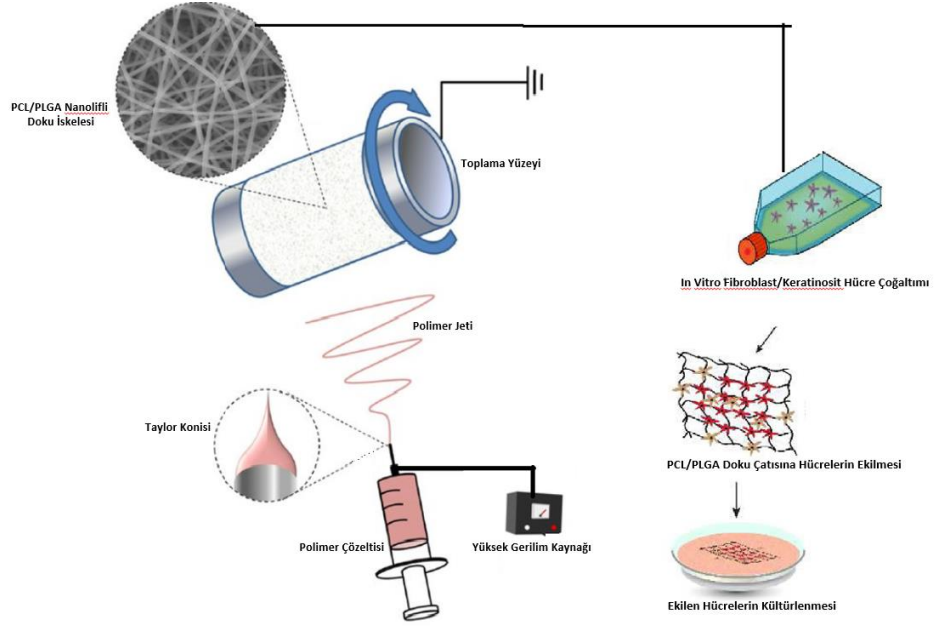
1. Katman PCL polimeri ile Epidermis (paralel-düzenli yapı: 32-42 μm)
2. Katman PLGA polimeri ile Dermis (düzensiz yapı: 949-1,350 μm)
3. Katman PCL polimeri ile Hipodermis (1,9-7,1 μm)

çalışılmıştır(Şekil 3.1).



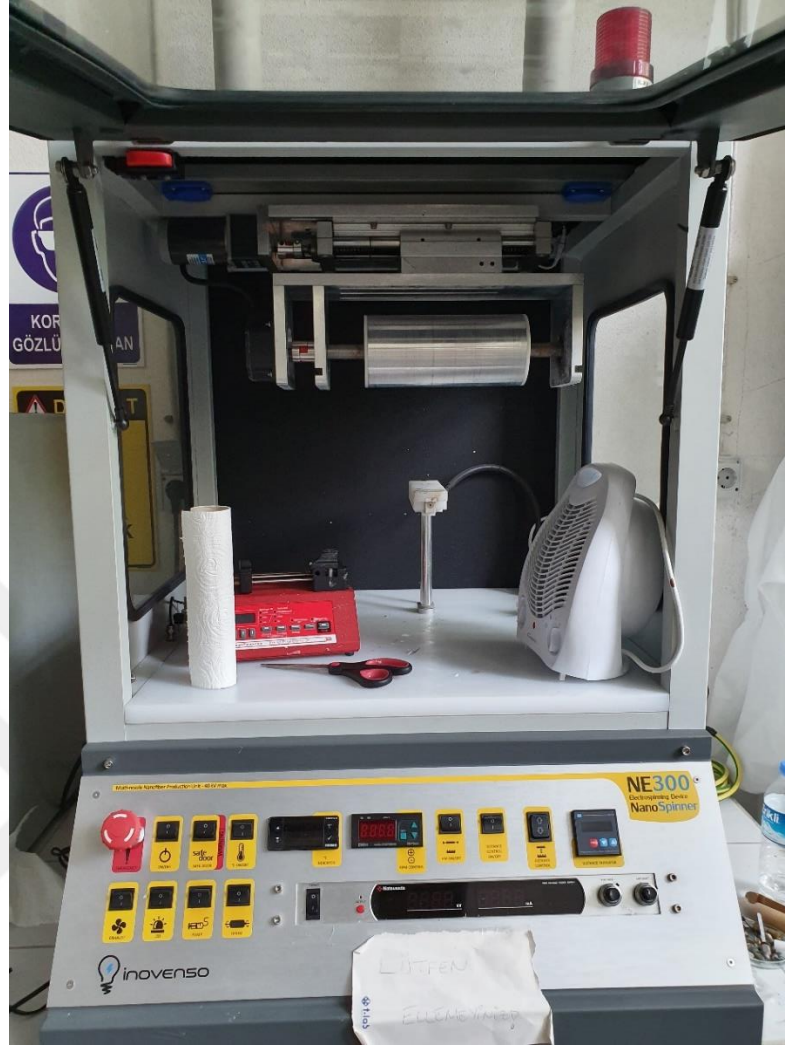
Şekil 3.1 Geliştirilmekte olan deri doku iskelesi

Üretilen yüzeylerin katman sırasına göre fibroblast ve keratinosit hücreler ekilip hücre çoğalması incelenmiştir (Şekil 3.2). Ayrıca hücrelere RNA izolasyonu yapılarak RNA kalitesi belirlenmiş, taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile PLGA ve PCL nanoliflerden elde edilen iskeleler, hücrelerin bu iskelelere tutunması incelenmiştir.



Şekil 3.2 Elektroçekim sisteminin şematik şekli ve üretilen iskelelerin hücre ekilerek kültürlenmesi

Doku çatısı olarak kullanılmak üzere oluşturulan PCL ve PLGA nanolifli yüzeylerin üretimi Uludağ Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Laboratuvarı'nda bulunan NE300 Nanospinner model, Inovenso marka elektroçekim düzeneğinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Düzenek; besleme pompası, düze, şırınga, iğne, toplama yüzeyi ve yüksek voltaj kaynağından oluşmaktadır. Toplama yüzeyi olarak çapı 120 mm olan döner silindir kullanılmıştır.



Şekil 3.3 U.Ü. Tekstil mühendisliği Laboratuvarı'nda bulunan elektroçekim düzeneği

Üretilen yüzeylerin kalınlık ölçümleri Electronic Digital Micrometer ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Nanolifli yüzeyler mikrometrenin çeneleri arasına yerleştirilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4 Electronic Digital Micrometer görüntüsü

3.2.1.1. Poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) Doku İskelelerin Hazırlanması

Dermis katmanı olarak geliştirilmesi hedeflenen PLGA nanolif doku iskeleleri, elektroçekim yöntemiyle üretilmiştir. PLGA nanoyüzeyleri üretimi öncesinde literatürde PLGA üretiminde çalışılan parametreler incelenmiş, bu bilgiler ışığında üretim denemeleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 PLGA ile Yapılan Çalışmalarda Daha Önce Elde Edilen Veriler

Çalışılan Polimerler	PCL/PLGA -BCP	PLGA/PCL / Collagen I	PCL/PLGA	PLGA/HA	PEG/PLGA
PARAMETRELER					
PLA ve PGA Oranları	LA/GA 85:15	LA/GA 75:25	50:50	50:50	LA/GA 75/25
PLGA Polimerinin Moleküler Ağırlığı	Mw=66.000 0-107000	Mw =120,000 Da	Mw =100,000 Da	Mw=48,000 w	Mw=90 kD
Kullanılan Çözücü Maddeler	tetrahydrofuran, dimethylformamide	2,2,2-trifluoroethanol	Dimethyl sulfoxide (DMSO) and hexafluoroisopropanol (HFIP), Tenofovir (TFV)		N-N-methamphetamine/acetone/chloroform (volume)
Ağızlık ve Toplayıcı Arasındaki Mesafe		13–18 cm.	15 cm	15.0 cm	20 cm
Çalışılan Voltaj Değeri	25 kV	16 kV	10 kV	15 kV	13 and 21 kV
Çözelti Besleme Değeri		0.6 mL h-1.	20 µL/min	1 ml/h	7 mL/h

Kaynaklar: (Li ve ark. 2014, Lee ve ark. 2015, Khalil ve ark. 2013, Meng ve ark. 2010)

Bu doğrultuda PLGA nanolifli yüzeylerin hazırlanması için granül haldeki PLGA ve çözücü olarak belirlenen dimetilformamid (DMF) ve tetrahydrofuran (THF) çözücüleri, %15-20 (w/v) konsantrasyonlarında olacak şekilde hazırlanarak, 2 saat boyunca 70 °C'

de manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözelti haline getirilmiştir. Hazırlanan polimer çözeltisi 10 ml'lik şırıngalara alınmış ve 25 G (= 0,46 mm) iç çapında iğne ucu takılarak besleme pompasına yerleştirilmiştir. İğne ucu-toplayıcı arasındaki mesafe 15-20 cm arası, lif çekimini sağlamak için de uygulanan voltaj 16-25 kV arasında belirlenmiştir. Toplayıcı yüzey olarak döner silindir kullanılmıştır.

Besleme hızı, iğne ucu-plaka mesafesi, iğne ucundaki voltaj, konsantrasyon gibi değişkenlerde farklı değerler uygulanarak ile en uygun yönlenmenin bulunabilmesi için birçok deneme yapılmıştır. Bu denemeler sonucu, PLGA nanoliflerin oluşturulabildiği optimum koşullar seçilerek deneylere bu koşullarda üretime devam edilmiştir.

3.2.1.2. Polikaprolakton (PCL) Doku İskelelerin Hazırlanması

Epidermis ve hipodermis katmanı olarak geliştirilmesi hedeflenen PCL nanolif doku iskeleleri, elektroçekim yöntemiyle üretilmiştir. Öncelikle literatür çalışmalarından yola çıkarak PCL için uygun çözücü olarak dimetilformamid (DMF) ve diklorometan (DCM) belirlenmiştir. %10 olarak belirlenen konsantrasyonda polimer çözeltisi 2 saat boyunca 40 °C' de manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan polimer çözeltisi 10 ml'lik şırıngalara alınmış ve 25 G (= 0,46 mm) iç çapında iğne ucu takılarak besleme pompasına yerleştirilmiştir. İğne ucu-toplayıcı arasındaki mesafe 14 cm, lif çekimini sağlamak için uygulanan voltaj ise 15-20 kV arasında belirlenmiştir. Epidermis katmanında paralel lif yönlenmesinin sağlanabilmesi için toplayıcı yüzey olarak döner silindir kullanılmış ve döner silindir 100-1000 rpm hızları ayarlanarak hareketli kılınmıştır.

Çizelge 3.2 PCL ile Yapılan Çalışmalarda Daha Önce Elde Edilen Veriler

Çalışılan Polimerler	PCL/PANI	PLGA/PCL	PCL	PCL
PARAMETRELER				
Kullanılan Çözücü Maddeler	DMF, CHCl ₃	2,2,2-Trifluoroethanol		Kloroform/metanol
Ağızlık ve Toplayıcı Arasındaki Mesafe	15 cm	13-18 cm	17 cm	12 cm
Çalışılan Voltaj Değeri	18 kV	16 kV	16 kV	12 kV
Çözelti Besleme Değeri		0.6 mL/h	2 mL/h	2 mL/h

Kaynaklar: (Li ve ark. 2016; Qian ve ark. 2016; K. Bhullar ve ark. 2017; Ghosal ve ark. 2016)

3.2.2. Nanolifli Yapılı Doku İskelelerin Karakterizasyonu

3.2.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri

Üretilen nanoliflerin incelikleri, çapları, yüzey morfolojisi gibi özellikleri ile ilgili bilgi edinmek ve hücre ekimi işleminden sonra yüzeyde hücrelerin çoğalma durumunu gözlemlemek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri yapılmıştır. SEM analizleri Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi bünyesinde bulunan Carl Zeiss Evo 40 model (SEM) cihaz ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). SEM analizi öncesinde nanolifli yüzeyler 3CD 005 SPUTTER COATER makinesinde %60 altın ve %40 paladyum ile kaplandıktan sonra SEM cihazında incelenmiştir. Ortalama nanolif çapları ImageJ yazılımı kullanılarak ve 10000x büyütmedeki SEM fotoğrafları üzerinden ortalama hesaplanmıştır.



Şekil 3.5 Carl Zeiss marka taramalı elektron mikroskobu

3.2.2.2. Gözeneklilik ve Gözenek Çapı Hesaplaması

Doku iskeletinde hücrelerin ve besin maddelerinin akışını sağlamak için yapının yüksek bir gözeneklilik derecesine (>40-60) ve geniş bir yüzey alanına sahip olmalıdır. Üretilen PLGA ve PCL nanolifli doku çatılarının gözenek çapı ve gözeneklilik değerleri sırasıyla, Eşitlik 1 ve Eşitlik 2'den yararlanılarak hesaplanmıştır. Numunelerin yığın yoğunluklarının hesaplanması için üretilen numunelerin yüzey alanı kare şeklinde bir parça kesilmiştir. Kesilen parçanın eni (cm), boyu (cm), kütlesi (g) ve kalınlığı (cm) ölçülerek parçanın hacmi (v) hesaplanmıştır. Sonrasında gözenek çaplarının hesaplanması için Eşitlik 3' den faydalanılmıştır.

$$\text{Nanolifli yüzeylerin yoğunluğu (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{matris kütlesi(g)}}{\text{matris kalınlığı (cm) x matris alanı (cm}^2\text{)}} \quad \text{(Eşitlik 1)}$$

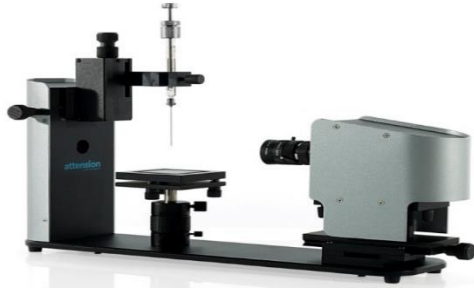
$$\text{Nanolifli yüzeylerin gözenekliliği (\%)} (\epsilon) = 1 - \frac{\text{Nanolifli yüzeylerin yoğunluğu (g/cm}^3\text{)}}{\text{malzemenin yığın yoğunluğu (g/cm}^3\text{)}} \quad \text{(Eşitlik 2)}$$

$$\text{Gözenek Çapı} = \frac{\pi \times \text{lif çapı}}{4 \times (1 - \text{Nanolifli yüzeylerin gözenekliliği (\epsilon)})} \quad \text{(Eşitlik 3)}$$

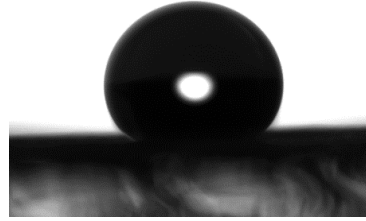
3.2.2.3. Temas Açısı Hesaplamaları

Doku iskelesi uygulamalarında, hücrelerin doku iskelesine kolay tutunması adına ıslanabilirlik oldukça önemli bir özelliktir. Numunelerin temas açısı ölçümleri Uludağ Üniversitesi Tekstil Mühendisliği bünyesinde bulunan KSV- The Modular CAM 200 system marka cihazda sabit damla metodu ile ölçülmüştür. Deneysel düzenek kamera, bilgisayar ve monitörden oluşmaktadır. Lam üzerine yerleştirilen her bir numune üzerine sıvı damlalar mikrometre pipet ile yerleştirilmiş ve her damlanın şekli bilgisayar sistemine bağlı kamera ile çekilmiştir. Çekilen resimler monitörde görüntülenmiştir. Resimler sıvı damlalar numune yüzeyine yerleştirildikten sonra mümkün olan en kısa süre içinde çekilmiştir ve 3 sn.'nin altında bir sürede fotoğraflanmıştır. Her damlacığın sağ ve sol temas açıları ölçülerek, her örnek için ortalama değerler hesaplanmıştır.

a)



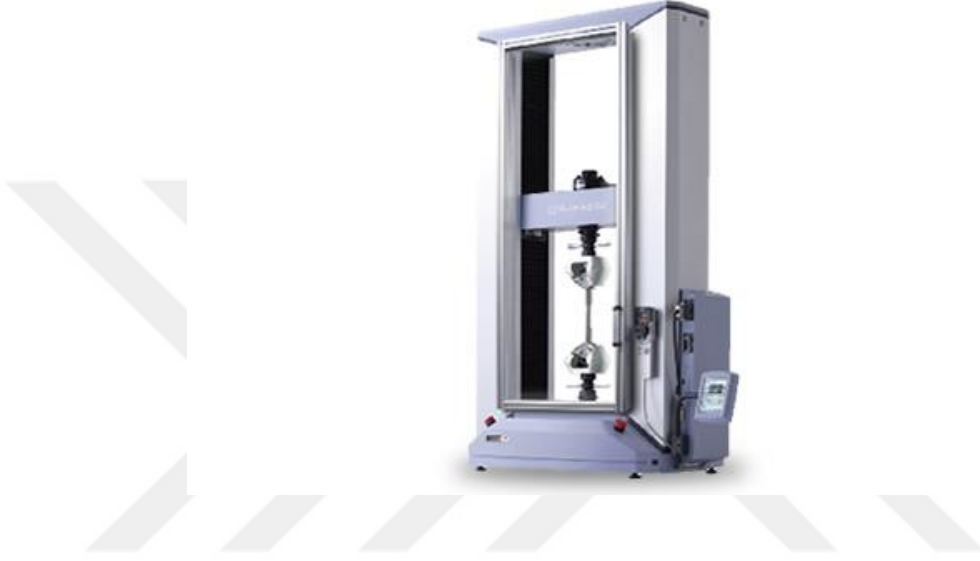
b)



Şekil 3.6 a) KSV Attension ThetaLite Yüzey Gerilimi-Temas Açısı Ölçüm Cihazı b) U.Ü. Tekstil Mühendisliği Laboratuvarı'nda bulunan temas açısı ölçüm cihazı ile yapılan ölçümlerden bir görüntü

3.2.2.4. Çekme Testi

Mekanik özelliklerin tayininde kullanılan en yaygın test “çekme testi” (tensile test) dir. Çekme deneyleri Uludağ Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Bölümü Laboratuvarları’nda bulunan Shimadzu marka AG-X Plus model çekme cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 Shimadzu marka AG-X PLUS model cihazı

Bu deneyde, hazırlanan 3 katmanlı deri doku iskelesi 5x50 mm boyutlarında kesilerek hazırlanmıştır. Numuneler üretim yönüne paralel olacak şekilde yüzeylerden kesilmiş ve testler nanoliflerden oluşan yüzeyler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Deneyler sırasında literatürdeki çalışmalardan faydalanılarak çeneler arası mesafe 20 mm ve çene hızı 20 mm/dk olarak belirlenmiştir (Jeon ve ark. 2008, Vondran ve ark. 2008).

3.2.3. PLGA- PCL Doku İskelelerine Hücre Ekimi

Hücre iskeleleri önce 2cmx2cm'lik plakalar halinde kesilmiş ve her şeridin 3 ayrı bölgesinden kalınlık ölçümü yapılmıştır. Daha sonra hücre iskeleleri alüminyum folyodan çıkartılmıştır. Her hücre iskelesinin ağırlığı da ölçülerek not edilmiştir.

3.2.3.1. Sterilizasyon İşlemi

PCL hücre iskeleleri öncelikle 6 well plate içerisinde %70'lik EtOH Etanol (Merck KGaA) ile muamale edildikten sonra üç kez Phosphate-buffered saline (PBS Gibco, Thermo Fisher Scientific) ile yıkanmıştır. Ardından hücre iskelelerinin her iki yüzü 30'ar dakika ultraviyole (UV) ışığa maruz bırakılarak inkübe edilmişlerdir. Hücre iskeleleri bir gece boyunca kültür ortamında bekletilmiştir.

PLGA hücre iskeleleri ise %70'lik EtOH Etanol (Merck KGaA) içerisinde bekletildiğinde yüzey üzerinde bozunmalar meydana geldiğinden sterilizasyon işlemi, her iki yüzü 30'ar dakika ultraviyole ışığa (UV) maruz bırakılarak gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon işlemi sonrası hazır hale getirilen hücre iskeleleri, hücre tutulumunu arttırmak amacıyla besiyeri içerisinde bir gece boyunca 37 °C'de, %5 CO₂ inkübatör içerisinde bekletilmiştir.

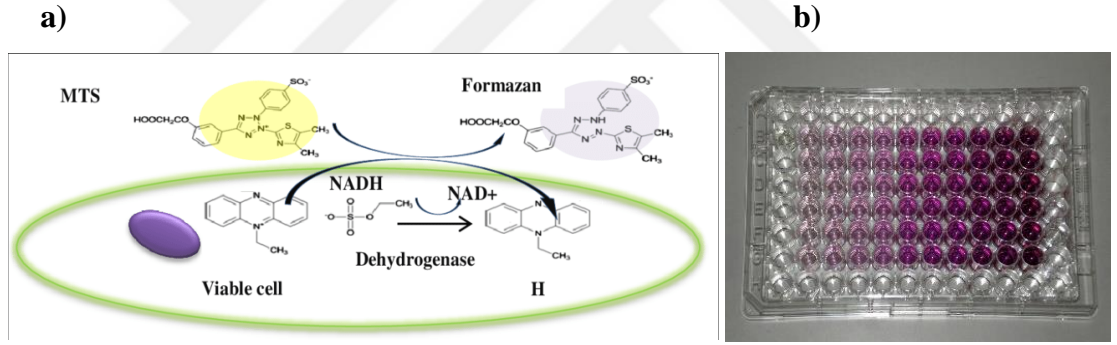
3.2.3.2. Hücre Ekim İşlemi

Normal Yetişkin İnsan Primer Dermal Fibroblast (PCS-201-012™) hücre hattı "American Type Culture Collection" (ATCC, Rockville, MD, USA) firmasından temin edilmiştir. Akabinde 6'lık well platelerde yer alan hücre iskelelerine ATCC marka Fibroblast Basal Mediumile (PCS-201-012™) hücreler kültüre edilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler içerisinde 500.000 hücre sayılarak, hücre iskeleleri üzerine ekim yapılmıştır. Hücre iskeleleri üzerine ekilen hücreler 6 well plate içerisinde; kültürlenmek üzere; 37 °C'de 2 saat %5 CO₂ ile nemlendirilmiş Panasonic marka inkübatörde inkübe edilmiştir.

Hücre tabakasına pipet değdirilmeden flask alt köşesine PBS eklenir, yüzey yıkanır ve PBS yavaşça çekilir. Ardından medium eklenir ve son olarak da 1 µL besiyeri (%0,25 Trypsin 1x, Gibco) eklenerek UV kabine 2-3 dakika ölü hücrelerin yüzeye kalkması için beklenir. UV kabininden alınan plate'ler içerisine ATCC marka Fibroblast Basal Medium'dan 2 µL eklenerek, santrifüj işlemini gerçekleştirmek üzere santrifüj tüplerine aktarılır. Santrifüj işlemi NÜVE marka NF 800 model cihazda 2000 rpm ile 5 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işleminin amacı yaşayan hücrelerin dibe çökmesini sağlamaktır. Üstte kalan kısım dökülerek dipte kalan kısım üzerine 1 µL besiyeri eklenip, birkaç kez pipetlenerek homojen bir dağılım sağlanmıştır. Daha sonra hücrelerin canlılığını belirlemek adına 10 µL hücre kültüründen alınarak Thoma Lamı'na yerleştirilir. Thoma Lamı'nda 0,1 mm³ hacimde sayım yapılmaktadır. Thoma Lamı optik mikroskoba yerleştirilerek 40X büyütmede hücreler sayılmıştır. 100 µL'de canlı hücre sayısını bulabilmek için 10 ile çarpılmış ve işlem gerekliliği üzerine 10⁴ ile çarpılmıştır. Başlangıçta flask içerisinde kalan besiyeri çekilerek, flask içerisine çoğaltılan hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir. MTS Poliferasyon işlemi 3 tekrardan oluştuğundan 9 yüzeye hücre ekimi gerçekleşmiştir. Son olarak, 37 °C'de 2 saat %5 CO₂ ile nemlendirilmiş Panasonic marka UV kabininde inkübe edildikten sonra 400 mL besiyeri eklenmiştir.

3.2.3.3. MTS Proliferasyon Ölçümü

Üretilen hücre iskelelerinin hücre çoğalmasını engelleyecek toksisitede olmadığını göstermek ve hücre canlılığını belirlemek amacıyla 3. , 7. ve 14. günlerde, canlı hücrelerin işlem sırasında formazan kristalleri oluşturması, ışığa yoluyla 490 nm’de spektrofotometrik ölçüm yaparak sonuç elde edilen MTS (Abcam, ab197010) deneyinden faydalanılmıştır. Sterilize edilen 1x1 cm’lik PCL ve PLGA iskeleleri üzerine ve kontrol grubu oluşturan 24 well plate üzerine (polystyrene yüzey) 100.000 hücre ekilerek, 500 µL besiyeri (ATCC marka Fibroblast Basal Medium ile (PCS-201-012™)) içerisinde 37 °C’de, %5 CO₂ içeren inkübatörde hücreler çoğaltılmıştır. 24’lük well plate’deki besiyerleri üremeyi sağlamak için üç günde bir yenilenmiştir.



Şekil 3.8 a. MTS Proliferasyonu- formazan kristallerine dönüşüm b. Hücre canlılığına göre renk değişimi (<https://slideplayer.biz.tr/slide/11471433/>, 2019)

Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra sırasıyla 3. , 7. ve 14. Günlerde kuyucuklara 100 µL MTS poliferasyon kiti içerisinde yer alan MTS proliferasyon assay solüsyonu eklenerek 37 °C’de 2 saat %5 CO₂ ile nemlendirilmiş Panasonic marka UV kabininde 3 saat inkübe edilmiştir. Hücreler 24’lük plate’lerden alınarak 96’lık platelere eşit miktarda her bir kuyucukta 200 µL olacak şekilde ekilmiştir. Bir kısma da kontrol amacıyla sadece solüsyon eklenmiştir. Son olarak MTS poliferasyon kiti solüsyonunun ışığa karşı duyarlı olması nedeniyle platelerin üzeri alüminyum folyo ile kaplanarak Berthold Technologies marka Tristar² S LB 942 model çoklu okuyucu içerisinde konularak canlı hücre sayısı hesaplaması yapılmıştır.



Şekil 3.9 Berthold Technologies marka Tristar² S LB 942 marka çoklu okuyucu (<https://www.berthold-bio.com/microplate-readers/details/product/tristar2-lb-942/action/show.html>, 2019)

3.2.3.4. RNA İzolasyonu

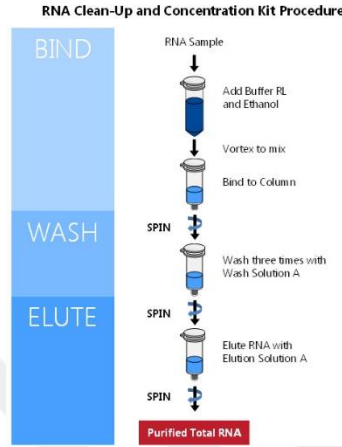
PCL ve PLGA yüzeylerine ekilen hücreler ve kontrol olarak polystyrene yüzey üzerine ekilen hücrelerden RNA eldesi için Exiqon markasının miRCURY RNA Cell Isolation Cell&Plant kitine ait protokol uygulanmıştır. 1. Basamak olarak yüzeyin içerisinde bulunan bölgedeki besiyeri çekilmiştir. Üzerine Lysis Solüsyonundan 350 µL yüzey üzerine bırakılmıştır. Daha sonra VELP Scientifica marka vortex cihazda 15 saniye hücrelerin parçalanması için işlemi yapılmıştır. Solüsyon içerisine %100 etanol 250 µL eklenerek, 10 saniye vortex cihazında tekrar karıştırma işlemi görmüştür.

2. basamakta, protokol gereği solüsyon içerisinden 600 µL alınıp filtreli column tüpüne aktarılmıştır. Beckman Coulter marka 20R model santrifüj cihazında 14000xg hızda 1 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Daha sonra altta kalan solüsyon boşaltılarak kit içerisinde bulunan wash solüsyondan 400 µL eklenmiş ve tekrar santrifüj cihazında 14000xg hızda 1 dakika işlem görmüştür. Yıkama işlemi toplamda 3 kez olacak şekilde tekrar edilmiştir. Solüsyon boşaltıldıktan sonra tüpler iki kez kalan solüsyonların altta toplanması için çevrilmiştir. Ardından 40 µL Elution Buffer sıvısı eklenmiş, 2 dakika 200 xg hızda ve 1 dakika 14000xg hızda santrifüj cihazında işlem görmüştür.

3. basamakta ise RNA örneklerinde DU-730 UV/Vis Spektrofotometre (Beckman Coulter)de 1 mL solüsyon çekilip optik yüzey üzerine damlatılmış, RNA miktarı ve

kalitesi A260/280 ve A260/230 değerleri spektrofotometre ile ölçölerek analiz edilmiştir. Tüm işlemler 3. , 7. ve 14. Günlerde tekrar edilerek ölçüm yapılmıştır.

a)



b)



Şekil 3.10 RNA izolasyon aşamaları, b. DU-730 UV/Vis Spektrofotometre (Beckman Coulter) (<http://www.exiqon.com/ls/documents/scientific/rna-isolation-kit-manual-cell-and-plant.pdf>, 2019; <https://www.opticsplanet.com/beckman-coulter-du-700-series-uv-vis-spectrophotometers-beckman-coulter-a23616.html>, 2019)

3.2.3.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Üretilen doku iskeleleri hücre ekimi öncesinde ve sonrasında taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak morfolojik olarak karakterize edildi. SEM analizi için gerçekleştirilen işlemler aşağıda belirtilmiştir.

1. Besiyeri çekilerek içerisine %2,5'lik 1000 µL gluteraldehit çözeltisi (Sigma-Aldrich) eklenmiştir.
2. +4 °C'de orbital shaker'da 40 rpm hızda 2 saat boyunca inkübe edilmiştir.
3. Well plate içerisinden gluteraldehit çekilerek, ortamdaki gluteraldehiti tamamen uzaklaştırma amacıyla fosfat tampon eklenmiştir. Bu işlem 3 kere olacak şekilde 10' ar dakika (toplamda 30 dakika) yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
4. Üçüncü tekrar sonrasında solüsyon çekilerek %1'lik osmium tetraxide (OsO4-Sigma-Aldrich)'den 1000 µL plate içerisine ilave edilmiştir. +4 °C'de 2 saat boyunca orbital shaker'da 40 rpm hızla inkübe edilmiştir.

5. 2 saat sonunda üretilen iskelelere ekilen hücrelerle birlikte alkolle dehidrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem 5 seri şeklindedir.
 - 5.1. 6'lık well plate'ler içerisine % 30'luk alkol eklenmiş, 15 dakika orbital shaker' da çalkalanmıştır.
 - 5.2. %30'luk alkol çekilip, yerine %50'lik alkol eklenmiş, 15 dakika orbital shaker' da çalkalanmıştır.
 - 5.3. %50' lik alkol çekilip, yerine %70'lik alkol eklenmiş, 15 dakika orbital shaker' da çalkalanmıştır.
 - 5.4. %70'lik alkol çekilip, yerine %90'lık alkol eklenmiş, 15 dakika orbital shaker' da çalkalanmıştır.
 - 5.5. %90'lık alkol çekilip, yerine %100'lük alkol eklenmiş, 15 dakika orbital shaker' da çalkalanmıştır.
6. Alkol serileri tamamlandıktan sonra plate içerisindeki alkol çekilerek, kurutma amacıyla doku iskeleleri amil asetatla (Sigma-Aldrich) işlem görmüştür.
 - 6.1. 1:3 oranında;

800 µL amil asetat, 2400 µL %100 alkol karışımından 1000 µL iskeleler üzerine damlatılıp 10 dakika bekletilmiştir.
 - 6.2. 1:1 oranında;

1000 µL amil asetat ile 1000 µL %100 alkol karışımı iskeleler üzerine damlatılıp 10 dakika bekletilmiştir.
 - 6.3. 3:1 oranında;

2400 µL amil asetat ile 800 µL %100 alkol karışımı iskeleler üzerine damlatılıp 10 dakika beklenmiştir.
7. Son olarak doku iskeleleri 1000 µL amil asetat ile 10 dakika işlem görmüştür.
8. Amil asetat serileri sonrasında SEM analizine gönderilmeden önce doku iskeleleri cem kap içerisinde +4 °C'de bekletilmiştir.
9. Doku iskeleleri altın-paladyum ile kaplanarak ön işleme tabi tutulmuş, CARL ZEISS marka EVO 40 model taramalı elektron mikroskopunda gözlemlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, öncelikle deri yaralanmalarında deri ikamesi yerine kullanılması hedeflenerek elektroçekim yöntemiyle üretilen doku çatılarının, derinin katmanlı yapısı nedeniyle farklı proses parametreleriyle tasarlanan PCL3/PLGA3.3/PCL1 (alt katmandan üst katmana doğru) bazlı üretimine ve karakterizasyon çalışmalarına dair sonuçların değerlendirilmesine ve bu yüzeyler üzerine hücre ekim çalışmalarının sonuçları üzerinde tartışmalara yer verilmiştir.

4.1. Nanoliflerin Yüzey Karakterizasyonu Sonuçları

PCL ve PLGA nanolifli yüzeyler elektroçekim yöntemiyle üretilmiştir. Elektroçekim yöntemiyle üretilen nanolifli yüzeylerin doku mühendisliğinde kullanımının en büyük avantajları; geniş yüzey alanı/hacim oranı, yüksek gözeneklilik özelliği taşımaları ve pek çok teröpatik ajanla desteklenerek biyolojik fonksiyonlarının artırılabilir olmasıdır.

Derinin 3 katmanlı yapısı incelenerek yüzeylerin belirlenen inceliklerde ve liflerin belirlenen dağılım yönlerinde üretilebilmesi için uygun konsantrasyon ve üretim parametreleri belirlenmiştir. Üretilen nanoliflerin doku çatılarının morfolojileri ve çapları taramalı elektron mikroskobu ile belirlenmiş, optimum işlem değişkenleri tartışılmıştır. Doku çatılarının fiziksel özelliklerinin hücrelerin yüzeye tutunmasına ve çoğalmasına büyük ölçüde etkilediği bilinmektedir.

4.1.1. PLGA Nanolifleri Yüzey Karakterizasyonu

Literatür araştırmalarından yola çıkılarak PLGA polimeri için %15 ve %20 konsantrasyonlarında polimer çözeltileri hazırlanmıştır. PLGA nanolifli yüzey üretim parametrelerinde besleme oranı, sarım hızı, mesafe ve voltaj değerleri üzerinde değişiklik yapılarak sonuçlar irdelenmiştir. Bu doğrultuda parametre değişikliklerinin yüzeylerdeki liflerin inceliğine ve boncuk oluşumuna etkisi incelenebilmektedir. Özellikle konsantrasyonun ve besleme hızının boncuklu yapılarla doğrudan ilişkili olduğu

söylenmektedir. **Yüzey karakterizasyonu sırasında dikkat edilmesi gereken en önemli sorunlardan biri boncuk oluşumudur.**

Başlangıçta PLGA1 numune denemesi; iğne ucu-toplayıcı arasındaki mesafe 15 cm olarak belirlenmiştir. İyi bir PLGA çözücüsü olan DMF hızlı uçuculuk özelliğinden dolayı tek başına kullanılmak yerine, 1:1 oranında DMF/THF kullanılarak; 1,5 gram PLGA, 4,25 DMF, 4,25 gram THF çözeltisinden %15 konsantrasyonda $0,75 \text{ ml.sa}^{-1}$ ve 16 kV çalışma şartları belirlenmiştir. Ancak yüzeyin SEM görüntüleri incelendiğinde, yüzeyde düzenli ve boncuksuz bir yüzey elde edilememiştir. Bu nedenle PLGA2 üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu denemede polimer konsantrasyonu sabit tutulup besleme oranı düşürülmüş ($0,5 \text{ ml.sa}^{-1}$), iğne ucu-toplayıcı arasındaki mesafe 18 cm e çıkarılırken, voltaj değeri ise 18 kV' a çıkarılmış ve döner silindir hızı da 250 rpm e çıkarılmıştır. Üretilen PLGA2 nanoyüzeylerin SEM görüntüleri incelenmiş ve yüzeyde boncuklanmaların azaldığı, lif çaplarında ise homojen dağılıma yönlendiği görülmüştür. Daha boncuksuz ve homojen bir yapı elde etmek üzere PLGA3 denemesi gerçekleştirilmiştir. PLGA3 üretiminde ise üretime etkileyen parametrelerin tümünde farklı kompozisyonlar denenerek boncuklu yapının ortadan kaldırılması hedeflenmiştir.

Yapılan ön araştırmalarda boncuksuz yapı eldesi için öncelikle konsantrasyon değerinin artırılması gerektiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle literatür ışığında PLGA3 için konsantrasyon oranı kütlece %20 olarak belirlenmiştir. Besleme oranları $0,3-0,5 \text{ ml.sa}^{-1}$ aralığında değişmesi, uygulanan en etkin gerilimin ise 20-25 kV arasında değişmesi gerektiği belirlenmiştir. Yine literatürde iğne ucu-toplayıcı arasındaki mesafenin yakın ya da uzak olması boncuklu yapıya neden olduğu vurgulanmıştır. Bu doğrultuda denemeler için 15-20 cm aralığı belirlenmiştir. Dört farklı parametre kompozisyonu denemeleri gerçekleştirildikten sonra üçüncü deneme parametrelerinin en uygun yüzey eldesini sağladığı görülmüş, üretim parametreleri bu yönde optimize edilmiştir. Üretilen numunelerin parametrelerine ilişkin detaylı bilgi Çizelge 4.1' de verilmektedir.

Çizelge 4.1 PLGA nanolifli yüzeylerin üretim parametreleri

Numune kodu	Konsantrasyon (%)	Besleme oranı (ml/h)	Voltaj (kV)	Mesafe (cm)	Silindir hızı (rpm)
PLGA1	15	0,75	16	15	100
PLGA2	15	0,5	18	18	250
PLGA3.1	20	0,5	20	20	500
PLGA3.2	20	0,3	20	20	500
PLGA3.3	20	0,3	25	18	500
PLGA3.4	20	0,3	25	15	1000

4.1.2. PCL Nanolifleri Yüzey Karakterizasyonu

PCL nanolif üretimi öncesinde uygun çözücü seçimi gerçekleştirilmiştir. Çözücünün yüzey morfolojisine ve temas açısı değerlerine etkilediği bilinmektedir. Literatür çalışmaları incelendiğinde PCL için en çok kullanılan çözücünün kloroform olduğu görülmüştür. Ancak kloroformun hem vücut içerisinde kullanımının zararlı olacağı hem de kloroformun düzgün lif oluşumuna olanak vermemesi nedeniyle dimetilformamid (DMF) ve diklormetan (DCM) birlikte kullanılmıştır. DMF, polimer çözeltisinin viskozitesini düşürmekte, elektriksel iletkenliğine etki etmektedir. Aynı zamanda dielektrik sabitini arttırarak lif çapını küçültmektedir. Bu nedenle diğer bir çözücü olan DCM ve DMF birlikte kullanılmışlardır.

Daha sonra PCL nanolifli yüzeylerin parametreleri üzerinde çalışılmıştır. Lif inceliğini etkileyen en önemli parametrelerin voltaj ve mesafe ayarıyla alakalı olduğu görülmüştür. Üretim denemeleri aşamasında yaşanan polimer çözeltisinin düze ucunda donması, tıkanması ve sürekli bir çekim sağlanamaması sorunlarının viskozitenin yüksek olmasından kaynaklandığı bilinmektedir. Ancak düşük viskozite ile çalışıldığında polimer çözeltisi düze ucundan toplayıcıya ulaşana kadar buharlaşma riski oluşmakta ve yüzey üzerinde damlacıklar oluşmasına yol açacağı bilinmektedir.

Öncelikle 60:40 (v/v) bileşimde hazırlanan DMF/DCM çözücü içerisinde %10 (w/v) konsantrasyonda PCL çözeltisi 40 °C'de yaklaşık 2 saat manyetik karıştırıcıda hazırlanmıştır. Elde edilen polimer çözeltisi, 3 farklı parametre kompozisyonu ile üretim

denemelerine tabi tutulmuştur. Yapılan ön araştırmalar ve önceki denemeler ideal çekim alanının 10 cm'nin üzerinde olduğunu göstermiştir. Buna istinaden iğne ucu-toplayıcı arasındaki mesafe 14 cm olarak belirlenmiştir. Silindir hızları 100-500-1000 rpm olarak denenmiştir. Çekim aşamasında donma ve düze ucu tıkanması sebebiyle besleme hızının artırılması gerektiği öngörülmüştür. Bu nedenle besleme hızı 1 ml.sa⁻¹' den 5 ml.sa⁻¹'e çıkarılmıştır. PCL çözeltisi için kritik voltaj değeri 18-20 kV aralığı olarak belirlenmiştir. Üretilen numunelerin parametrelerine ilişkin detaylı bilgi Çizelge 4.2' de verilmektedir.

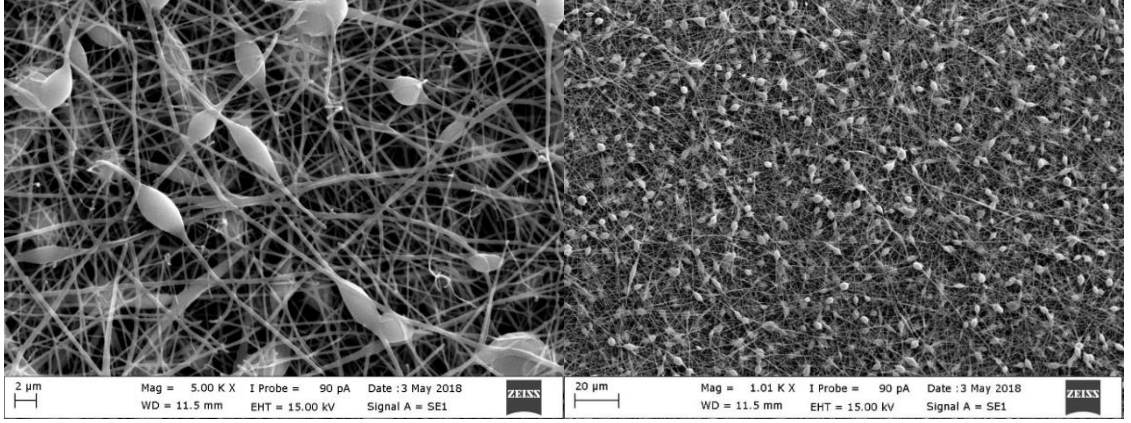
Çizelge 4.2 PCL nanolifli yüzeylerin üretim parametreleri

Numune kodu	Konsantrasyon (%)	Besleme oranı (ml/h)	Voltaj (kV)	Mesafe (cm)	Silindir hızı (rpm)
PCL1	10	1	20	14	100
PCL2	10	5	18	14	500
PCL3	10	1	15	14	1000

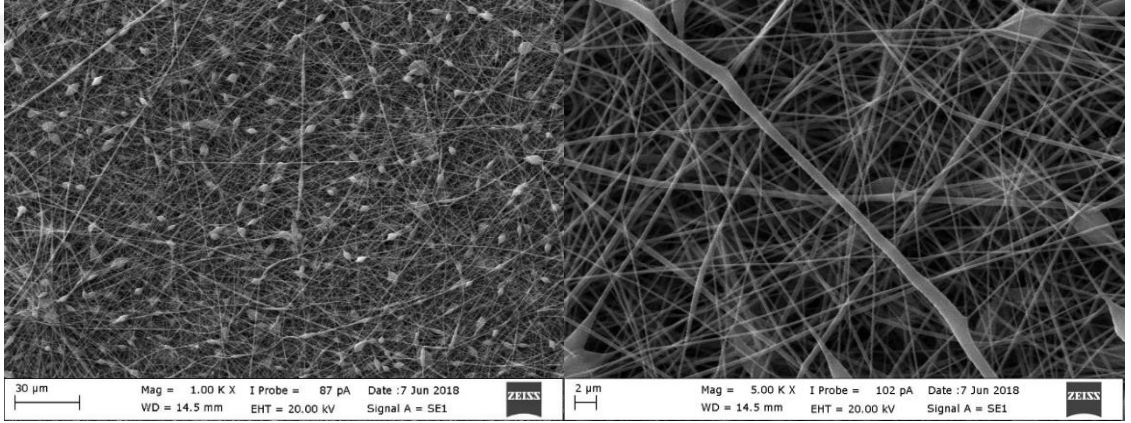
4.2. SEM Analizi Sonuçları

PLGA ve PCL polimerlerinden üretilen nanolifli doku çatılarının morfolojik değerlendirilmesi SEM görüntüleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Ayrıca SEM görüntüsü üzerinden ImageJ yazılımı desteğiyle nanoliflerin çapı her bir numune için 10 ölçüm yapılarak ortalaması alınmış ve çap dağılımları hesaplanmıştır.

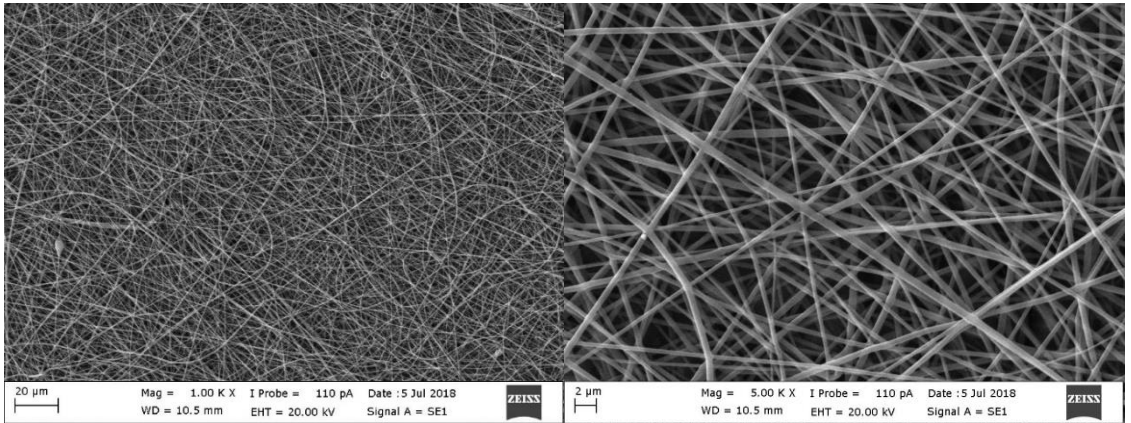
Nanolif çekim sırasında yüzeylerin morfolojisine; çözücü özellikleri, proses parametreleri ve ortam parametreleri gibi birçok parametrenin etkili olduğu bilinmektedir. PLGA nanolifli doku çatıları farklı parametrelere bağlı olarak; farklı çaplar, yüzey kalınlıkları ve gözenekliliklere sahip yapılarda rastgele yönlendirilmiş lifli yapılar oluşturulmuştur. Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6' da yer alan PLGA1-PLGA3.4. kodlu yüzeylerin üretiminde sarım hızı, besleme oranı, voltaj, düze ucu-toplayıcı plaka arası mesafe ve konsantrasyon değişkenleri kullanılmıştır.



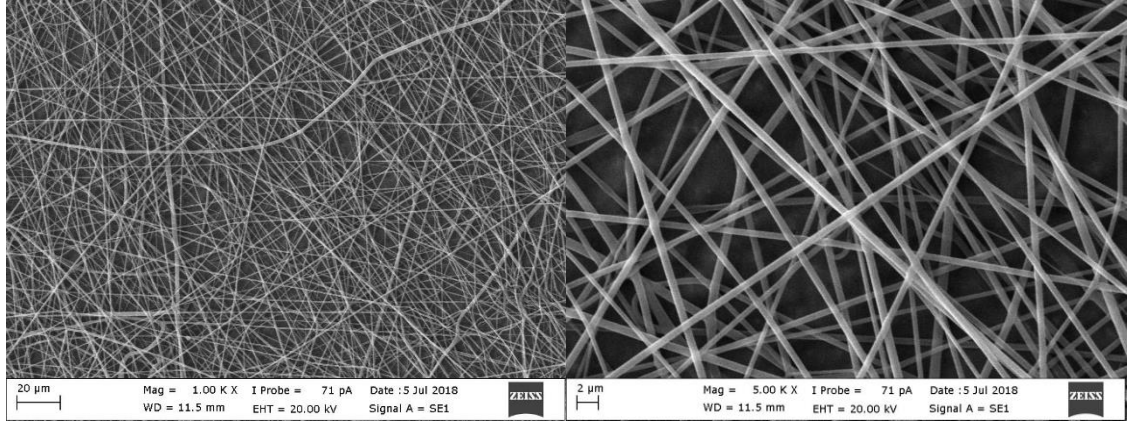
Şekil 4.1 PLGA1 kodlu yüzeylerin SEM görüntüleri



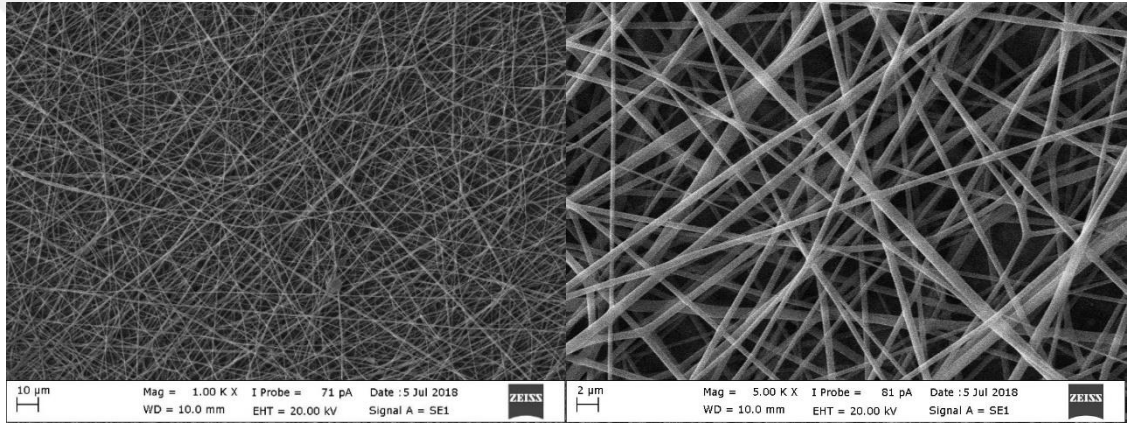
Şekil 4.2 PLGA2 kodlu yüzeylerin SEM görüntüleri



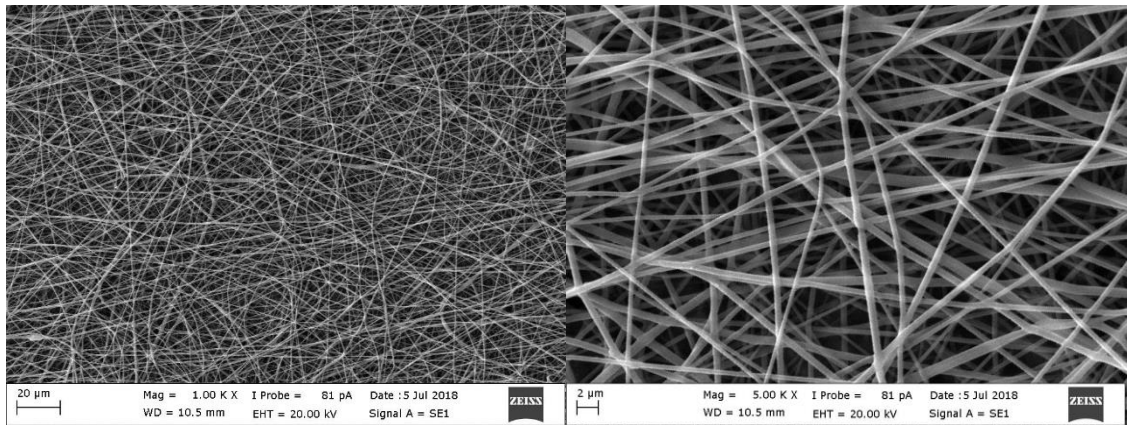
Şekil 4.3 PLGA3.3 kodlu yüzeylerin SEM görüntüleri



Şekil 4.4 PLGA3.1. kodlu yüzeylerin SEM görüntüleri



Şekil 4.5 PLGA3.2. kodlu yüzeylerin SEM görüntüleri



Şekil 4.6 PLGA3.4. kodlu yüzeylerin SEM görüntüleri

PLGA1 kodlu yüzey incelendiğinde, yüzeyde çok fazla boncuklanma meydana geldiği görülmüştür. Bu nedenle PLGA2 kodlu üretimde sabit konsantrasyonda; besleme oranı

azaltılmış, voltaj, düze ucu-toplayıcı plaka arası mesafe ve silindir hızı arttırılmasıyla boncuklanmanın azaldığı ve lif çapında azalma olduğu görülmüştür.

Bu nedenle 4 farklı proses parametresi kompozisyonunda PLGA3 nanolifli yüzey denemeleri gerçekleştirilmiştir.

1. denemede polimer konsantrasyonu arttırılarak lif çapının artması ve boncuk oluşumunun azalması beklenmiştir. Bununla birlikte voltaj ve düze ucu-toplayıcı plaka arası mesafe değerlerinin birbirine bağımlı değişken olması nedeniyle ikisi de arttırılmış ve sarım hızının da arttırılması ile boncuk oluşumunun azalması beklenmiştir.
2. denemede; polimer konsantrasyonu arttırılmış, besleme oranı ise düşürülmüştür. Bununla birlikte voltaj ve düze ucu-toplayıcı plaka arası mesafe değerlerinin birbirine bağımlı değişken olması nedeniyle ikisi de arttırılmıştır.
3. denemede; polimer konsantrasyonu arttırılmış, besleme oranı ise düşürülmüştür. Bununla birlikte voltaj arttırılırken, düze ucu-toplayıcı plaka arası mesafe düşürülmüştür. Sarım hızı ise arttırılmıştır.
4. denemede; polimer konsantrasyonu arttırılmış, besleme oranı ise düşürülmüştür. Bununla birlikte voltaj ve düze ucu-toplayıcı plaka arası mesafe değerlerinin birbirine bağımlı değişken olması nedeniyle ikisi de arttırılmıştır. Sarım hızı ise diğer denemelere kıyasla daha da arttırılmıştır.

Tüm bunlardan yola çıkarak boncuk oluşumunun;

- *Düşük konsantrasyonlarda arttığı*

Düşük konsantrasyonların çözelti viskozitesinde azalmaya sebep olduğu, viskozite azalması ile de yüzey geriliminin baskın kuvvet olarak jet oluşumunu engellediği görülmüştür.

- *Düşük besleme oranının azalttığı*

Düşük besleme oranında iğne ucundan çözelti çıkışının daha düzenli olduğunu görülmüştür.

- *Düze ucu ile toplayıcı arasındaki mesafenin çok uzak ya da çok yakın olmasının arttırdığı*

İğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafenin kısa olduğu durumlarda yüksek gerilime maruz kalan polimer jetinde yönlendmenin oluşmadığı ve boncuksu yapıların olduğu görülmüştür.

- *Çok yüksek voltajda ya da çok düşük voltajda boncuk oluşumunun arttırdığı*

İğne ucunda daha küçük jet oluşumu olacağından, jetin sürekliliği bozulmuş ve kopmalar meydana gelmiştir.

Düşük voltaj değerlerinde ise yeterli miktarda çözücü buharlaşmadığından boncuklu yapılar görülmüştür.

Denemeler sonrasında yüzeylerin çap ve kalınlık özelliklerine bakılmıştır. Çizelge 4.3 incelendiğinde minimum lif çapına ve homojen çap dağılımına sahip olan PLGA3.3 kodlu numune ve Çizelge 4.4 incelendiğinde en düşük kalınlığa sahip PLGA3.3 kodlu numune olduğu görülmüştür. Bu sebeple doku çatısında destek görevini görecek ara katman olan “dermis tabakası” yerine “PLGA3.3. kodlu numune” seçilmiştir.

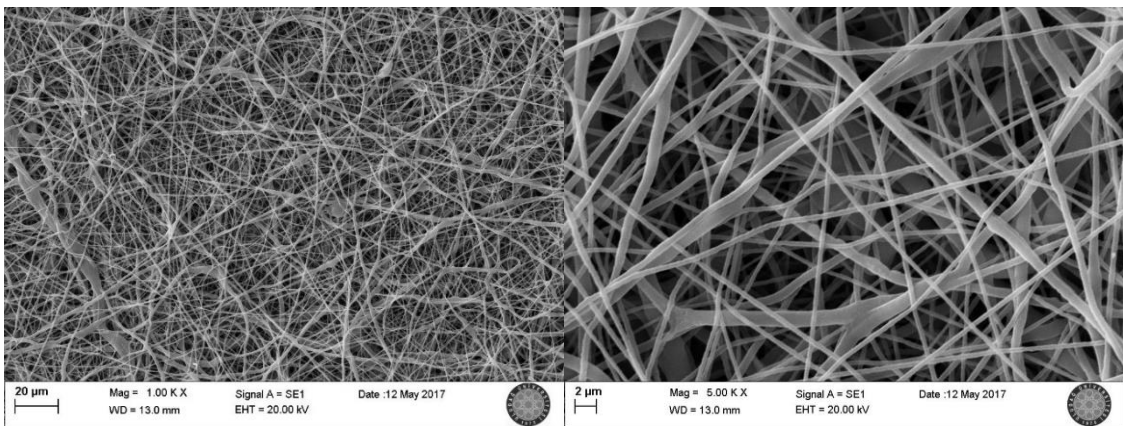
Çizelge 4.3 Farklı parametrelerle üretim denemesi gerçekleştirilen PLGA nanoliflerin çapları

Numune Kodu	Min. Çap (µm)	Maks. Çap (µm)	Ort. Çap (µm)	%CV
PLGA1	0,21	0,43	0,31	21,84
PLGA2	0,17	0,45	0,30	29,17
PLGA3.1	0,28	0,92	0,57	45,33
PLGA3.2	0,41	0,84	0,63	22,51
PLGA3.3	0,37	1,04	0,67	33,33
PLGA3.4	0,44	1,15	0,77	32,79

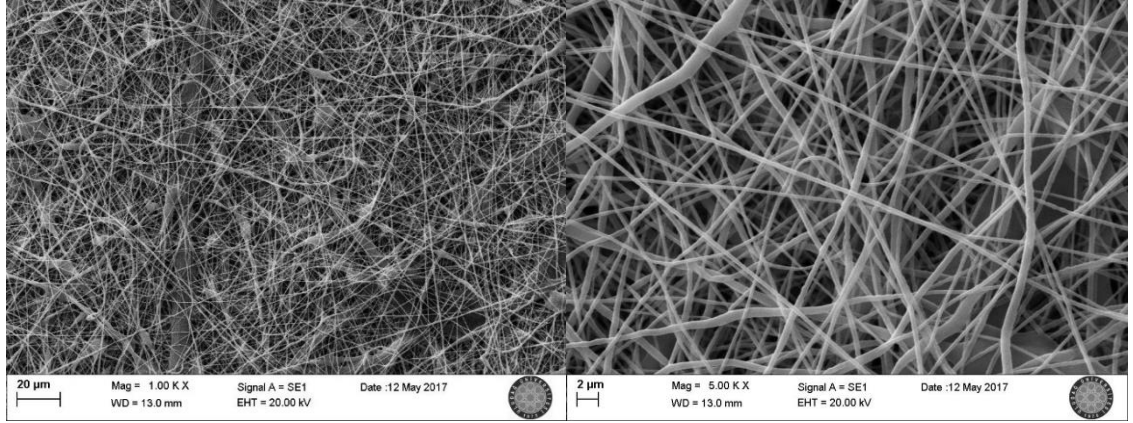
Çizelge 4.4 Farklı parametrelerle üretim denemesi gerçekleştirilen PLGA nanoliflerin kalınlıkları

Numune Kodu	Kalınlık (mm)
PLGA1	0,138
PLGA2	0,016
PLGA3.1	0,021
PLGA3.2	0,022
PLGA3.3	0,017
PLGA3.4	0,022

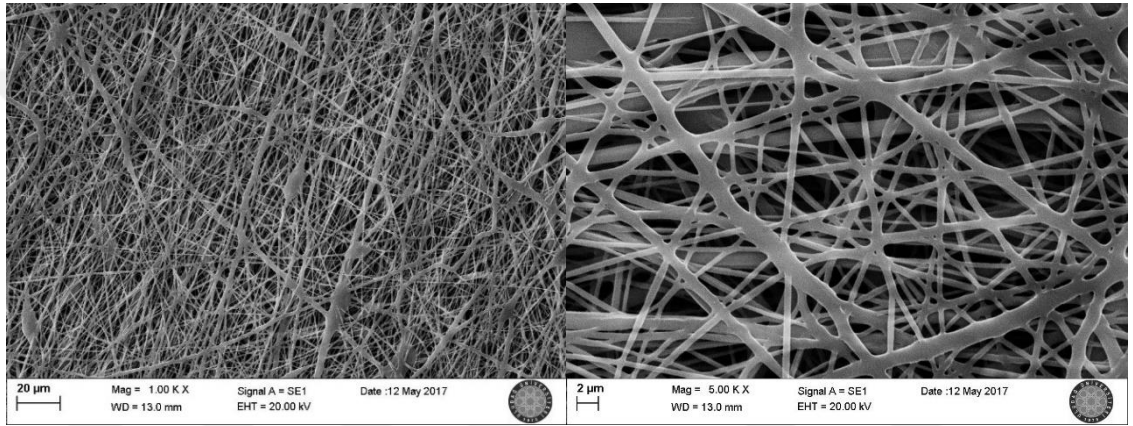
PCL nanolifli doku çatılarının SEM görüntüleri Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da verilmiştir. Burada polimer konsantrasyon oranı ve mesafe sabit tutulup besleme oranı, voltaj ve sarım hızlarında değişiklik yapılmıştır. Taylor konisi oluşumunun ilk olarak gözlemlendiği 20 kV’lık gerilim ile başlanmıştır. Düze ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe 14 cm olarak ayarlanmış ve 20 kV’dan başlamak üzere DCM/DMF karışımı çözücüde hazırlanan PCL polimerik çözeltisine sırasıyla 18 kV ve 15 kV değerlerinde gerilim uygulanmıştır. Sarım hızları ise sırasıyla 100-500-1000 rpm olarak denenmiş ve bu aşamada yüksek hızda çekim sağlamanın zorluğu ile karşılaşmıştır. İğne ucundan PCL çözeltisi damlacığının Taylor konisi oluşturabilmesi için besleme hızının artırılması ve döner plakanın da hareketli olması gerektiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle besleme hızı 1 ml.sa⁻¹’den 5 ml.sa⁻¹’e çıkarılmıştır.



Şekil 4.7 PCL1 kodlu yüzeyin SEM görüntüleri



Şekil 4.8 PCL2 kodlu yüzeyin SEM görüntüleri



Şekil 4.9 PCL3 kodlu yüzeyin SEM görüntüleri

Çizelge 4.5’de PCL nanolifli doku çatısı için ortalama lif çapları ve yüzey kalınlıkları verilmiştir.

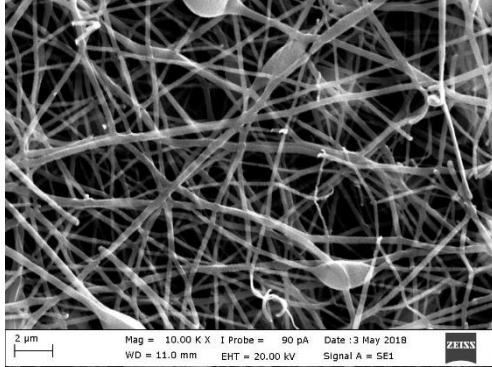
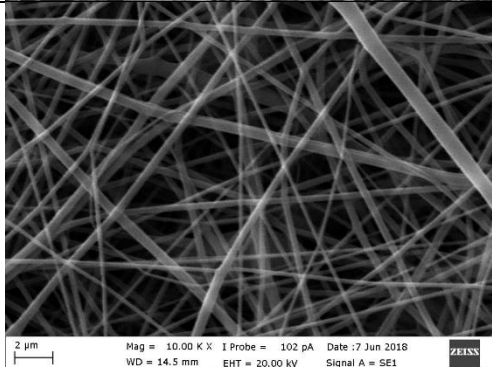
Çizelge 4.5 Farklı parametrelerle üretim denemesi gerçekleştirilen PCL çapları ve yüzey kalınlıkları

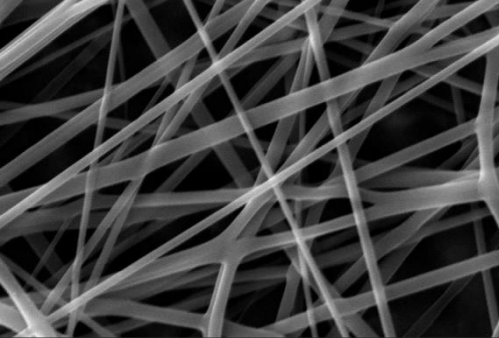
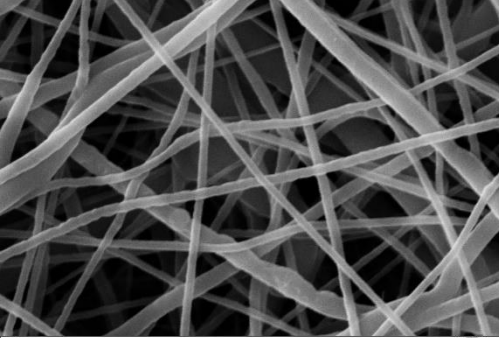
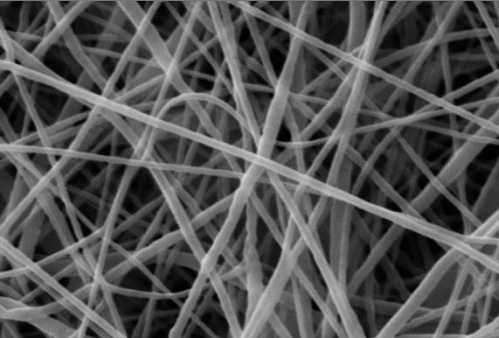
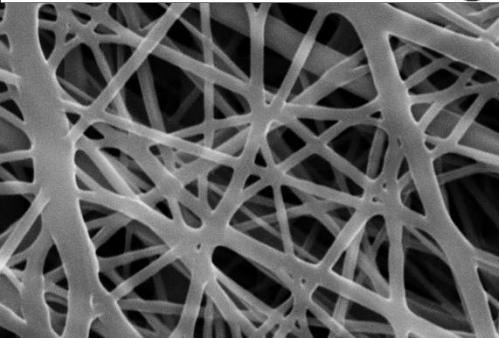
Numune Kodu	Ort. Lif çapı (µm)	Yüzey Kalınlığı (µm)
PCL1	1,036	44,33
PCL2	0,738	37,47
PCL3	0,774	38,29

4.3. Nanolifli Doku Çatılarının Yüzey Gözenekliliği Ölçümü

Elektroçekim yöntemiyle geliştirilebilen nanolifli yüzeylerin doku çatısında kullanılabilirliklerinin en önemli avantajları; geniş yüzey alanı/hacim oranına sahip olmaları, yüksek gözeneklilik özelliği taşımaları ve uygulama alanına göre fonksiyonlarının artırılabilir olmasıdır. Bu çalışmada, farklı proses parametreleriyle üretilen doku çatılarının yüzey gözenekliliği incelenmiştir. Seçilen yüzeylerden en üst katman için belirlenen PCL1' in %91 oranında yüzey gözenekliliği, ara katman olan PLGA3.3' ün %83 oranında gözenekliliği ve en alt katman olan PCL3'ün %90 oranında yüzey gözenekliliği göstermesi ile tüm bu yüzeylerin gözenek boyutlarının sırasıyla 9.42-3.11-6.08 olması, hücreler için tutunma yüzeyini arttırdığından hücre çoğalmasını olumlu yönde etkileyecektir.

Çizelge 4.6 PLGA ve PCL nanolifli yüzeylerin gözenekliliği ve gözenek boyutları

Numune kodu	SEM görüntüsü	Porozite(%)	Gözenek Boyutu (µm)
PLGA1		87,41	1,94
PLGA2		84,86	1,56

<p>PLGA3.3</p>	 <p>2 μm Mag = 10.00 K X I Probe = 81 pA Date :5 Jul 2018 WD = 11.5 mm EHT = 20.00 kV Signal A = SE1 ZEISS</p>	<p>83,19</p>	<p>3,11</p>
<p>PCL1</p>	 <p>2 μm Mag = 10.00 K X Signal A = SE1 Date :12 May 2017 WD = 13.0 mm EHT = 20.00 kV</p>	<p>91,37</p>	<p>9,42</p>
<p>PCL2</p>	 <p>2 μm Mag = 10.00 K X Signal A = SE1 Date :12 May 2017 WD = 13.0 mm EHT = 20.00 kV</p>	<p>90,72</p>	<p>6,24</p>
<p>PCL3</p>	 <p>2 μm Mag = 10.00 K X Signal A = SE1 Date :12 May 2017 WD = 13.0 mm EHT = 20.00 kV</p>	<p>90,01</p>	<p>6,08</p>

4.4. Temas Açısı Ölçümleri

Temas açısı değeri; adhezyon, ıslanabilirlik ve absorpsiyon gibi lif yüzey özelliklerinin nicel ölçümüdür (Duzyer ve ark. 2011). Temas açısı ölçümlerinde değeri 90^0 'nin altında olan yüzeyler hidrofil, 90^0 'nin üzerinde olan yüzeyler ise hidrofob olarak tanımlanırlar. Doku çatısı uygulamalarında, hücrelerin doku iskelesine kolay tutunması adına ıslanabilirlik oldukça önemli bir özelliktir. Çizelge 4.7 incelendiğinde, üretilen tüm yüzeylerin hidrofob özellikte olduğu söylenebilmektedir. PLGA1 numunesinin boncuklu yapısı sebebiyle (yüzey pürüzlülüğü etkisi) en yüksek hidrofobluğa sahip olduğu düşünülmektedir.

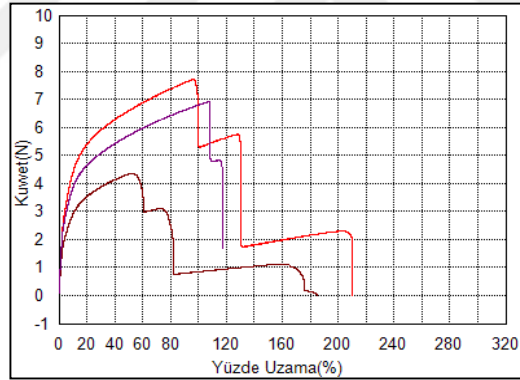
Çizelge 4.7 PLGA ve PCL nanolifli yüzeylerin temas açısı ölçümleri

Numune kodu	Temas Açısı (θ)
PLGA1	134,30
PLGA2	107,93
PLGA3.3	99,8
PCL1	110,43
PCL2	119,85
PCL3	126,36

4.5. Nanoliflerin Mekanik Karakterizasyonu Sonuçları

Elastikiyet, belli ölçüde sıkıştırma ve basınca dayanıklılık gibi biyomekanik özellikler doku iskelesinin kolay implante edilebilmesi ve uzun dönem uygulamalarda başarı sağlanabilmesi için taşınması gereken kritik özelliklerdir. Elektroçekim yöntemi ile üretilen nanolifli matrisler, gözenekli yapıları ve nanolif mimarilerinden dolayı ideal doku iskeleleri olarak kabul edilmektedir.

Elektroçekim yöntemiyle hazırlanan PCL1-PLGA3.3-PCL3 kodlu numunelerin ağırlık vasıtasıyla 3-katmanlı olarak birleştirilmesi sonrasında mekanik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kopma uzama testleri yapılmıştır. 3'er örnek alınarak gerçekleştirilen yüzeyin kopma uzaması değeri %85 iken, elastise modülü ortamala 41,9 MPa olarak sonuç vermiştir.

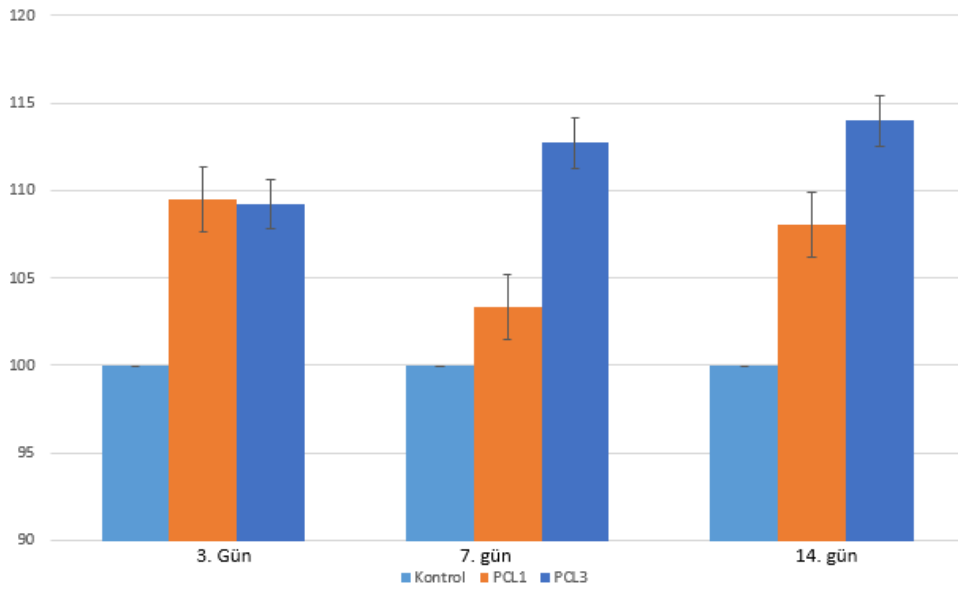


Şekil 4.10 3 katmanlı nanolif doku iskelelerinin 3 tekrarlı mekanik test analizi

4.6. Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları

4.6.1. Hücre Hattının Karakterizasyon Çalışmaları ve MTS Analizi

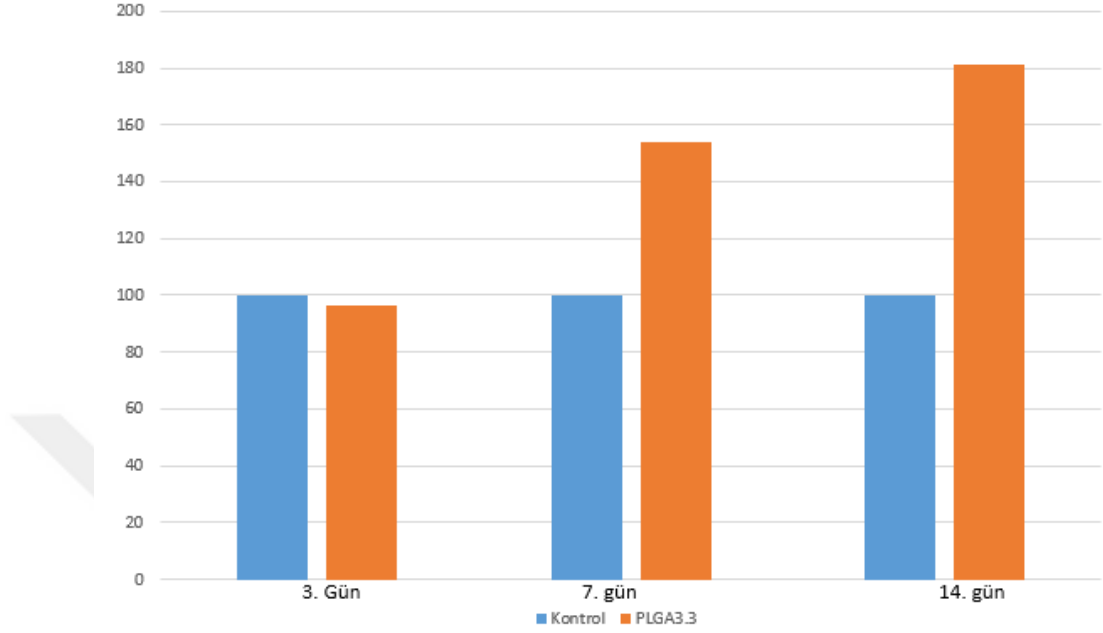
Yürütülen tez kapsamında gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları, Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Bölümü Laboratuvarı'nda Normal Yetişkin İnsan Primer Dermal Fibroblast (PCS-201-012™) hücre hattı (ATCC, Rockville, MD, USA) ile yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucu PLGA ve PCL doku iskeleleri üzerine ekilen insan dermal fibroblast hücrelerine ait üreme grafiği ve 3. , 7. , ve 14. günlerde yapılmış MTS testi sonuçları Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmiştir. MTS analizi ile hücrelerin üremesi, canlılığı, çok çeşitli malzemelerin hücreler üzerindeki sitotoksikite vs. gibi etkisi ve malzemenin biyoyumluluğunun incelenmesine yönelik bilgi edinilmesi mümkündür.



Şekil 4.11 PCL1 ve PCL3 nanolif doku iskelelerinin hücre çoğalma görünümü

MTS proliferasyon assay sonuçlarına göre, PCL yüzeylerin fibroblast hücrelerinde değişen oranlarda çoğalma etkisine yol açtığı saptanmıştır. 3. gün sonunda hücre çoğalma oranı PCL1 ve PCL3 için sırasıyla %109 ve %109 olarak; 7. günün sonunda %103 ve %112 olarak; 14. günün sonunda %108 ve %113 olarak belirlenmiştir. Elde edilen

bulgular doğrultusunda fibroblast hücrelerinde çoğalma etkisine göre membranlar PCL3>PCL1 olarak sıralanmıştır.

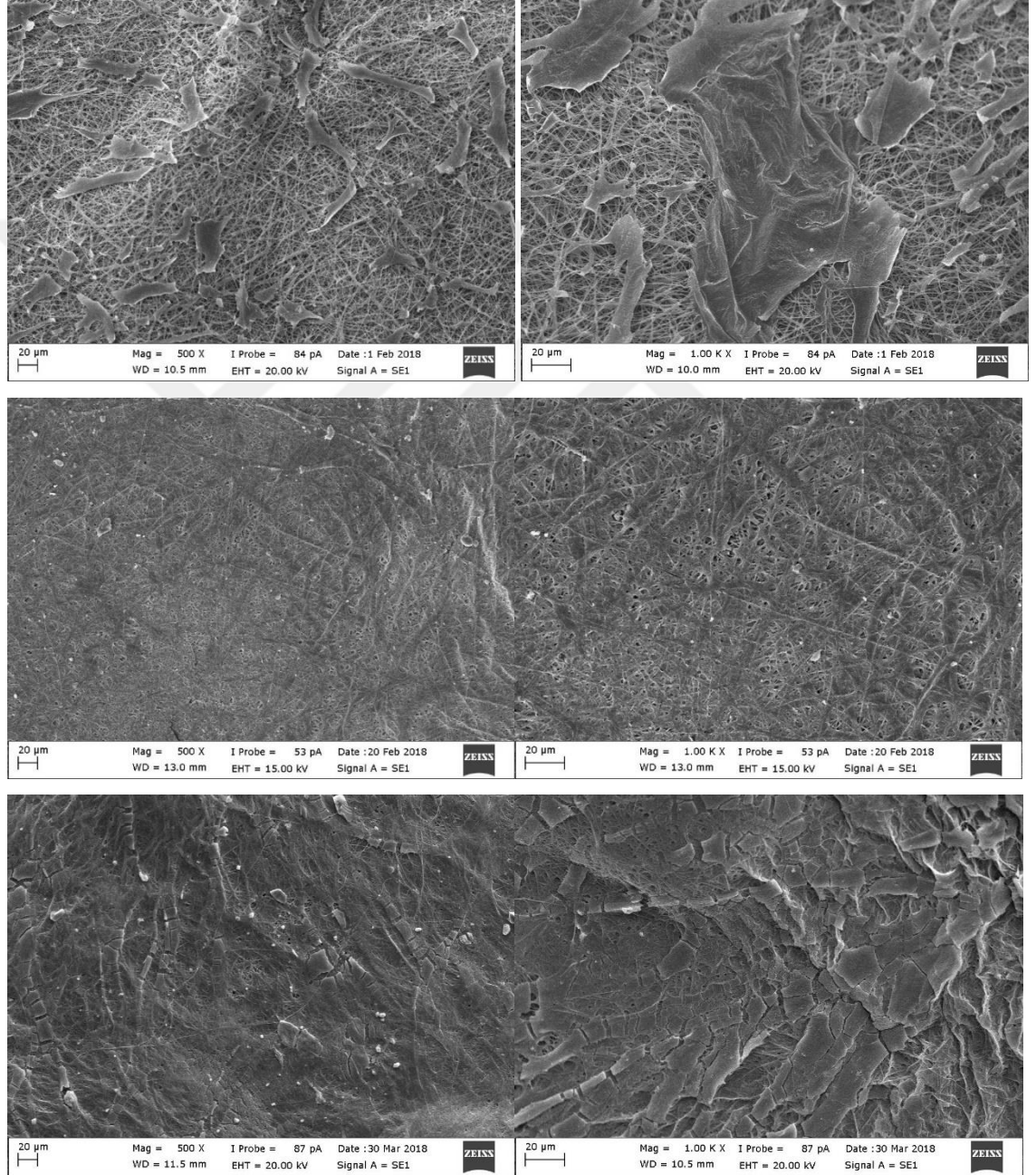


Şekil 4.12 PLGA3.3 nanolif doku iskelelerinin hücre çoğalma görünümü

PLGA3.3. yüzeyinin ise; 3. Gün %96 olan hücre çoğalma oranı, 7. Gün %154 oranında, 14. Gün ise %180 oranında görülmüştür. Bu da dermis tabakası olarak kullanılması hedeflenen yüzeyin hücre aktivitesini arttırdığı görülmektedir. Sentetik ECM görevi görececek şekilde hücre ideal bir ortam oluşturduğu, hücre tutunmasını ve çoğalmasını desteklediği sonucuna varılmaktadır.

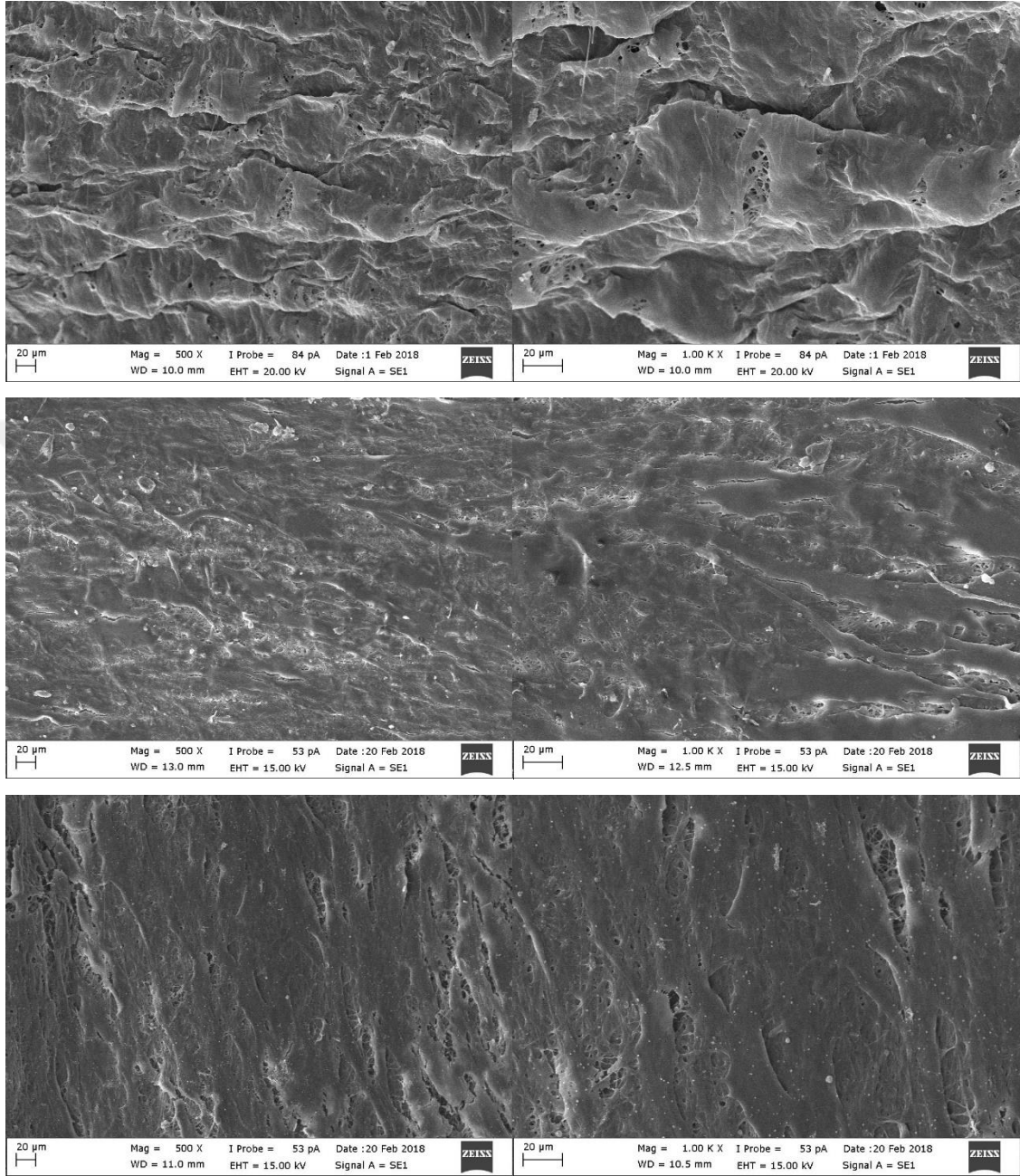
4.6.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

PCL nanolifli doku çatıları üzerinde kültürlenmesi gerçekleştirilen fibroblast hücrelerinin 3., 7. ve 14. günlerinde hücre tutunma ve çoğalma davranışları SEM ile analiz edilmiştir. Katman olarak seçilen PCL1 kodlu numune için 3., 7. Ve 14. Gün SEM fotoğrafları Şekil 4.13' de sunulmuştur.



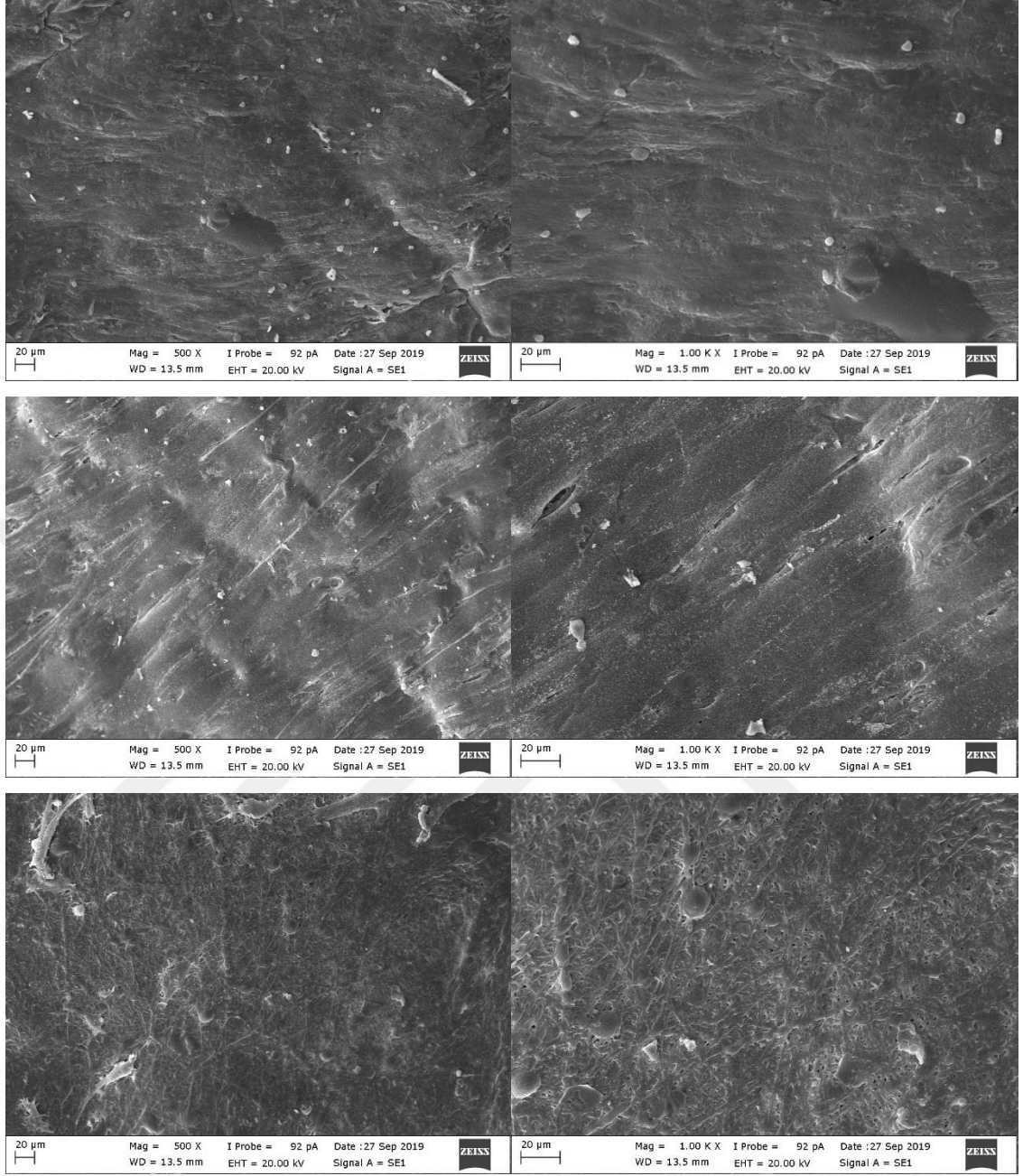
Şekil 4.13 PCL1 kodlu yüzeylere ekilen fibroblast hücrelerinin 3. , 7. ve 14. gün SEM görüntüsü

Katman olarak seçilen PCL3 kodlu numune için 3., 7. ve 14. Gün SEM fotoğrafları Şekil 4.14' de sunulmuştur.



Şekil 4.14 PCL3 kodlu yüzeylere ekilen fibroblast hücrelerinin 3. , 7. ve 14. gün SEM görüntüsü

SEM analizleri sonucunda, PCL1 ve PCL3 çözeltilerden üretilen yüzeylerde hücre tutunması ve çoğalmasının olduğu görülmüştür. Bu durumun lif çapı ve üretilen numunelerin yüzey kalınlığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.15 PLGA3.3 kodlu yüzeylere ekilen fibroblast hücrelerinin 3. , 7. ve 14. gün SEM görüntüsü

SEM analizleri sonucunda, PLGA çözeltisinden üretilen yüzeylerde hücre tutunması ve çoğalmasının olduğu görülmüştür.

5. SONUÇLAR

Önerilen tez kapsamında, biyoyumlu ve biyobozunur polimerler olarak doku mühendisliğinde en çok çalışılan PCL ve PLGA polimerlerinden elektroçekim yöntemiyle üretilen 3 boyutlu çok katmanlı doku-yapı iskelelerinin deri doku mühendisliğinde kullanılabilirlikleri incelenmiştir. Öncelikle insan derisinin katmanlı yapısı incelenerek her bir katman için farklı yapı oluşturulması amaçlanmıştır. Her bir katmanda ayrı polimer kullanılarak üretilen yüzeylerde öncelikle hücre tutunmasını ve çoğalmasını sağlayacak morfolojik yapıya uygun karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yüzeyler üzerine normal insan fibroblast hücreleri ekilerek yüzeylerin ECM vazifesini göreceğ biçimde hücre çoğalmasına etkisi incelenmiştir.

PLGA ve PCL doku mühendisliğinde en sık kullanılan lineer alifatik polyester ailesinin üyeleridir. Bu polimerlerle ilgili literatürde pek çok çalışma yapılmıştır. Elektroçekim yöntemi parametreleri belirlenirken literatür bilgilerinden faydalanarak farklı parametrelerle en uygun yüzeyin üretilebilme çalışmaları yapılmıştır. Üretilen yüzeylerin karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri, gözenek boyutu ve gözeneklilik ve temas açısı ölçümleri ile yapılmış, mekanik karakterizasyonu ise çekme testi ile gerçekleştirilmiştir.

PLGA polimeri için %15 ve %20 konsantrasyonları belirlenerek; elektroçekim işleminde besleme oranı, sarım hızı, mesafe ve voltaj değerleri üzerinde değişiklik yapılarak sonuçlar irdelenmiştir. PLGA yüzeyinin ilk üretim denemesinde boncuklu olduğu görülmüştür. Boncuklu yüzeylerin hücreleri tutunması uygun ortam sağlayabilir ancak sadece o bölgelerde yoğunlaşma görüleceğinden, homojen bir hücre dağılımı olmayacaktır. Bu nedenle boncuk oluşumunu minimize etmek için toplamda 6 farklı proses ile üretim denemesi yapılmıştır. Yapılan ön araştırmalarda boncuksuz yapı eldesi için öncelikle konsantrasyon değerinin artırılması gerektiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle PLGA3 için konsantrasyon oranı kütlece %20 olarak belirlenmiştir. Besleme oranları 0,3-0,5 ml.sa-1 aralığında değişmesi, uygulanan en etkin gerilimin ise 20-25 kV arasında değişmesi gerektiği belirlenmiştir. Yine literatürde iğne ucu-toplayıcı arasındaki

mesafenin yakın ya da uzak olması boncuklu yapıya neden olduğu vurgulanmıştır. Bu doğrultuda denemeler için 15-20 cm aralığı belirlenmiştir. Dört farklı parametre kompozisyonu denemeleri gerçekleştirildikten sonra üçüncü deneme parametrelerinin (PLGA3.3) en uygun yüzey eldesini sağladığı görülmüş, üretim parametreleri bu yönde optimize edilmiştir.

PCL nanolifli yüzeylerde konsantrasyon %10 olarak belirlenmiştir. 3 farklı parametre kompozisyonu ile üretim denemelerine tabi tutulmuştur. Yapılan ön araştırmalar ve önceki denemeler iğne ucu-toplayıcı arasındaki mesafe ayarında, ideal çekim alanının 14 cm olarak göstermiştir. Silindir hızları 100-500-1000 rpm olarak denenmiştir. Çekim aşamasında donma ve düze ucu tıkanması sebebiyle besleme hızının artırılması gerektiği öngörülmüştür. Bu nedenle besleme hızı 1 ml.sa⁻¹’ den 5 ml.sa⁻¹’e çıkarılmıştır. PCL çözeltisi için kritik voltaj değeri 18-20 kV aralığı olarak belirlenmiştir.

Gözeneklilik ve gözenek boyutu analizi sonuçlarından PCL1’ in %91 oranında yüzey gözenekliliği, PLGA3.3’ ün %83 oranında gözenekliliği ve PCL3’ün %90 oranında yüzey gözenekliliği göstermesi ile tüm bu yüzeylerin gözenek boyutlarının sırasıyla 9.42-3.11-6.08 olması, hücreler için tutunma yüzeyini arttırdığından hücre çoğalmasında olumlu yönde etkileyeceği kanısına varılmıştır.

Temas açısı ölçüm sonuçları incelendiğinde, PLGA1 numunesinin boncuklu yapısı nedeniyle süperhidrofobik özellik göstermiştir. Temas açısının lif inceliğinden etkilendiği bilinmektedir. Katman yüzeyleri olarak kullanılan PCL1-PLGA3.3. ve PCL3’ ün kalınlıkları sırasıyla 0.044-0.017- 0.038 mm şeklindedir. Temas açısına bakıldığında sırasıyla 110,4-99,8-126,9 olarak ölçülmüştür.

Doku iskelesinin kolay implante edilebilmesi ve uzun dönem uygulamalarda başarı sağlanabilmesi için belirli bir mekaniksel dayanıma sahip olması gerekmektedir. Üretilen nanolifli doku iskelelerine toplamda 3 kg ağırlık uygulanarak birleştirilmesinden sonra katmanlı yüzeye uygulanan çekme testinde, ortalama kopma uzaması değerinin %85 olduğu, elastise modülünün ise 41,9 MPa olduğu sonucuna varılmıştır.

Daha sonra üretilen yüzeyler üzerinde fibroblast hücrelerinin ekimleri gerçekleştirilmiştir. Yüzeylerin hücre tutunması ve çoğalması MTS analizi ve SEM görüntüleri üzerinden değerlendirilmiştir. 3 katmanlı yapının birleştirilmiş halini yansıttığı görüşüne varılarak her bir katman için ayrıca MTS analizi ve SEM analizi yapılmıştır. 3. Gün, 7. Gün ve 14. Gün analizler gerçekleştirilerek elde edilen sonuçlara göre çoğalmanın tüm yüzeylerde olduğu söylenebilmektedir. Bu çalışmada yer alan sonuçlar geliştirilen deri iskeleti üzerine ekilen fibroblast hücrelerini yansıtmaktadır. Keratinosit, melanosit, Langerhans veya Merkel hücrelerinden yoksun olmasına rağmen geliştirilen tüm yüzeylerin in vivo ortamda bir insan derisi modelinin başarılı bir şekilde geliştiğini göstermektedir.



KAYNAKLAR

Catherine P. Barnes a, Scott A. Sell, 2008. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds

Anthony D Metcalfe, 2007. Tissue engineering of replacement skin: The crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration

Amtoj Kaur, 2019. Functional Skin Grafts: Where Biomaterials Meet Stem Cells,

Kazaroğlu N.M., 2009. Yara Örtüleri İçin Alternatif Doku İskeleleri: İn Vitro Çalışmalar

Akturk O, 2015. Fabrication And Characterization Of Bilayered Tissue Scaffolds Incorporating Bioactive Agents For Skin Tissue Engineering Applications

Keirouz A, 2019. Nozzle-free electrospinning of Polyvinylpyrrolidone/Poly(glycerol sebacate) fibrous scaffolds for skin tissue engineering applications

Ghosal K, Manakhov A., 2016. Structural and Surface Compatibility Study of Modified Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) Composites for Skin Tissue Engineering

C. Dutta, Dey M., Dutta K.A., Basu B., 2017. Competent processing techniques for scaffolds in tissue engineering

Sirkeci A., 2016. Doku Mühendisliği Uygulamaları İçin Kitozan-Aljinat-Protamin İçeren Destek Yapıların Hazırlanması Ve Karakterizasyonu

M. Kennedy, Bhaw-Luximon A., Jhurry D., 2017. Cell-matrix mechanical interaction in electrospun polymeric scaffolds for tissue engineering: Implications for scaffold design and performance

Can N., 2015. Nanofiber Esaslı Biyobozunur Polimerik Doku İskelesi Üretimi Ve Karakterizasyonu,

Duzyer Ş., 2014. Elektroçekim (Elektrospinning) Yöntemiyle Üretilen Poliester Nanofiblerin Medikal Alanda Kullanılabilirliklerinin Araştırılması

Ramakrishna ve ark, 2005. An Introduction to Electrospinning and Nanofibers, P.14

Chong wang ve Ark., 2016. 3D printing of bone tissue engineering scaffolds with osteoconductivity and osteoinductivity

Çınar E., 2013. Elektro-Eğirme Yöntemiyle Bor Katkılı Oksit, (M=Sr, Ca, Ba) Termoelektrik Nanokompozit Üretimi Ve Karakterizasyonu,

Üstündağ, 2016. Tekstil ve Mühendis Dergisi, Yıl: 16, Sayı: 75-76

Gümüşderelioğlu M., 2016. Rejeneratif Tıpta Polimerler- VI. Ulusal Polimer Bilim ve Teknolojisi Kongresi

Hokmabad V.R., Davaran S., Ramazani A.& Salehi R., 2017. Design and fabrication of porous biodegradable scaffolds: a strategy for tissue engineering

A.Senthamizhan, B.Balusamy, T.Uyar, 2017. Electrospinning: A versatile processing technology for producing nanofibrous materials for biomedical and tissue-engineering applications

Liu N. Ve Ark., 2014. Electrospinning of poly (ε-caprolactone-co-lactide)/Pluronic blended scaffolds for skin tissue engineering

Nguyen Thi Hiep ve Ark., 2017. Biocompatibility of PCL/PLGA-BCP porous scaffold for bone tissue engineering applications

Baykara T., 2009. In Situ Oluşum Yolu İle Meydana Gelen Enjektte Edilebilen İmplant Formunda Sürekli Etkili İlaç Salım Sistemlerinin Geliştirilmesi

Zhao W., 2016. Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering

Dalkıranoğlu S., 2016. Egf İle Desteklenmiş Pcl/Kollajen Bazlı Nanofibröz Doku İskeleleri İle Deri Doku Mühendisliği

Doğan Z., 2012. Nanolif Yara Örtücü Yüzeylerin Geliştirilmesi Ve Karakterizasyonu

Ural A. U., 2006. Kök Hücreler, Totbid dergisi, 2006, cilt 5, sayı 3-4

Köse O. Ve Ark., 2010. Nevus comedonicus syndrome associated with arachnoid cyst: case report, Türkiye Klinikleri, J Dermatol, 2010;20

Köse O., 2015. Epidermal Kök Hücreler, Turk J Dermatol 2015;9, 23-27

Qian Y. Ve Ark., 2016. The preosteoblast response of electrospinning PLGA/PCL nanofibers: effects of biomimetic architecture and collagen I,

Li Y. Ve Ark. ,2016. Enhanced adhesion and proliferation of human umbilical vein endothelial cells on conductive PANI-PCL fiber scaffold by electrical stimulation

Ghosal K., 2016. Structural and Surface Compatibility Study of Modified Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) Composites for Skin Tissue Engineering
K. Bhullar S. Ve Ark., 2017. Design and fabrication of auxetic PCL nanofiber membranes for biomedical applications

Özarlan A.C., Yücel S., 2017. Kompozit Nanofiberler ve Kemik Doku Mühendisliği Yaklaşımı- V. ULUSAL NANOTEKNOLOJİ KONGRESİ 9-10 MART 2017

Hasan M. Ve Ark., 2014. Production of Tissue Engineering Scaffolds from Poly Caprolactone (PCL) and Its Microscopic Analysis Md.

Jianga T. Ve Ark., 2015. Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration

Hiep N. Ve ark. 2017. Biocompatibility of PCL/PLGA-BCP porous scaffold for bone tissue engineering applications

Dutta R. Ve Ark., 2017. Competent processing techniques for scaffolds in tissue engineering

Khoshroo K. Ve ark., 2017. Development of 3D PCL microsphere/TiO₂ nanotube composite scaffolds for bone tissue engineering

K. Nune, 2017. Electrospinning Of Collagen Nanofiber Scaffolds For Tissue Repair And Regeneration

Mir M. Ve Ark., 2017. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery

Zhao Li. Ve ark., 2007, Preparation and Cytocompatibility of PLGA Scaffolds With Controllable Fiber Morphology and Diameter Using Electrospinning Method

Ronca D. Ve ark., 2016. Bone Tissue Engineering: 3D PCL-based nanocomposite scaffolds with tailored properties

Do V. A., 2015, 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications

RANJBARVAN P. Ve Ark, 2018. Natural Compounds for Skin Tissue Engineering by Electrospinning of Nylon-Beta Vulgaris

Mellor F.L. ve Ark., 2017. Fabrication and Evaluation of Electrospun, 3D-Bioplotted, and Combination of Electrospun/3D-Bioplotted Scaffolds for Tissue Engineering Applications

Wei L. ve Ark., 2018. A gelatin/collagen/polycaprolactone scaffold for skin regeneration

M. Janmohammadi ve ark., 2019. Electrospun polycaprolactone scaffolds for tissue engineering: a review

<https://www.creative-bioarray.com/filter/fibroblast-cell-and-media-12.html>,
(Eriřim tarihi: 17.01.2019)

<https://www.creative-bioarray.com/filter/fibroblast-cell-and-media-12.html>,
(Eriřim tarihi: 15.04.2019)

<https://www.news-medical.net/health/Basal-Cells-Keratinocytes-and-Melanocytes.aspx>, (Eriřim tarihi: 18.07.2019)

<https://www.lifelinecelltech.com/keratinocytes-barrier-to-the-outside-world/>,
(Eriřim tarihi: 21.01.2019)

<https://www.news-medical.net/health/Basal-Cells-Keratinocytes-and-Melanocytes.aspx> (Eriřim tarihi: 17.01.2019),

<https://slideplayer.biz.tr/slide/11471433> (Eriřim tarihi: 17.01.2019)

<https://www.berthold-bio.com/microplate-readers/details/product/tristar2-lb-942/action/show.html> (Eriřim tarihi: 14.06.2019),

<http://www.exiqon.com/ls/documents/scientific/rna-isolation-kit-manual-cell-and-plant.pdf>, (Eriřim tarihi: 25.08.2019)

<https://www.opticsplanet.com/beckman-coulter-du-700-series-uv-vis-spectrophotometers-beckman-coulter-a23616.html>, (Eriřim tarihi: 25.08.2019)

<https://www.dreamstime.com/layers-healthy-human-skin-hair-follicle-sweat-sebaceous-glands-epidermis-dermis-hypodermis-muscle-tissue-vector-image123014475> (Eriřim tarihi: 12.09.2019)

<https://slideplayer.com/slide/11716447/> (Eriřim tarihi: 12.09.2019)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yelit Suen DOĞRUOK

Doğum Yeri ve Tarihi : BURSA/ 18.07.1993

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Bursa Süleyman Çelebi Lisesi (Fen Bilimleri)

Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : BUTEKOM (2014- Halen Çalışmakta), UTİB (2015-2017)

İletişim (e-posta) : yelittsuen.k@gmail.com

Yayınları :

Doğruok S.Y., 2018. World Trade Of Babies and Childrens Wear, Temmuz 2018
BTSO JunioKids

Doğruok S.Y., 2018. Teknik Tekstilin Dünya' daki ve Türkiye' deki Yeri, BEBKA
HABER

Yıldırım K., Sanlı S.Y., Bozkurt Z., 2016. Cinte Tehtextil Fuarı Teknolojik
Değerlendirme Raporu, editörler: Ulcay, Y. Teke, Ş., BUTEKOM, Bursa

Teke Ş., Değirmenci N., Doğruok S.Y., 2017. 16. Uluslararası Tekstil Teknolojisi Ve
Kimyasındaki Son Gelişmeler Sempozyumu, 04-05-06 Mayıs 2017