

**YALOVA ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YARA/YANIK ÖRTÜ MATERYALİ OLARAK ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİK  
TAŞIYAN GÖZENEKLİ POLİMERİK MEMBRANLARIN HAZIRLANMASI  
VE KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Candan Özge ÇAKIR**

**Polimer Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Polimer Mühendisliği Programı**

**HAZİRAN 2013**



**YALOVA ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YARA/YANIK ÖRTÜ MATERYALİ OLARAK ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİK  
TAŞIYAN GÖZENEKLİ POLİMERİK MEMBRANLARIN HAZIRLANMASI  
VE KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Candan Özge ÇAKIR  
(105101009)**

**Polimer Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Polimer Mühendisliği Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU**

**HAZİRAN 2013**



YALOVA Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 105101009 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Candan Özge ÇAKIR, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “YARA/YANIK ÖRTÜ MATERYALİ OLARAK ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİK TAŞIYAN GÖZENEKLİ POLİMERİK MEMBRANLARIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :** **Doç. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU**  
Yalova Üniversitesi



**Jüri Üyeleri :** **Doç. Dr. Kadriye Tuzlakoğlu**  
Yalova Üniversitesi



**Doç. Dr. Sinan Şen**  
Yalova Üniversitesi



**Yrd. Doç. Dr. Didem Omay**  
Yalova Üniversitesi



**Teslim Tarihi :** **21 Haziran 2013**  
**Savunma Tarihi :** **10 Temmuz 2013**



*Babama,*





## ÖNSÖZ

Polimer Mühendisliği Yüksek Lisans programının sonuna gelmiş bulunuyorum. Mesleğimin ayrıntılarını öğrenmek ve faydalı olmak için önümde aşmam gereken birçok engel olduğunun farkında olarak;

Bu tez çalışmasında beni yönlendiren ve bana yardımcı olan, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam, Doç. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU'na,

Her konuda yardımını esirgemeyen, bilgilerini aktarmaktan zevk duyan, çalışmama katkısı olan bütün hocalarıma ve tez çalışmama katkısı olan değerli hocam Doç. Dr. Sinan ŞEN'e,

Tez çalışmam süresince Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nden yararlanmamda emeği ve katkısı olan Doç. Dr. Sevil DİNÇER'e,

Birlikte çalışmaktan zevk aldığım arkadaşlarıma,

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme ve dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2013

Candan Özge Çakır



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	ix
KISALTMALAR .....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY .....	xix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1 Tezin Amacı .....	2
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1 Derinin Yapısı .....	3
2.2 Yara İyileşmesi.....	4
2.3 Yara İyileşmesinde Kullanılan Malzemeler .....	7
2.4 Doku Mühendisliği.....	8
2.5 Deri Doku Mühendisliği.....	14
2.6 Doku Mühendisliğinde Kullanılan Polimerler .....	20
2.7 İpeğin Yapısı ve Doku Mühendisliği Uygulamaları .....	22
2.8 Doku İskelesi Fabrikasyon Teknikleri .....	28
2.8.1 Çözücü döküm-partikül uzaklaştırma .....	29
2.8.2 Gaz köpüklendirme .....	30
2.8.3 Faz ayrılması .....	30
2.8.4 Elektroegirme.....	31
2.8.5 Eriyik kalıplama.....	32
2.8.6 Dondurarak kurutma (Liyofilizasyon) .....	33
2.8.7 Katı serbest form fabrikasyonu .....	33
2.9 Antibakteriyel Yara Örtüleri .....	35
2.9.1 Gümüş sülfadiazin.....	35
<b>3. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>37</b>
3.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	37
3.2 İpek Kozalarından Fibroin İzolasyonu ve Saflaştırılması .....	37
3.3 Çift Katmanlı Doku İskelelerinin Hazırlanması.....	37
3.3.1 İpek fibroin süngerimsi yapıların hazırlanması .....	37
3.3.2 Süngerimsi yapılara heparin immobilizasyonu.....	38
3.3.3 Nanofibröz ipek fibroin/AgSD üst katmanın hazırlanması.....	38
3.4 Çift Katmanlı Doku İskelelerinin Karakterizasyonu.....	40
3.4.1 Morfolojik karakterizasyon .....	40
3.4.2 Yapısal analiz .....	40
3.4.3 İmmobilize heparin miktarının tayini .....	40
3.4.4 Şişme kapasitesi .....	41
3.5 Doku İskelelerinin Antibakteriyel Özelliklerinin İncelenmesi .....	42
<b>4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....</b>	<b>43</b>

4.1 İpek fibroin Süngerlerin ve Çift Katmanlı Doku İskelelerinin Morfolojik Özellikleri .....	43
4.2 Yapısal Analiz .....	48
4.3 İmmobilize Heparin Miktarı .....	49
4.4 Şişme Testi Sonuçları .....	51
4.5 Doku İskelelerinin Antibakteriyel Özellikleri .....	52
<b>5. SONUÇ .....</b>	<b>55</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>57</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>63</b>

## KISALTMALAR

<b>ECM</b>	: Ekstraselüler Matris
<b>PMN</b>	: Polimorfonükleer Lökosit
<b>PDGF</b>	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
<b>PMN</b>	: Polimorfonükleer Lökosit
<b>HA</b>	: Hyaluronik Asit
<b>SA</b>	: Selüloz Asetat
<b>PVA</b>	: Poli(vinil alkol)
<b>PCL</b>	: Poli( $\epsilon$ -kaprolakton)
<b>PLA</b>	: Poli(laktat)
<b>PLLA</b>	: Poli(L-laktat)
<b>PGA</b>	: Poli(glikolat)
<b>PLGA</b>	: Poli(laktat-ko-glikolat)
<b>PHB</b>	: Poli(hidroksibütirat)
<b>PEG</b>	: Poli(etilen glikol)
<b>PEO</b>	: Poli(etilen oksit)
<b>FDA</b>	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
<b>EGF</b>	: Epidermal Büyüme Faktörü
<b>BM</b>	: Bazal Membran
<b>Tg</b>	: Camsı geçiş sıcaklığı
<b>SFF</b>	: Katı Serbest-Form Fabrikasyonu
<b>AgSD</b>	: Gümüş sülfadiazin
<b>LB</b>	: Luria-bertani Broth
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>EDC</b>	: 1-Etil-3-3-dimetilaminopropilkarbodimid hidroklorid
<b>NHS</b>	: N-Hidroksisüksinimit
<b>HFP</b>	: 1,1,1,3,3,3-Hekzafloro-2-propanol
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskopisi
<b>FTIR</b>	: Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
<b>EDX</b>	: Enerji Dağılımlı X-Işınları



## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

Çizelge 2.1 : Doku mühendisliğinde sıkça kullanılan materyaller.....	13
Çizelge 2.2 : Doku mühendisliğinde kullanılan biyomateryallerin ticari isimleri. ...	17
Çizelge 2.3 : Bombyx mori ipek fibroininin aminoasit bileşimi.....	23
Çizelge 3.1 : Kullanılan besi yeri içeriği .....	42
Çizelge 4.1 : AgSD yüklü doku iskelelerinin yüzeyindeki Ag elementinin dağılımı... .....	47
Çizelge 4.2: Doku iskelelerinin antibakteriyel özellikleri.....	53





## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 : Derinin yapısı. ....	4
Şekil 2.2 : Normal yara iyileşme prosesi. ....	5
Şekil 2.3 : Yara iyileşmesinde oluşan faz yapıları. ....	6
Şekil 2.4 : Doku mühendisliğinin temel bileşenleri. ....	9
Şekil 2.5 : Doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen yapı. ....	14
Şekil 2.6 : Glisin, alanin, serin ve tirozin gruplarının dizilişinin genel formülü. ....	23
Şekil 2.7 : Fibroin makromoleküllerinin yan grupları. ....	24
Şekil 2.8 : Fibroin makromoleküllerinin $\alpha$ -heliks yapısı. ....	25
Şekil 2.9 : Fibroinin $\beta$ -konformasyonu ( $\beta$ -düzlemsel tabaka). ....	26
Şekil 2.10 : İpek fibroinin $\alpha$ -heliks ve $\beta$ -konformasyonu. ....	27
Şekil 2.11 : Çözücü döküm-partikül uzaklaştırma yöntemi. ....	29
Şekil 2.12 : Faz ayrılması yöntemi. ....	31
Şekil 2.13 : Elektroğirme yöntemi. ....	31
Şekil 2.14 : Katı serbest form fabrikasyonu (İndirekt SFF). ....	34
Şekil 3.1 : Elektroğirme cihazı. ....	39
Şekil 4.1 : İpek fibroin süngerlerin morfolojisi: (a,b) Etanol ile muameleden önce. (c,d) Etanol ile muameleden sonra. ....	44
Şekil 4.2 : Çift katmanlı doku iskelelerinin nanofibröz katmanının SEM görüntüleri: (a,b) AgSD içermeyen. (c,d) % 2. AgSD. (e,f) % 10 AgSD. (g,h) % 20 AgSD içeren. ....	45
Şekil 4.3 : Çift katmanlı doku iskelelerinin lateral SEM görüntüsü. ....	46
Şekil 4.4 : Doku iskelelerinin EDX spektrumları: (a) % 2 AgSD. (b) % 10 AgSD. (c) % 20 AgSD yüklü doku iskeleleri. ....	47
Şekil 4.5 : İpek I ve İpek II yapısındaki süngerlerin FTIR analizi. ....	48
Şekil 4.6 : Heparin immobilize olan (sol) ve heparin immobilize olmayan (sağ) ipek fibroin süngerlerin fotoğrafı. ....	50
Şekil 4.7 : Standard eğriden immobilize heparin miktarının hesaplanması. ....	50
Şekil 4.8 : % Şişme oranı - Zaman grafiği. ....	51
Şekil 4.9 : Doku iskelelerinin antibakteriyel test görüntüleri. ....	53



# YARA/YANIK ÖRTÜ MATERYALİ OLARAK ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİK TAŞIYAN GÖZENEKLI POLİMERİK MEMBRANLARIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

## ÖZET

Bu tez çalışmasında amaç; bir travma ya da yanma sonucu oluşan ve kendiliğinden iyileşmesi uzun süren deri dokusu kayıplarının doku mühendisliği yaklaşımı ile daha hızlı ve kaliteli bir şekilde tedavisini sağlamak için çift katmanlı ipek fibroin doku iskelelerinin tasarlanmasıdır.

Doku iskelelerinde hücrelerin yayılmasını ve çoğalmasını hızlandırmak için, doku iskelelerinin birbiriyle bağlantılı yüksek gözenekli yapılara sahip olmaları istenmektedir. Bu amaca uygun olarak, liyofilizasyon yöntemiyle yüksek gözenekli yapıya sahip ipek fibroin süngerler üretilmiştir. Elde edilen ipek fibroin doku iskelelerine yara iyileşme sürecini hızlandırmak amacıyla heparin immobilize edilmiştir. Elde edilen ipek fibroin süngerlerin yapısal özellikleri SEM’de incelenmiştir. Ayrıca bu süngerlerin suda şişme davranışı da incelenerek % şişme oranları hesaplanmıştır.

Yara/yanık iyileşmesi süresince bakteriyel atakların minimuma indirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada doku iskelelerine antibakteriyel özellik kazandırmak için antibakteriyel ajan olarak, gümüş sülfadiazin kullanılmıştır. Heparin immobilize edilmiş ipek fibroin süngerlerin üzeri elektroçirme yöntemi kullanılarak gümüş sülfadiazin içeren nanofibröz ipek fibroin film tabakasıyla kaplanmıştır. Böylelikle alt katmanı heparin yüklü sünger, üst katmanı da gümüş sülfadiazin içeren ince nanofibröz tabaka olmak üzere çift katmanlı doku iskeleleri elde edilmiştir.

Bu çalışmanın sonunda antibakteriyel özellik gösteren yüksek gözenekli yapıda doku iskeleleri elde edilmiştir. Üretilen çift katmanlı doku iskelelerinin antibakteriyel özelliği incelenmiştir ve sonrasında bu doku iskeleleri SEM ile karakterize edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Deri doku mühendisliği, ipek fibroin, antibakteriyel yara örtüleri.



# **PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF POROUS POLYMERIC MEMBRANES FEATURED ANTIBACTERIAL AS A WOUND/BURN DRESSING MATERIAL**

## **SUMMARY**

One of the major applications of tissue-engineered skin substitutes for wound healing is to promote the healing of cutaneous wounds. In this respect, many important clinical milestones have been reached in the past decades. However, currently available skin substitutes for wound healing often suffer from a range of problems including wound contraction, scar formation, and poor integration with host tissue. Engineering skin substitutes by tissue engineering approach has relied upon the creation of three-dimensional scaffolds as extracellular matrix (ECM) analog to guide cell adhesion, growth, and differentiation to form skin functional and structural tissue. The three-dimensional scaffolds can not only cover wound and give a physical barrier against external infection as wound dressing, but also can provide support both for dermal fibroblasts and the overlying keratinocytes for skin tissue engineering. A successful tissue scaffold should exhibit appropriate physical and mechanical characteristics and provide an appropriate surface chemistry and nano and microstructures to facilitate cellular attachment, proliferation, and differentiation.

In this thesis the aim is to design a double layer silk fibroin scaffold to provide with a treatment which requires long-term to heal the skin tissue losses. The loss of skin can occur for many reasons, including genetic disorders, acute trauma, chronic wounds or even surgical interventions. One of the most common reasons for major skin loss is thermal trauma, where substantial areas of skin can be damaged, often without the possibility of skin regeneration. Burns and scalds sometimes can result in rapid, extensive, deep wounds which cannot be successfully treated with common techniques, and can lead to death.

Patients with 50 per cent full-thickness wounds have only 50 per cent of undamaged skin left which could be used for split-thickness skin harvesting. Donor sites would add to the total wound size resulting in a wound area covering 100 per cent of the body. An impaired epidermal barrier combined with reduced immunity of heavily burned patients can result in bacterial sepsis which is the main complication in deep extensive burns. Donor sites also heal with some scarring and may be very painful; hence an additional analgesic pharmacological load is required. Moreover, depending on the thickness of the dermis, only three to four split-thickness skin harvests are possible from the same site and re-cropping is delayed by the time necessary for re-epithelialization.

Situations where normal autografts cannot be used to replace damaged skin often lead to a greater risk of mortality, prolonged hospital stay and increased expenditure for the National Health Service. There is a substantial need for tissue-engineered skin bioconstructs and research is active in this field. Significant progress has been made over the years in the development and clinical use of bioengineered components of the various skin layers. Off-the-shelf availability of such constructs, or production of sufficient quantities of biological materials to aid rapid wound closure, are often the only means to help patients with major skin loss.

Because of the great importance and demand for skin-replacement products, there is a long history of material development, and many research groups worldwide have focused on creating biomaterials for skin substitution. Skin substitute biomaterials are commonly referred to by a variety of terms that can lead to confusion. They can be described as bioengineered skin equivalents, tissue-engineered skin, tissue-engineered skin constructs, biological skin substitutes, bioengineered skin substitutes, skin substitute bioconstructs, living skin replacements and, more recently, as bioengineered alternative tissue. Although these terms differ slightly from each other, and may not truly describe the product, they are considered to be equal and interchangeable by the majority of investigators.

Several requirements have been required as crucial for the production of tissue engineering scaffolds. The scaffold should possess interconnecting pores of appropriate scale to favour tissue integration and vascularisation, and also should have appropriate surface chemistry to favour cellular attachment, differentiation and proliferation. Therefore, firstly silk fibroin sponges having high porous structure are produced by the method of freeze drying to represent the dermis layer of the skin. The produced silk fibroin sponges are immobilized with heparin to accelerate the recovery of the wounds. The analysis of the sponges is characterized by SEM. The surfaces of these sponges are covered with the nano fiber film layer acting as an epidermis layer of the skin, used electrospinning technique. For decades silver-containing antibiotics such as silver sulfadiazine (AgSD) have been applied as a standard topical therapy for patients with partial-thickness burns and venous stasis ulcers. In this study, silver sulfadiazine is used as an antibacterial agent to acquire antibacterial feature of the top layer of the double layer scaffolds.

**Key words:** Skin Tissue Engineering, Silk Fibroin, Antibacterial Wound Dressings.

## 1. GİRİŞ

Deri vücudun en geniş organıdır ve organizmanın yaşamını sürdürebilmesi için dış çevreye karşı bir bariyer oluşturmaktadır [1]. Deri, anatomik olarak birçok farklı tabakadan oluşmaktadır. Derinin epidermis tabakası, sürekli olarak kendini yenileyen bir dokudur ve dış ortama karşı bariyer özelliği sağlamaktadır. Dermis, epidermise bitişiktir ve deriye mekanik destek sağlamaktadır [2]. Dermis ECM bileşenleri ile fibroblastların hücresel bileşenlerini içermektedir. Bu tabaka deriye esneklik sağladığı kadar mekanik kuvvet de sağlamaktadır ve lenfatik sistemi, sinirleri ve damarları desteklemektedir [3].

Deri insan vücudunun yaklaşık olarak onda birini oluşturmaktadır. Bu büyük organın travma, hastalık, yanık veya cerrahi operasyonlar gibi durumlarda zarar görmesi büyük sorunlara yol açabilmektedir. Doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen materyaller akut ve kronik yaraların iyileştirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Ancak günümüzde normal derinin anatomisi, fizyolojisi, biyolojik kararlılığı ve estetiğine tamamen benzeyen bir model bulunmamaktadır [4].

Deri hasarı; genetik bozukluklar, akut travma, kronik yaralar, cerrahi müdahaleler gibi birçok sebepten oluşabilmektedir. Büyük deri kaybının en sık karşılaşılan nedenlerinden biri, derinin önemli bölgelerinin zarar gördüğü çoğu kez deri rejenerasyonu imkanının olmadığı termal travmadır. Yanıklar ve haşlanmalar bazen genel tekniklerle tedavinin başarılı olamadığı ve ölüme yol açabilen geniş ve derin yaralarla sonuçlanabilmektedir [5].

Yara örtü materyalleri ve ilaçları dünyadaki medikal ve farmasötik piyasasının en önemli bölümlerinden birini oluşturmaktadır. Yapay deri materyalleri için çok sayıda potansiyel uygulama alanı bulunmaktadır. Diyabetik nöropatik ülserler ve damar yetmezliği ülserleri gibi kendiliğinden iyileşemeyen yaralar bu uygulamaların büyük bir kısmını oluşturmaktadır [6].

## 1.1 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı; bir travma ya da yanma sonucu oluşan deri dokusu kayıplarının doku mühendisliği yaklaşımı ile daha hızlı ve kaliteli bir şekilde tedavisini sağlamak için polimerik doku iskeleleri tasarlamaktır. Doku iskelelerinde hücrelerin yayılmasını ve çoğalmasını hızlandırmak için, doku iskelelerinin gözenekli yapılara sahip olmaları istenmektedir. Bu tez kapsamında hazırlanan doku iskelelerinin dermisi taklit eden alt tabakasının üretiminde dondurarak kurutma yöntemi seçilmiştir. Bu yöntemle yüksek ve birbiriyle bağlantılı gözenekler içeren süngerimsi yapıdaki doku iskeleleri üretilecektir. Heparin, granül formda mast hücrelerinde bulunan ve birçok büyüme faktörünü spesifik olarak bağlayabilen bir moleküldür. Çalışmaların bu bölümünde doku iskelelerinin dermis tabakasını temsil eden ve fibroblast büyümesi, damarlaşma gibi fonksiyonların gerçekleşeceği süngerimsi tabakaya heparin immobilize edilecektir. Bu aşamadan sonra elde edilen süngerlerin üzeri nano boyutta polimer fiberlerle film şeklinde kaplanarak derinin epidermis tabakasına benzer bir yapı elde edilmesi amaçlanmıştır. İyileşme süresince bakteriyel atakların minimuma indirilmesi gerekmektedir. Bu amaca yönelik olarak birçok antibakteriyel ajan ve antibiyotik önerilmiştir. Bu çalışmada da gümüşsülfadiazin, antibakteriyel ajan olarak kullanılacaktır. Elektroçirme yöntemi ile süngerlerin üzerinde gümüşsülfadiazin içeren nanofibroz membran oluşturulacaktır. Çalışma sonunda antibakteriyel özellik gösteren gözenekli doku iskeleleri elde edilecektir.

Elde edilen sünger ve çift katmanlı doku iskelelerinin morfolojik açıdan karakterizasyonu Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile yapılacaktır. Yapısal analiz için süngerlerin Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FTIR) spektrumları incelenecektir. Doku iskelelerine immobilize edilen heparin miktarını belirlemek amacıyla da Toluidine Blue yöntemi kullanılacaktır. Ayrıca doku iskelelerinin antibakteriyel özellikleri incelenecek ve gümüş elementinin doku iskelesi üzerindeki varlığı ve dağılımını belirlemek için Enerji Dağılımlı X-Işınları (EDX) analizi yapılacaktır.

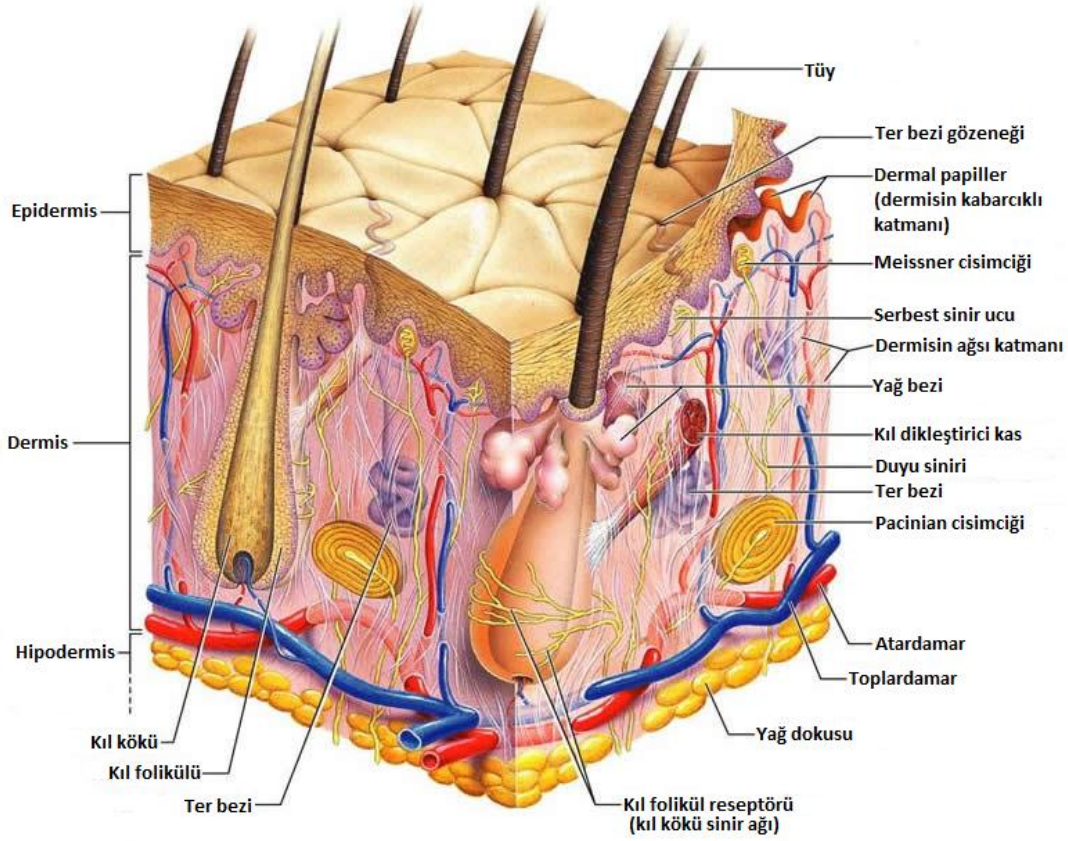


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Derinin Yapısı

Deri, anatomik olarak birçok farklı tabakadan oluşmaktadır (Şekil 2.1). Derinin korunması, ölü hücrelerden oluşan epidermisin en dış katmanı korun ile sağlanmaktadır. 10-20 µm kalınlığındaki bu tabaka, hem bileşiklerin deriden absorpsiyonuna hem de su kaybına karşı bariyer özelliği sağlamaktadır. Korunun altında korunun jenerasyonundan sorumlu 50-100 µm kalınlığındaki canlı epidermis bulunmaktadır. Canlı epidermis; bazal, sinir ve granüler hücre katmanlarından oluşan çok katlı bir epiteldir. Herbir katman; keratinositlerin farklılaşma hali, pozisyonu, şekli ve morfolojisi ile tanımlanmaktadır. Epidermis sürekli olarak kendini yenileyen bir dokudur. Korun yüzeyinden hücre kayıpları (deri dökülmesi) alttaki epidermis tarafından hücre çoğalması ile dengelenmektedir. Keratinositler olgunlaşma süresince çok sayıda farklı yapısal protein ve yağ sentezlemektedirler. Bazal katmandan ayrılan keratinositler farklılaşmaya başlarlar ve üst katmanlara göç boyunca birkaç yapı ve bileşim değişikliğine uğrarlar. Keratinositlerin farklılaşması sonucu yapılarında oluşan köklü değişikliklerle bağlantılı olarak kimyasal ve fiziksel açıdan dayanıklı pul şeklinde olan ve ölü tabaka olarak bilinen koruna dönüşmektedir. 1-2 mm kalınlığındaki dermis, epidermise bitişiktir ve deriye mekanik destek sağlamaktadır [2].

Dermis vaskülarizedir ve dokunma, sıcaklık ve acı hissi için reseptörler içermektedir [7]. Dermis ECM bileşenleri (kolajen, elastin ve glikozaminoglikanlar) ile oluşur fibroblastların hücresel bileşenlerinden oluşmaktadır. Bu tabaka deriye esneklik sağladığı kadar mekanik kuvvet de sağlamaktadır ve lenfatik sistemi, sinirleri ve damarları desteklemektedir [3]. ECM molekülleri, mekanik destek sağlamak ve hücre aktivitelerini düzenlemek için hücreleri çevrelemektedir [8].

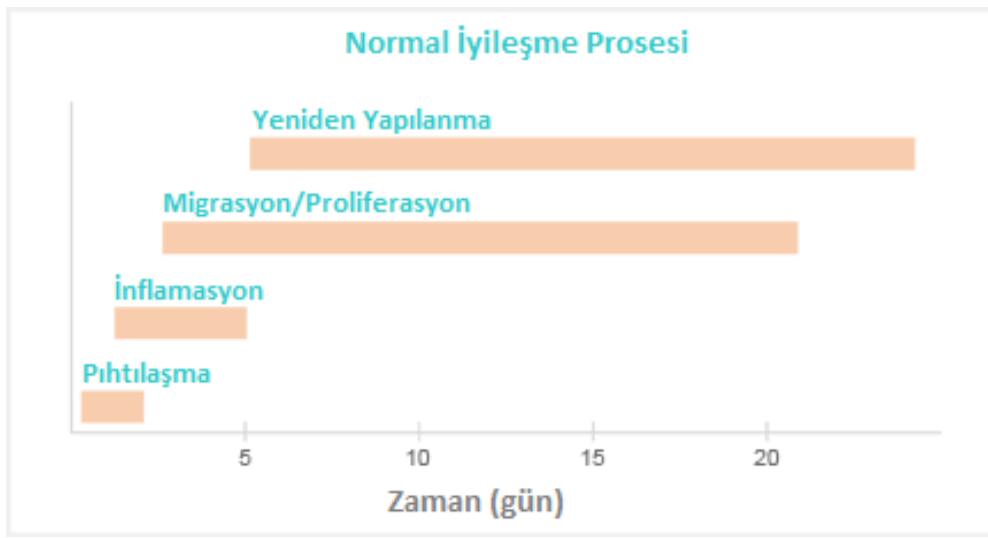


**Şekil 2.1 : Derinin yapısı.**

## 2.2 Yara İyileşmesi

Deri hasarı genetik bozukluklar, akut travma, kronik yaralar, cerrahi müdahaleler gibi birçok sebepten oluşabilmektedir. Büyük deri kaybının en sık karşılaşılan nedenlerinden biri, derinin önemli bölgelerinin zarar gördüğü çoğu kez deri rejenerasyonu imkanının olmadığı termal travmadır. Yanıklar ve haşlanmalar bazen genel tekniklerle tedavinin başarılı olamadığı ve ölüme yol açabilen geniş ve derin yaralarla sonuçlanabilmektedir. Yara çeşitleri; epidermal, yüzeysel kısmi-kalınlıklı, derin kısmi-kalınlıklı ve yaranın derinliği ile artan tam kalınlıklı yara şeklinde ayrılabilir [5]. Yara; fiziksel veya termal hasarla sonuçlanan ya da medikal veya fizyolojik durumun bir sonucu olarak oluşan deride hasar olarak tanımlanabilir. Wound Healing Society'e göre yara; normal anatomik yapının ve fonksiyonunun bozulmasıdır [9].

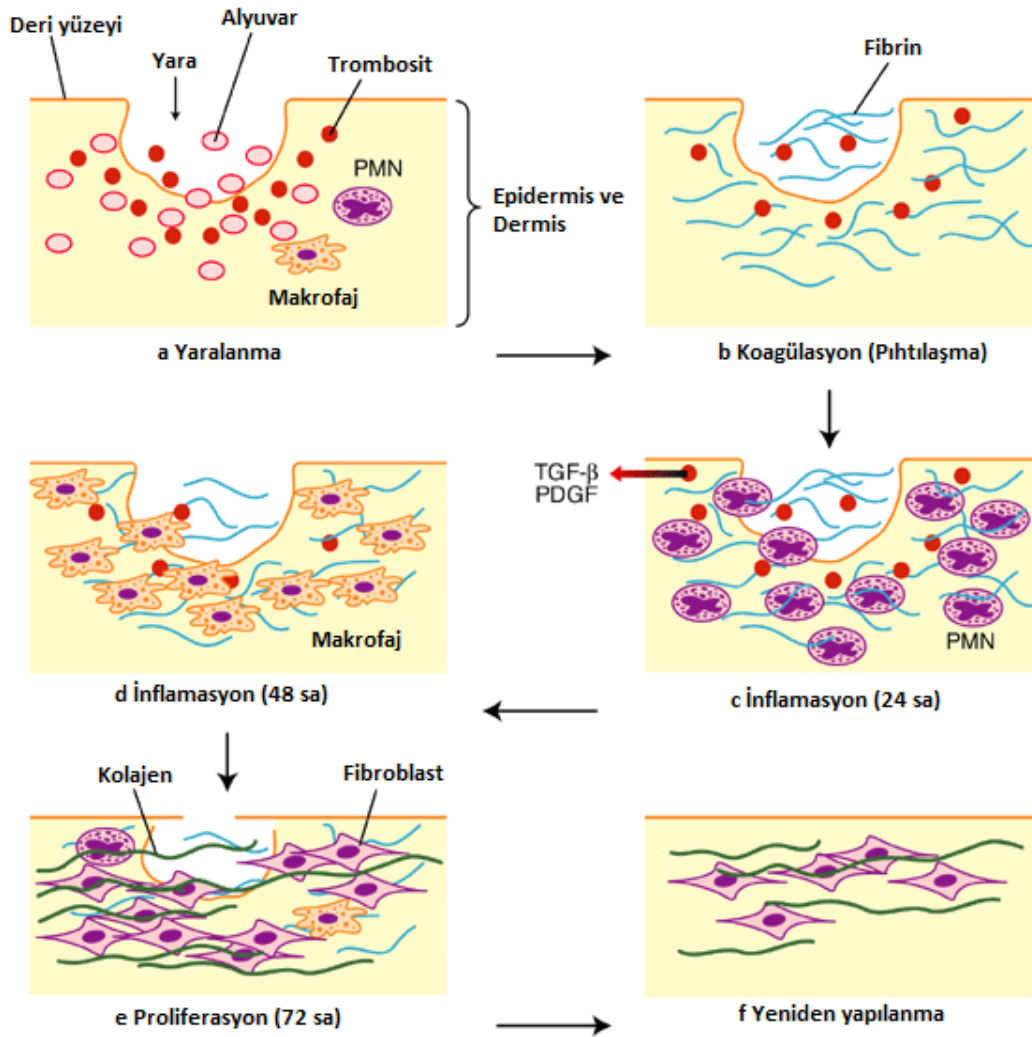
Yara iyileşmesi; farklı hücre tipleri, sitokinler ve ekstraselüler matriks (ECM) arasındaki etkileşimlerin kompleks serilerinden oluşmaktadır [10]. İnsanlarda ve daha çok tüm memeli türlerde yara iyileşme prosesi, birbirini izleyen üç aşamaya ayrılabilir: inflamasyon, yeni doku oluşumu ve yeniden yapılanma (Şekil 2.2). Bir aşamadan diğerine geçiş; keratinositler, fibroblastlar ve makrofajlar içeren ana hücre yoğunluğunun farklılaşmasına ve olgunlaşmasına bağlıdır [11]. Yara fibroblastları kolajen tip I ve III, fibronektin ve proteoglikanlar dahil ECM proteinlerini üretmektedirler. Bu ECM proteinleri dokunun tekrar modellenmesinde, yara oluşumunda ve iyileştirilmesinde görev almaktadırlar [8].



Şekil 2.2 : Normal yara iyileşme prosesi.

Yaralanmadan sonra gerçekleşen ilk olay trombositler tarafından aktive edilen kan pıhtısı oluşumudur. İlk toplanan inflamatuvar hücreler nötrofillerdir. Nötrofiller; aktif trombositler, endotelial hücreler ve buna ilaveten patojenlerin degradasyon ürünlerinden üretilen çok sayıda inflamatuvar sitokinler tarafından ilk 24 saat süresince yara bölgesinde çoğalırlar. Reepitelizasyon prosesi yara oluşumundan birkaç saat sonra başlar. Keratinositler yara kenarlarından yara bölgesine göç ederler. Aktif fibroblastlar da yara bölgesine göç ederler ve makrofajlar, granülasyon dokusu ile birlikte oluşurlar. İyileşme prosesi için gerekli olan oksijen ve yapı maddelerinin geçişini sağlayan bir anjiyogenez de bu dokuda oluşmaktadır. Sonrasında bazı fibroblastlar miyofibroblastlara dönüşürler. Bu büzülebilir (kasılabilir) hücreler yara kenarları ile boşluk arasında köprü oluşturmaya yararlar [11].

Yara iyileşmesinde oluşan faz yapıları Şekil 2.3'te gösterilmektedir. Yaralanmadan sonra yara yüzeyinde kan pıhtılaşarak kabuk oluşturur. Makrofajlar ölü dokuları fagosite ederken yara kabuğunun altında epitel hücreleri hızla yayılır. Yeni damarların gelişmesi metabolik ihtiyaçları karşılamak için yara içinde gelişen fibroblastlara eşlik eder. Kolajen sentezi ve çapraz bağlanma, yeni gelişen damarların bütünlüğü ve dayanımından sorumludur [10]. Yara iyileşme prosesinin son aşaması granülasyon doku ve dermal rejenerasyonunun aşamalı involüsyonuna bağlıdır. Bu kombine olayların sonucunda zarar görmüş doku, orijinali gibi olmasa da uzun dönem fonksiyon sağlayan bir skar ile onarılacaktır [12].



Şekil 2.3 : Yara iyileşmesinde oluşan faz yapıları.

### 2.3 Yara İyileşmesinde Kullanılan Malzemeler

Yaraların tedavisinde kullanılmak üzere üretilen malzemeler doğal ya da sentetik polimerlerden oluşabilmektedir. Yara iyileştirilmesinde kullanılan doğal polimerler; ipek, kolajen, jelatin, hyaluronik asit (HA), selüloz, kitin ve kitosandır. Yara iyileştirilmesinde kullanılan sentetik polimerler ise; poli(vinil alkol), poli(kaprolakton), poli(laktat), poli(laktat-co-glikolat)' tır [13]. İpek böceklerinin kozalarından üretilen ipek, yüzyıllardır biyomateryal olarak kullanılmaktadır [14]. Kozalardan bütün serisin ekstrakte edilerek elde edilen ipek fibroin, yara örtüleri dahil bir çok biyomedikal uygulamada kullanılmaktadır [15].

Kolajen biyoyumlu ve biyobozunur bir doğal polimerdir ve hayvanların bağ dokusunda bol miktarda bulunmaktadır. Bir çok çalışmada yara iyileşmesi için kolajenden yararlanılmaktadır [13]. Jelatin, kolajenin hidrolize edilmiş halidir. Biyoyumluluğu, biyobozunurluğu ve düşük maliyeti nedeniyle yara tedavisinde sıkça kullanılmaktadır [16]. Hyaluronik asit (HA), ECM'de var olan protein bazlı doğal bir polimerdir. Biyoyumluluğu ve biyobozunurluğundan dolayı biyomedikal uygulamalarda yaygın şekilde kullanılmaktadır [14]. Fakat, HA fiberler suda kolayca bozunduğu veya çözündüğü için yara örtülerindeki kullanımı kısıtlıdır [18]. Selüloz, klinik uygulamalarda yara örtülerinde uzun süredir kullanılmakta olan biyobozunur olmayan doğal bir polimerdir [19]. Selüloz veya selüloz asetat (SA) ayrıca nanofibröz yara örtüleri geliştirilmesinde de kullanılmaktadır. Bunun sebebi çok ince fiberlerin antibakteriyel ajanlar için maksimum rahatlık ve mükemmel substrat özelliği göstermesidir [20]. Kitin, yengeç ve karides kabuklarından elde edilen doğal bir polimerdir. Kitosan ise kitinin N-deasetillenmiş halidir ve biyoyumluluğu, biyobozunurluğu ve antibakteriyal işlevlerinden dolayı yara örtüleri dahil birçok biyomedikal uygulamada kullanılmaktadır [21].

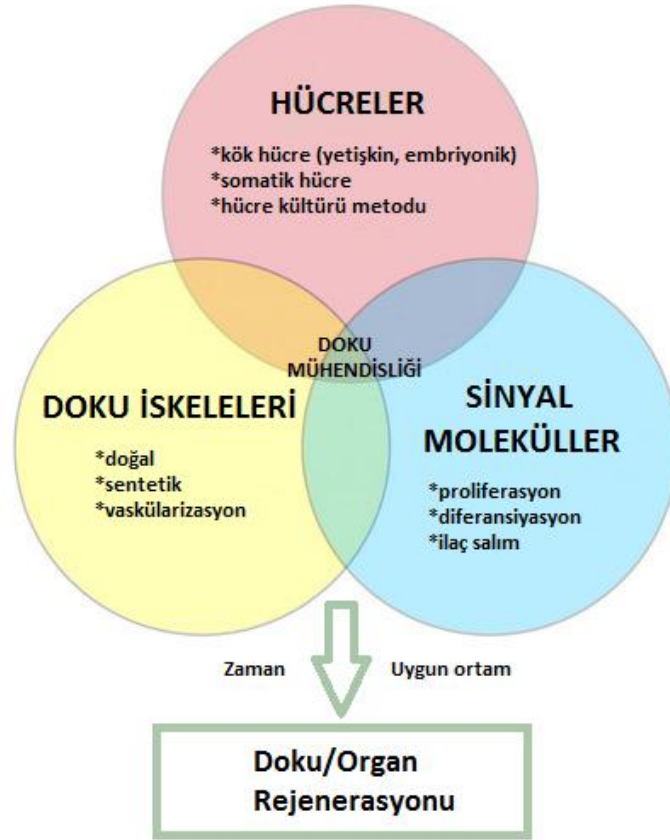
Doğal polimerlerin en büyük avantajlarından biri genelde yüksek derecede biyoyumlu olmaları ve hücre yapışması ve yayılmasını hızlandırmalarıdır. Fakat çoğu doğal polimer düşük sertlik ve mekanik kuvvete sahiptir. Bu yüzden genelde çapraz bağlanmaktadır ya da sentetik polimerlerle karıştırılmaktadırlar. Genelde sentetik polimerler doğal polimerlerden daha iyi mekanik kuvvete sahiptir ve yeni ürünlerin tasarımı ve yapımında araştırmacılara daha fazla esneklik sağlamaktadır. Fakat bu ürünlerde sitotoksisiteyi azaltmak her zaman sorundur [19].

## 2.4 Doku Mühendisliği

Yaralanma veya başka türde hasarla sonuçlanan organ ve doku kayıpları insan sağlığı için büyük bir problemdir. Doku ve organ nakli bu hastaları iyileştirmek için klasik bir tedavidir, ancak bu yöntem donör azlığından dolayı kısıtlıdır. Diğer mevcut tedaviler; cerrahi rekonstrüksiyon, ilaç tedavisi, sentetik protez ve medikal cihazlardan oluşmaktadır ve bunların tedariginde kısıtlamalar yoktur, ancak başka problemler mevcuttur. Örneğin, sentetik protezler ve medikal cihazlar hasar görmüş doku ve organın tüm fonksiyonlarını yerine getirememektedir. Bu problemler ve kısıtlamaları ortadan kaldırmak için gösterilen çabalar sonucunda yeni biyomateryaller ve alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerektiği kabul edilmiştir. Hastalık veya kazalar nedeniyle işlev göremez hale gelmiş doku ya da organın yerine yenisinin oluşturulması, canlı yaşamının normal bir biçimde devam etmesi açısından çok önemlidir. Günümüzde doku mühendisliği yaklaşımı ile doku onarımı ya da üretimi hedeflenmektedir [22].

Doku mühendisliği Langer ve Vacanti'nin de tanımladığı gibi “Doku fonksiyonunu yenileyen, devam ettiren veya geliştiren biyolojik maddelerin geliştirilmesi için mühendislik ve yaşam bilimlerinin prensiplerini uygulayan disiplinler arası bir araştırma alanıdır” [23]. Doku mühendisliği; mühendislik ve yaşam bilimlerinin prensipleri ve metodlarının uygulaması ile doku fonksiyonunu yenileyen, sürdüren ve geliştiren biyolojik yapıların gelişimini kapsayan ve birden çok bilim dalını ilgilendiren bir alandır. Doku mühendisliğinin amacı; organ nakli ve biyomateryal implantasyonuna dayalı klasik tedavilerin kısıtlamalarını aşmaktır [24].

1980 yıllarının ortalarından itibaren doku mühendisliği; hasarlı dokuları onaran, yerine koyan ya da yeniden oluşturan biyolojik yapıları geliştirmeyi amaçlayan ilgi çekici ve birden çok bilim dalını ilgilendiren bir alan olarak ilerlemeye devam etmektedir. Hücreler, doku iskeleleri ve büyüme uyarıcı sinyaller genellikle doku mühendisliğinin anahtar bileşenlerini oluşturan üçlü grup olarak ifade edilmektedir (Şekil 2.4). Bu tanıma göre doku mühendisliği için 4 yaklaşım mevcuttur. Birinci yaklaşım yeni dokunun oluşumu için yalnızca biyomalzeme kullanırken, “hücre nakli” olarak adlandırılan ikinci yaklaşım yalnızca hücreleri kullanarak tedaviyi gerçekleştirmeyi hedeflemektedir. Üçüncü yaklaşım, biyomalzeme ile biyosinyal moleküllerini kullanmaktadır. Üzerinde en çok çalışılan yaklaşım olan dördüncü yaklaşım ise; biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerinin üçünü bir arada kullanarak doku oluşturmayı hedeflemektedir. Genellikle polimerik biyomateryallerden yapılan doku iskeleleri hücre bağlanması ve bunu takiben doku gelişmesi için yapısal destek sağlamaktadır. Doku iskeleleri, hücrelerin organize olarak işlevsel bir dokuya dönüşebilmelerinde gerekli desteği sağlamaktadır [25].



Şekil 2.4 : Doku mühendisliğinin temel bileşenleri.

Doku mühendisliği; tedavi yöntemlerinin kısıtlamaları olmadan doku ve organ kaybı veya işlev bozukluğunu onarmak için alternatif bir yaklaşımdır. Doku mühendisliği; yeni doku veya organ oluşturmak için küçük bir biyopsiden geçici üç boyutlu doku iskeleleri kullanılarak hücrelerin ekilmesi ve yayılması işlemlerini kapsamaktadır. Hastanın kendi hücrelerinin kullanıldığı yaklaşım olan otogreft tekniğinin avantajları vardır [22]. Doku mühendisliği doku ve organları yeniden oluşturma potansiyeli olan yeni ve ilgi çekici bir tekniktir. Bir doku iskelesi üzerine insan hücrelerinin bağlanması ve ekilmesini sağlamaktadır. Bu hücreler daha sonra doku oluşturmak için ihtiyaç duyulan ECM bileşenleri salgımlarken sonrasında çoğalırlar, göç ederler ve spesifik dokulara farklılaşırlar [24].

Tamirin etkili bir sonuç vermediği ve yerine koymanın ise biyolojik işlevlerin yerine getirilmesinde yetersiz kaldığı durumlar için doku rejenerasyonu mümkün olan tek alternatif haline gelmiştir. Doku rejenerasyonu, hasar görmüş dokuyu tamamen taklit edebilecek yeni dokunun üretilmesiyle kaybolan yapı ve işlevlerin dokuya yeniden kazandırılmasını amaçlamaktadır. Doku mühendisliğinin çeşitli çok genel tanımları olması rağmen, doku mühendisliği uygun bölgeye hücrelerin, biyomoleküllerin ve/veya destekleyici yapıların iletilmesiyle vücudun kendi kendine iyileşmesini sağlamaktadır. Hücreler üzerine yapışabileceği ve işlevlerini gösterebileceği bir substrata ihtiyaç duymaktadırlar. Ancak bu materyaller hücrelerin normalde umduğu ECM yapısını çok az taklit ederler [27].

Kan hücrelerinin dışında tamamı olmasa da dokulardaki hücrelerin çoğu, bu hücreler arasında etkileşimi sağlayan ekstraselüler matriks (ECM) olarak adlandırılan solid bir matrikste bulunmaktadır. ECM; dokularda bulunan hücrelerin bağlanması, büyümesi, göç etmesi ve sinyalleri yanıtlaması için yapısal destek ve fiziksel ortam sağlamaktadır [26]. ECM; dokuya doku fonksiyonlarıyla ilişkili olan rijitlik ve elastiklik gibi yapısal ve mekanik özellikler vermektedir. ECM; hücre aktivitelerini düzenlemesi için hücrelere biyoaktif sinyaller göndermektedir. ECM; büyüme faktörlerinin kaynağı olarak rol oynayabilmektedir ve bunların biyoaktifliklerini etkin hale getirebilmektedir. ECM; sırasıyla morfojen, homeostaz ve yara iyileşmesi olarak adlandırılan doku dinamik prosesleri süresince gelişimsel, fizyolojik ve patolojik sorunlara cevaben neovaskülarizasyonu (yeniden damarlanma) ve yeniden yapılanmayı sağlamak amacıyla fiziksel bir ortam oluşturmaktadır [25].



Doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen doku iskelesi, hedef dokunun ECM'si olmalıdır. Ancak; çoklu fonksiyonlar, kompleks bileşim ve doğal dokulardaki ECM'nin dinamik yapısını tam olarak taklit etmeyi zorlaştırmaktadır. Bundan dolayı doku iskelelerindeki modern görüş; doğal ECM'nin fonksiyonlarını en azından kısmi olarak taklit etmesidir. Sonuç olarak, doğal dokulardaki ECM'nin fonksiyonlarına benzeyen ve mimari, biyolojik ve mekanik özellikleri ile ilişkili olan doku iskeleleri önemli rol oynamaktadır [25].

Doku mühendisliği genelde, hücre yayılmasını ve büyümesini destekleyen üç boyutlu doku iskelelerinin fabrikasyonunu içermektedir. Doku iskeleleri konak hücrelerinin çoğalması için destek sağlarken, kullanılacağı organa özel ECM bileşenlerini de depolamaktadır. Temel amaç, vücudun beraber çalışabileceği ve sonunda beklenen biyolojik aktiviteleri gerçekleştirebileceği yeni dokunun oluşturulmasıdır [28]. Doku mühendisliği sayesinde biyolojik olarak işlevini kaybetmiş konak dokunun, doku mühendisliği yaklaşımı ile tamir edilebilmesi ve işlevini sürdürebilmesinin sağlanabilmektedir [23]. Doku iskelesi tasarımı ana amacı, konak hücreleri çoğalıp yeni bir doğal matriks sentezleyene kadar doğal ECM ile yer değiştirebilecek ideal yapının üretilmesidir [29]. Bu yaklaşımda porlu üç boyutlu geçici doku iskeleleri, hücre fonksiyonunu harekete geçirmede ve yeni doku oluşumunu sağlamada önemli bir rol oynamaktadır. İzole edilen ve çoğaltılan hücreler geçici doku iskelesine yapışırlar, çoğalırlar ve biyobozunur doku iskelesiyle yerdeğiştiren kendi ekstraselüler matrikslerini salgırlar. Bu yaklaşımda doku iskelelerinin dizaynı ve fabrikasyonu önemlidir. İdeal olarak, doku iskeleleri birçok dizayn kriteri sağlamalıdır:

- 1) Yüzey hücre adhezyonuna izin vermeli, hücre büyümesini desteklemeli ve farklılaşmış hücre fonksiyonlarının devamına olanak sağlamalıdır.
- 2) Doku iskeleleri biyoyumlu olmalı, in vivo koşullarda polimer ve polimerin bozunma ürünleri inflamasyon veya toksisiteye neden olmamalıdır.
- 3) Doku iskelesi biyobozunur olmalı ve zamanla elimine edilebilmelidir.
- 4) Hücre adhezyonu, ECM rejenerasyonu ve hücre ekilmesi için porozitenin yeterli boşluğu sağlamak için uygun ölçülerde olması gerekmektedir.
- 5) Materyal üç boyutlu yapıda tekrarlı olarak üretilebilir ve mekanik olarak dayanımlı olmalıdır [22].

Doku iskeleleri; implantasyon üzerinde doku entegrasyonunu kolaylaştırmak amacıyla vaskülarizasyon, yeni doku oluşumu ve yeniden yapılanma için boş hacim sağlamalıdır. Doku iskeleleri; hücre aktivitelerini düzenlemek ve hızlandırmak için dokuların hücresel bileşenleriyle etkileşebilmektedir. Biyomateryaller; bağlanmayı arttırmak için hücre-adhezif ligandlar gibi biyolojik sinyaller veya hücre morfolojisi ve uyumunu etkilemek için topografi gibi fiziksel sinyaller içerebilmektedir. Doku iskelesi; rejenerasyonu hızlandıran büyüme faktörleri gibi büyümeyi uyarıcı sinyaller taşıyabilen taşıyıcı bir araç olarak da kullanılabilir. Doku iskeleleri hasar görmüş dokuya mekanik stabilite ve şekil kararlılığı sağlamaktadır [25].

Doku iskelesi yapımında kullanılacak olan matriks materyalinin bazı temel özelliklere sahip olması beklenmektedir. Bunlardan en önemlileri, katı faz biyoyumluluk ve hücre büyümesini ve adezyonunu destekleyici özellik göstermeleridir [32]. Biyoyumluluk, yüzey ve yapı biyoyumluluğu olmak üzere ikiye ayrılabilir, bu da materyal seçimi ve doku iskelesinin yapısı ile belirlenmektedir. Yüzey biyoyumluluğu, materyalin yüzey kimyası ile ilgilidir. Yapısal biyoyumluluk ise, doku iskelesinin fiziksel morfolojisinden etkilenmektedir [29]. Zamanla hücreler kendi doğal ECM'lerini ürettiklerinden, sentetik matriks vücuttan uzaklaştırılabilecek toksik olmayan kompozitlere bozunmalıdır. Bozunma ürünlerinin de toksik özellik göstermemesi de kullanılacak materyalde aranan başlıca özelliklerden biridir. Doku iskelesinin yapısı hücresel bazı gereksinimleri karşılayacak şekilde tasarlanmalıdır. Yüksek gözeneklilik hücre ekilmesi ve büyümesi için gereklidir. Ayrıca gözenekler, hücrelerin içe doğru yayılmasına, vaskülarizasyona ve besin difüzyonuna izin vermesi için birbiriyle bağlantılı olmalıdır. Bunun yanısıra kullanılacak materyalden istenilen bir diğer özellik de, implantasyon sırasında ve in vivo koşullarda dirençli olabilmesi için mekanik stabiliteye sahip olmasıdır [32].

Doku iskelelerinin üretiminde önemli olan birçok koşul tanımlanmıştır. Doku iskelesi; doku entegrasyonu ve vaskülerizasyonunu sağlamak için uygun boyutlarda birbirine bağlı porlara sahip olmalı, dokunun zamanla doku iskelesinin yerine geçebilmesi için biyobozunurluğu kontrol edilebilen materyalden yapılmalı, hücre bağlanması, farklılaşması ve çoğalmasını sağlamak için uygun yüzey kimyasına sahip olmalı, implantasyon ve işlemede istenen koşulları sağlaması açısından yeterli mekanik özelliğe sahip olmalıdır, olumsuz bir yanıtı neden olmamalı, çeşitli şekillerde ve boyutlarda kolayca üretilebilmelidir [24]. İdeal bir doku iskelesi mekanik olarak stabil olmalıdır ve aynı zamanda implant edildiği bölgede biyolojik işlevini gerçekleştirebilmelidir [30]. Mekanik stabilite, biyomateryal seçimine ve doku iskelesinin dizaynına bağlıdır [31].

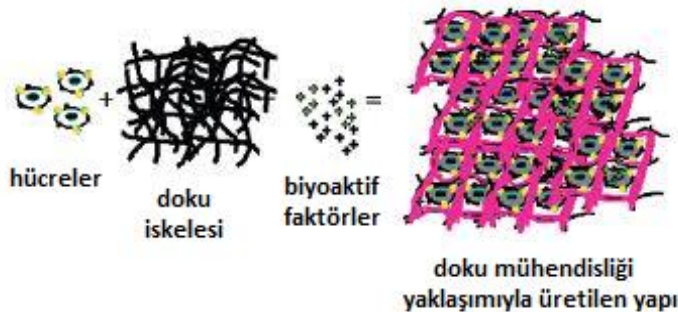
Polimer materyaller; biyobozunurluğu ve işlenebilirliği kolay kontrol edilebildiğinden dolayı doku mühendisliği uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Sentetik polimerler ve doğal polimerler olmak üzere iki çeşit polimer materyal vardır [22]. Sentetik ve doğal polimerler ilgi çekici bir alternatiftir ve doku çoğalması uygulamaları için kullanılan çok amaçlı materyallerdir [24]. Çizelge 2.1’de doku mühendisliğinde kullanılan doğal ve sentetik polimerler verilmiştir. Başlıca biyobozunur sentetik polimerler; polyester, polianhidrit, poliortoester, polikaprolakton, polikarbonat ve polifumarattır. Poli(glikolik asit) (PGA), poli(laktik asit) (PLA), ve bunların kopolimerleri olan poli[laktik-ko-(glikolik asit)] (PLGA) gibi polyesterler doku mühendisliğinde en çok kullanılan polimerlerdir. Bu polimerler Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından klinik uygulamalar için onaylı polimerlerdir [22].

**Çizelge 2.1 :** Doku mühendisliğinde sıkça kullanılan materyaller.

Doğal polimerler	Sentetik polimerler
İpek	Poli(anhidritler)
Jelatin	Poli(ortoesterler)
Fibrin	Poli( $\epsilon$ -kaprolakton)
Poli(hidroksibütarat)	Poli(propilen fumarat)
Kolajen (ECM bileşeni)	Polyesterler; PLA ve PGA
Polisakkaritler; hiyalüronik asit, kitosan, nişasta, aljinat	

## 2.5 Deri Doku Mühendisliği

Deri birçok farklı hücre tipinden oluşmaktadır. Keratinositler epidermisteki en genel hücre tipidir ve yüzey bariyer katmanı oluşturmaktadır. Melanositler epidermisin alt katmanlarında bulunur ve deriye rengini verir. Fibroblastlar daha alttaki dermal tabakayı oluşturularak dayanım ve esneklik sağlarlar. Doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen deri; laboratuvar ortamında deri hücrelerinin çoğaltılması ile oluşturulur ve bariyer fonksiyonunu geri kazandırmak (yanık dokularda) veya yara iyileşmesini başlatmak (kronik iyileşemeyen ülserlerde) için kullanılır. Ayrıca yara iyileşmesini hızlandırmak, yüzeysel yanıklarda acıyı azaltmak ve iyileşmenin yetersiz kaldığı durumlarda da kullanılmaktadır. Doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen materyallerin gelişimindeki en önemli üç faktör: hastanın güvenliği, klinik etkinlik ile kullanım kolaylığıdır. Laboratuvar ortamında yetiştirilmiş her hücre materyali virüs ya da bakteriyel enfeksiyon bulaştırma riski taşımaktadır ve bazı yardımcı materyaller (sığır kolajeni ve murin besleyici hücreler gibi) de hastalık riski taşımaktadır. Şekil 2.5'te doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen yapı gösterilmektedir. Doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen materyallerin hastanın yararına olduğuna dair kesin bir kanıtı ihtiyaç vardır. Bu materyallerin iyileştirmede etkili ve normal derinin fiziksel özelliklerine sahip olması gerekli karakteristiklerdir. Etkin bir iyileşme sağlayabilmek için, doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen ürünler yara yatağına iyi bir şekilde bağlanmalı, yeni damarlar tarafından desteklenmeli, immün sistem tarafından reddedilmemeli ve bir hastanın yaşamı süresince kendiliğinden iyileşmeyi sağlamalıdır. Sonuç olarak, materyaller kullanıma uygun olmalıdır aksi takdirde klinik alımlarda başarısız olacaktır [33].



Şekil 2.5 : Doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen yapı.

Derinin bariyer işlevi yara, yanık veya kronik ülserler nedeniyle yitirildiğinde, hastalar bakteriyel enfeksiyon riskiyle karşılaşabilmektedir. Deri kaybının geniş olduğu yara veya yanıklarda bakteriyel enfeksiyon ölümcül olabilmektedir. Epidermal tabakanın tamamen zarar gördüğü fakat dermisin bir kısmını kaldığı kısmi kalınlıktaki yanıklarda, dermal kalıntıları hızlı bir şekilde dermisin dışına göç ederek yeni bir epitelyum oluştururlar. Fakat, eğer epidermis ve dermisin tamamı zarar görmüşse bu büyük bir problemdir. Bu türdeki tam kalınlıklı deri kayıpları cerrahi müdahale olmadan iyileşmemektedir. Eğer yara veya yanık genişliği çok büyük değilse, vücudun başka bölgesinden kısmi-kalınlıkta deri grefti (epidermal tabakanın hepsi ve dermal tabakanın bir kısmı) alınarak, bu deri grefti yaralı bölgenin kapatılmasında kullanılmaktadır. Deri greftinin alındığı bölge dermisin içinden yukarıya göç eden ve yayılan keratinositlerle iyileşmektedir. Fakat eğer yara veya yanık çok büyük ise, bu klasik tedaviler yetersiz kalmaktadır [7].

Günümüzde sağlık alanında en önemli ve maliyetli problem doku ve organ kayıplarıdır. Hastaların hayatını kurtarmak için doku/organ nakli yapılmaktadır. Otogreft tekniğinde, doku veya organ aynı hastanın vücudundan alınırken, allograft tekniğinde başka bir kişiden veya kadavradan alınır. Çok sınırlı durumlar için, hastalar transplantasyon edilecek uygun otogreftte sahiptir. Allogreftler için doku ve organ talebi tedarik çok üzerindedir ayrıca immün sistem yabancı doku veya organları reddetmektedir. Bu nedenle, doku ve organ oluşturmayı amaçlayan doku mühendisliği ve rejeneratif tıp yaklaşımına önemli derecede ihtiyaç vardır. Doku mühendisliği yaklaşımında hücreler biyobozunur matriks veya doku iskelesi üzerine ekilmektedir. Matriks/doku iskelesi hedef dokuya yeterli üç boyutlu yapıyı sağlamaktadır. Hücreler çoğalıp başkalaştığında ve ECM ürettiklerinde, matriks/doku iskelesi degrades olur ve bu prosesler fonksiyonel dokuların oluşumuyla sonuçlanabilmektedir. Rejeneratif tıp yaklaşımı, doku mühendisliği ile aynı prensipleri içerir fakat daha çok kök hücrelerin kullanımı üzerinde durmaktadır [35].

Otogreft ve allogreft tekniklerinin kısıtlamaları ve yara örtülerine olan büyük ihtiyaçtan dolayı doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen deri, hasar görmüş deriyi onarmak için klinisyenlere yeni alternatifler sunmaktadır. Doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen bu deri greftini ilk kez Rheinwald ve Green deriden izole ettikleri keratinositleri kültürleyerek iki ya da üç hücre katmanı kalınlığında küçük tabakalar haline getirerek belgelemişlerdir. Kültürlenmiş deri hücrelerinin kendini yenileme yeteneğini hastaya ömür boyu kazandırdığı ispatlanmıştır. Ancak küçük tabakalar halindeki keratinositleri yerleştirmek problemlidir. Tabakalar kırılığandır ve yeni bir epitelyum oluşturmada aktif rol oynayan keratinositlerin birçoğu farklılaşmaktadırlar. Bu nedenle, Genzyme firması bu teknolojiyle yaşayan epitelyal tabakalar üreterek 1987'den bu yana EpiCel® adı altında piyasaya sürmektedir. Bu tabakalar, derin kısmi kalınlıklı ve tam kalınlıklı yanıklarda geçici kullanımlar için dizayn edilmiştir. Çünkü kültürlenmiş keratinositler tam kalınlıklı deri kayıplarını, iyi damarlaşabilen dermal yara yatağı olmadan iyileştirmede yetersizdir. Geliştirilmiş doku bilimlerinde, dermal fibroblastlar yüklenmiş ve keratinosit tabakasıyla kaplanmış Apligraf® ve Dermagraft® gibi bir doku iskelesi dizayn edilmiştir. Bazı yeni görüşler büyük yanıkların tedavisinde hücre (hücre içermeyen) dermal materyaller dizaynı yönündeydi. Integra®; sığır kolajeni ile glikozaminoglikan içeren dermal bir materyaldir ve geçici bir epidermal katmanı sağlaması açısından bu materyalin üst yüzeyi silikon membran ile kaplanır. Bu ürünler dizayn ve kompozisyona bağlı olarak geçici yara örtüsü veya deri yerine geçen kalıcı materyal olarak kullanılabilir [34].

Deri yerine kullanılan dermo-epidermal veya kompozit materyaller; epidermal ve dermal katmanların bulunduğu normal derinin histolojik yapısını taklit etmeyi amaçlamaktadır. Bu benzerlik aynı zamanda normal deriyle bazı fonksiyonel benzerlik de sağlamaktadır. Bu materyaller epidermal ve dermal materyallerle kıyaslandığında en gelişmiş ve komplike ürünler olmanın yanısıra doku tamirinde kullanılan en pahalı biyolojik yapılarıdır. Bu biyomateriyaller; biyolojik olarak aktif yara örtüleridir ve yara iyileşmesini başlatıp düzenlerken konak hücre için büyüme faktörleri, sitokinler ve ECM de sağlamaktadırlar. Derinin yerine kullanılan ürünlerin birçok farklı sınıflandırması mevcuttur ve bu sınıflandırma aşağıda belirtildiği gibi özetlenebilir:

(i) Anatomik yapıya göre:

- Dermo-epidermal (kompozit),
- Epidermal,
- Dermal.

(ii) Örtünün kullanım süresine göre:

- Kalıcı,
- Yarı-kalıcı,
- Geçici.

(iii) Biyomateryalin türüne göre:

- Biyolojik: otolog, allojenik, ksenogenik,
- Sentetik: biyobozunur, biyobozunur olmayan.

(iv) Hücresel bileşene göre:

- Hücreli (hücre içeren),
- Hücresiz (hücre içermeyen) [5].

Klinik uygulamaların ticarileştirilebilmesi için, güvenilir hücre kaynağı ve izolasyonu yöntemleri doku mühendisliği ve rejeneratif tıp yaklaşımlarında yeterli miktarda hücre sağlanmasında kritik bir rol oynamaktadır. Rheinwald ve Green ilk olarak; derinin küçük bir biyopsisinden epidermal keratinositlerin izolasyon ve kültürünü ve de tek hücreden koloniler oluşumunu bildirdiler, sonrasında epidermal büyüme faktörü (EGF) varlığında hücre büyümesinin daha etkin bir şekilde oluştuğunu buldular. Rheinwald ve Green'in bu çalışması, deri yerine kullanılan materyaller için yeterli keratinosit (büyük ölçeklerde) elde edilmesi metodunu sunmuştur [35].

**Çizelge 2.2 :** Doku mühendisliğinde kullanılan biyomateryallerin ticari isimleri.

Epidermal Örtüler	Dermal Örtüler	Epidermal/Dermal Örtüler
Epicel Epidex	Integra Alloderm TransCyte Dermagraft	Apligraf (Graftskin) Orcel

Yanık ve deri ülserleri tedavisi için deri doku mühendisliğinde kullanılan biyomateryaller Çizelge 2.2’de verilmiştir. Doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen materyaller; kültürlenmiş epitelyal otogreftler (Epicel®), hücre içermeyen dermal materyaller (Integra®, Alloderm®), hücre nüfuslu yara örtüleri (TransCyte®), hücre içeren dermal materyaller (Dermagraft®) ve deri yerine geçen çift tabakalı materyaller (Apligraf®, OrCel®) şeklinde piyasada bulunmaktadır. Bu ürünler tedavi edici tıp alanına yeni bir ilerleme getirmiştir ve yanıklar, kronik deri ülserleri ve diğer dermatolojik durumların tedavisinde de büyük bir umut vermektedir. Bu materyallerin en önemli fonksiyonu; sıvı kaybı ve mikrobiyal kontaminasyona karşı bir bariyer oluşturmasıdır. Geniş ve derin yaralarda; kalıcı bir yara kapanması için genellikle otolog hücrelere ihtiyaç duyulmaktadır. Deri yerine kullanılan otolog deri, kalıcı yara kapanmasında başarılı olmaktadır. Epicel; kültürlenmiş epidermal otogreftlerden elde edilen bir üründür. Epitelyal otogreftlerin en büyük dezavantajı; mekanik olarak stabil olmamasıdır. Integra; otogreft tekniğinin yetersiz kaldığı durumlarda ve geniş çaplı yanıkların tedavisinde sıkça kullanılan bir üründür. Rekonstrüktif cerrahide Integra kullanımının dezavantajları; iki operasyon gerektirmesi ve silikon tabaka altında oluşabilecek enfeksiyon riskidir. Buna karşın Integra’nın avantajları; büyük miktarlarda bulunabilirliği, tekniğin kolaylığı ve güvenilirliği ve de kozmetik görünüşü ile esnekliğidir. Alloderm; dermal dokunun yeniden yapılandırılmasında matriks görevi gören Integra’ya benzer bir üründür. TransCyte; transparan olduğu için yara yatağını görüntüleme avantajı sunmaktadır. Dermagraft; TransCyte gibi yenidoğan insan fibroblastlarından hazırlanır fakat bu ürünlerde hücrelerin yaşayabilmesini sürdürmesi açısından fibroblastlar dondurularak muhafaza edilir. Dermagraft; tam kalınlıklı yaraların (ayak ülserleri) tedavisinde kullanılan bir üründür. Apligraf; bir dermis ve bir epidermisten oluşan çift katmanlı canlı yapılardır. Özellikle diyabetik ayak ülserlerinin tedavisinde yara iyileşmesini hızlandırmada ve yaranın kapanması için gereken sürenin azalmasında etkilidir. OrCel; Apligraf ile benzer yapıda olup kısmi kalınlıklı yaralar için dizayn edilmiştir [34].



Keratinositler ve daha önemlisi kök hücreler için hücrelerin çoğalması ve uygun bir biçimde farklılaşması gerekmektedir; bunu başarmak için biyolojik büyüme faktörleri kullanılmaktadır. Büyüme faktörleri kolajen sentezini hızlandırır; yara epitelizasyonu artırır; hücre proliferasyonunu arttırarak neovaskülarizasyonu hızlandırır. Trombosit kaynaklı yara iyileştirme faktörünün (PDWHF) hastalara topikal olarak uygulanması sonucunda, kronik ve kendiliğinden iyileşmesi zor olan yaraların daha kısa sürede iyileştiği görülmüştür. Büyüme faktörleri, çok az miktarlarda dahi hücresel aktiviteleri etkileyebilen proteinlerdir. Deneyler trombosit kaynaklı büyüme faktörünün (PDGF) normal iyileşme prosesini hızlandırdığını ve yara iyileşmesi için gerekli genleri düzenlediğini göstermiştir. Hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarmak için diğer bir yaklaşım; in vitro hücre kültürü biyoreaktörleri ile biyokimyasal ve mekanik sinyaller yollayarak doku gelişimini düzenlemektir. Biyoreaktörler başlıca üç bileşenden oluşmaktadır: farklılaşmış hücre fenotipini ifade eden ve ECM üreten metabolik olarak aktif hücreler, hücre bağlanması ve doku büyümesi için üç boyutlu yapısal destek sağlayan polimerik doku iskeleleri, hücre-polimer kompleksinin dokuda gelişebildiği in vivo koşulları taklit eden bir ortam. Doku iskelesi materyali seçimi de önemli bir rol oynamaktadır. Biyolojik türevli doğal makromoleküllere; tip I kolajen, glikozaminoglikan ve kitosan örnek olarak verilebilir. En sık kullanılan sentetik polimerler de laktid, glikolid ve  $\epsilon$ -kaprolakton kaynaklı alifatik polyesterlerdir. Doku iskelesi materyali olarak hidrojellerin kullanımı doku mühendisliğindeki bir diğer gelişmedir. Hidrojeller çeşitli doğal makromoleküller kullanılarak yapılmaktadır: agaroz, aljinat, kitosan, kolajen, hiyalüronik asit, fibrin. Bu hidrojeller yüksek su içeriğine sahiptir ve birçok dokuda ECM'e yapısal benzerlik göstermektedir [35].

Dođal polimerlerde dūřuk mekanik kuvvet, būzölme, kullanım zorluđu, immunolojik olarak red riski gibi bir çok problem bulunmaktadır. Sentetik polimer ya da dođal polimerlerle birlikte sentetik polimer kullanımı, daha yūksek mekanik özellikler ve fabrikasyondaki esneklik nedeniyle daha çok tercih edilir hale gelmiřtir. Birçok sentetik polimer deri doku mūhendisliđi materyallerinde kullanılmaktadır. Fakat, sentetik polimerler kısıtlı biyolojik sinyallerinden dolayı genelde dūřuk hūcre yapıřması ve yayılması gōsterdikleri için klinik bařarıları kısıtlıdır. Bir ya da iki farklı polimerin kombinasyonu, iki materyallerinde avantaj ve dezavantajları dengelendiđinde deri rejenerasyonu için uygun doku iskeleleri üretilmesi için gereklidir [3].

## **2.6 Doku Mūhendisliđinde Kullanılan Polimerler**

Dođal olan birçok doku iskeleleri doku mūhendisliđi uygulamalarında biyomateryal olarak kullanılmaktadır. ECM bunlardan biridir. ECM, hūcre iřlevini kontrol eden oldukça kompleks bir biyomateryaldir ve ECM'nin özel iřlevlerini taklit edebilmek için dođal ve sentetik doku iskeleleri dizayn edilmektedir. Aljinat, proteinler, kolajen, jelatin, fibrinler, albumin, gluten, elastin, fibroin, hyarulonik asit, selūloz, niřasta, kitosan, pektin (pektinik asit), galaktan, kurdlan, gellan, levan, emulsan, dekstran, pullulan, heparin, ipek, kondroitin 6-sūlfat, polihidroksialkonoatlar doku mūhendisliđinde kullanılan dođal polimerlerdir. Bu dođal polimerlere gōsterilen ilgi, biyoyumluluklarından, bolluklarından, ticari olarak uygunluklarından ve üretim kolaylıklarından gelmektedir [36].

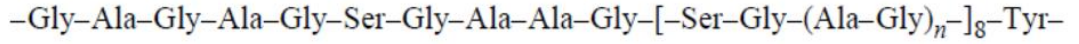
Doğal polimerler pahalılıklarından, alındıkları yerlere göre değişkenlik göstermelerinden ve istenmeyen hastalıklar ve bilinmeyen virüslerden çapraz kontaminsayona duyarlı olmalarından dolayı sıkıntılıdır. Aksine, sentetik polimerik biyomateryallerin fizyokimyasal özellikleri kolayca kontrol edilebilmekte ve immunojenite göstermemektedirler. Ayrıca çeşitli tekniklerle işleme tabi tutulabilirler ve sürekli olarak büyük miktarlarda tedarik edilebilirler. Doku iskelelerinin fiziksel ve mekaniksel özelliklerinin insan vücudunda istenilen yerde ayarlanabilmesi için, sentetik proses sırasında moleküler yapı ve moleküler ağırlık kolayca ayarlanmaktadır. Sentetik polimerler genel şekilde iki gruba ayrılmaktadır: biyobozunur sentetik polimerler ve biyobozunur olmayan sentetik polimerler. Poli(vinilalkol) (PVA), poli(N- izopropilakrilamid) ve poli(hidroksimetakrilat) bazı biyobozunur olmayan sentetik polimerlerdir. Poliglikolat (PGA), polilaktat (PLA), onun kopolimeri poli(laktat-ko-glikolat) (PLGA) gibi poli(-hidroksi esterler), polifosfozen, polianhidrit, poli (propilen fumarat), poli(siyanoakrilat), poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL), polidioksan (PDO), ve biyobozunur poliüretanlar sentetik biyobozunur polimerlere örnektir. Bu iki tip sentetik polimerlerden, sentetik biyobozunur polimerler, doku iskeleleri üretiminde kullanılmak için tercih edilmektedir çünkü, yabancı doku cevabını minimize ederler ve doğal dokunun tamamen oluşmasını sağlarlar. Yani mekanik ve biyokimyasal destek için geçici bir yapı sağlamaktadırlar [36].

## 2.7 İpeğin Yapısı ve Doku Mühendisliği Uygulamaları

İpekböceğinden üretilen ipek lifleri günlük hayatta yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Tekstil endüstrisinde binlerce yıldır önemli bir yere sahipken, biyomateryal olarak sadece geçtiğimiz on yıl boyunca tanınmakta ve geliştirilmektedir. Biyoyumlu olmasının yanısıra toksik ve immunojenik olmayan ipek fibroininin bu özellikleri ipek gibi proteinlerin biyomedikal amaçlı kullanılmasına imkan tanımaktadır. İpek fibroini bugüne dek çoğunlukla yara iyileşmesinde kullanılan materyaller, başarıyla uygulanan yapay kan damarları, ameliyat iplikleri ve onarım materyalleri olarak kullanılmıştır. İpek fiberler ve proteinler için geliştirilen yeni işleme teknikleri bu moleküllerin biyomedikal alanda kullanımını yaygınlaştırmıştır. İpek matrisinin özellikleri; enzimlerin aktivitesi ve stabilitesini doğrudan etkileyen kimya ve eğirme işleminin kombinasyonu ile kontrol edilir. Sıcaklık, tel çekme hızı, zaman gibi eğirme şartları ve ipekböceğinin spesifik türü biyomateryalin özelliklerini değiştirmektedir. Buna ek olarak; iyon konsantrasyonu, iyon türü ve çözelti pH'ı gibi kimyasal yapı da ipek fibroinin mekanik özelliklerini etkilemektedir [37]. Biyomateryal olarak ipek fibroin; mükemmel biyoyumluluk, uyarlanabilir biyobozunurluk ve iyi oksijen/su geçirgenliği gibi özelliklere sahiptir [38].

İpek fibroin; keratin ve kollajen gibi fibril proteinlerden oluşmaktadır. İpek liflerinin çok moleküllü yapısının elementleri 90-170 nm çapında sarmal şekilde paketlenmiş nanofibriller içeren  $6.5 \cdot 10^5$  nm boyutlu makrofibrillerdir. Nanofibriller, ipeğe dayanımı artırıcı özellik kazandırmada önemli bir rol oynamaktadırlar. Doğal ipek fibroinin makro zincirinin uzunluğu 150 nm ve çapı 0.45 nm olmak üzere molekül ağırlığı 370000 Daltona kadar ulaşabilmektedir. *Bombyx mori* ipekböceğinden üretilen ipek lifleri; fibroin ve serisin olmak üzere başlıca iki protein içermektedir. Buna ek olarak, az miktarda diğer aminoasitlerin grupları ile yağ, vaks, boya ve mineral tuzlar gibi çeşitli empüriteleri de içermektedirler [39].

Kozanın türüne bağlı olarak; fibroin içeriği ağırlıkça % 66.5-73.5 ve serisin de % 26.5-33.5 olabilmektedir. Kimyasal kompozisyon olarak ise, Bombyx mori lifleri fibroinin çok moleküllü yapısının değişik bölgeleri arasında oranı çeşitlilik gösteren en az 16 aminoasit grubundan meydana gelmektedir. Bombyx mori fibroininin aminoasit bileşimi Çizelge 2.3'te gösterilmektedir. Molekül ağırlığı 350000-370000 Da olan polimerin sert kısmı çoğunlukla yüksek derecede düzenli hidrofobik makromoleküllerden oluşmaktadır ve yaklaşık 25000 Da molekül ağırlığındaki daha gevşek yapıdaki yumuşak kısmının ana bileşenleri polar aminoasit gruplarıdır. Glisin, alanin, serin ve tirozin kombine gruplarının mol oranı % 90'dır ve bu grupların dizilimi aşağıdaki genel formülle gösterilmektedir [39]:

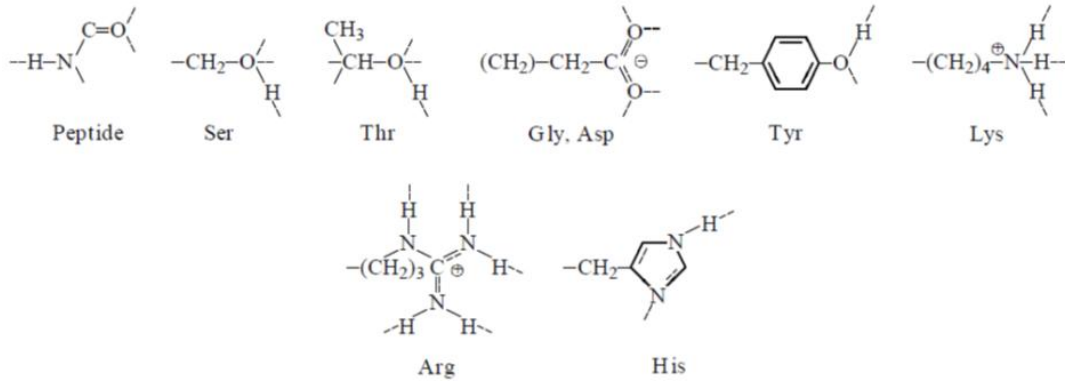


**Şekil 2.6 :** Glisin, alanin, serin ve tirozin gruplarının dizilişinin genel formülü.

**Çizelge 2.3 :** Bombyx mori ipek fibroininin aminoasit bileşimi.

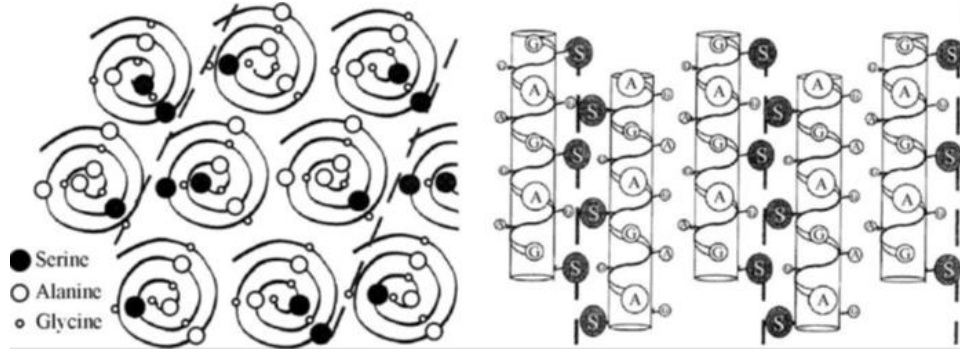
Aminoasit	Kompozisyon, mol (%)		
	Toplam	Sert Kısımlar	Yumuşak Kısımlar
Glisin	42.9	49.4	10.0
Alanin	30.0	29.8	16.9
Serin	12.2	11.3	7.9
Tirosin	4.8	4.6	3.4
Valin	2.5	2.0	7.4
Aspartik asit	1.9	0.65	15.4
Glutamik asit	1.4	0.70	8.4
Treonin	0.92	0.45	2.8
Fenilalanin	0.67	0.39	2.7
Metionin	0.37	-	0.37
İzolesin	0.64	0.14	7.3
Lesin	0.55	0.09	7.2
Prolin	0.45	0.31	3.0
Arginin	0.51	0.18	3.8
Histidin	0.19	0.09	1.6
Lisin	0.38	0.06	1.5

Fibroin makromoleküllerinin yan grupları; apolar hidrofobik alifatik hidrokarbon (alanin, lösin, izolesin, valin, prolin) ve aromatik (fenilalanin) yan grupları, polar hidrofilik hidroksil içeren serin, treonin ve tirozin grupları, aspartik asit ve glutamik asitin karboksil grupları, lisinin amino grupları ve arginin guanidin gruplarıdır. Fibroinin ikincil yapısı çeşitli etkileşimlerle stabilize edilmektedir. Hidrojen bağları, peptit makrozincirinin fonksiyonel grupları ve makromoleküllerin yan kısımları arasında oluşmaktadır. Ipek fibroininin makromoleküllerinin yan grupları Şekil 2.7'de gösterilmektedir [39]:

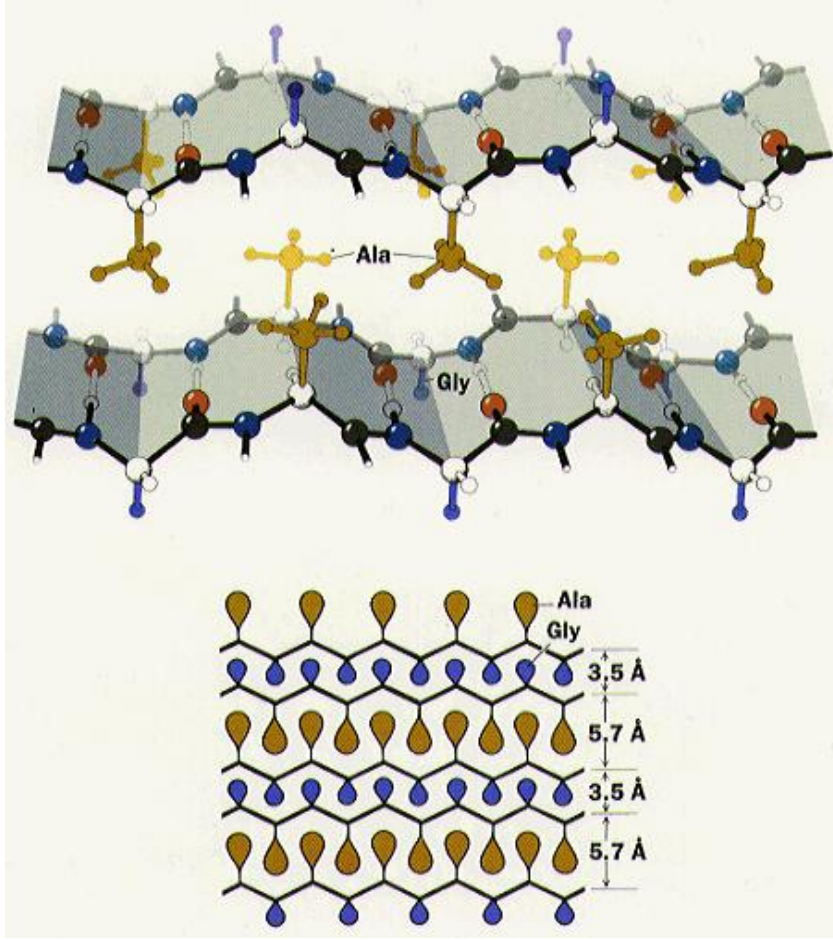


**Şekil 2.7 :** Fibroin makromoleküllerinin yan grupları.

Doğal ipek fibroininin ikincil yapısı üç temel çeşite ayrılmaktadır: kristalin kısımlarda,  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -düzlemsel tabaka yapıları (sırasıyla ipek I ve ipek II) ile amorf kısımlarda gelişigüzel dağılmış moleküllerin düzensiz konformasyonu bulunmaktadır. İpekböceğinin salgularından sentezlenen sıvı ipek, hacimce % 26'lık makromoleküllerinin küre konformasyonuna ya da  $\alpha$ -heliks yapısına sahip fibroinin sulu çözeltisidir. Doğal Bombyx mori liflerindeki fibroin;  $\beta$ -düzlemsel tabaka formunda %  $56\pm 5$  ve  $\alpha$ -heliks formunda ise %  $13\pm 5$  oranında makromoleküller içermektedir. Bu nedenle, polimerin yüksek derecede düzenli (kristalin) bölgelerinin oranı % 60-70'e kadar ulaşmaktadır. İpek fibroini ikincil protein yapısındadır. İkincil yapıdaki proteinler için; gelişigüzel sarmal,  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -konformasyonu olmak üzere üç değişik yapı tanımlanmaktadır. Şekil 2.8 ve Şekil 2.9 ipek fibroinin  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -düzlemsel tabaka yapılarını göstermektedir.  $\alpha$ -heliks yapısı, hidrojen bağları tarafından oluşturulur.  $\beta$ -konformasyonunda, makromoleküller bir katlı tabaka veya katman oluşturacak biçimde birbirine paralel veya antiparalel şekilde bağlanmaktadır. İpek fibroinin antiparalel  $\beta$ -düzlemsel tabakalar yüz yüze ve arka arkaya şeklinde paketlenmektedir: glisin gruplarının çift katmanı (düzlemlerarası aralığı  $3.5 \text{ \AA}$ ) -alanin/serin gruplarının çift katmanı (düzlemlerarası aralığı  $5.7 \text{ \AA}$ )-glisin gruplarının çift katmanı, vs. Makromoleküllerin hidrofobik kısımları için bu yapı en avantajlı durumdadır [39].



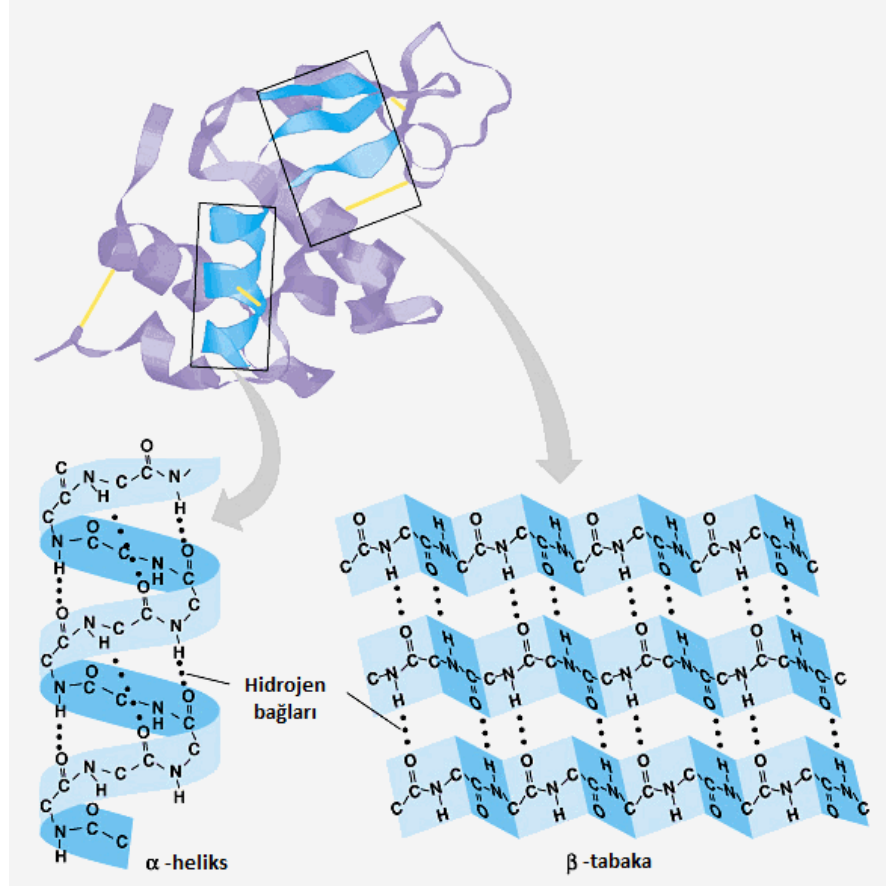
Şekil 2.8 : Fibroin makromoleküllerinin  $\alpha$ -heliks yapısı.



Şekil 2.9 : Fibroinin  $\beta$ -konformasyonu ( $\beta$ -düzlemsel tabaka).

İpek fibroinin aminoasit bileşimi başlıca glisin, alanin ve serinden oluşmaktadır. Hacimli ve polar aminoasit yan zincirleri amorf bölgeleri oluştururken, bu üç temel aminoasit ipek fibroinin kristalin bölgelerini oluşturmaktadır. İpeğin polimorfları; ipek I, ipek II ve ipek III olarak bilinmektedir (Şekil 2.10). İpek II'nin moleküler konformasyonu antiparalel  $\beta$ -konformasyonudur [40]. İpek fibroinin düzensiz formdan  $\beta$ -konformasyonuna dönüşümü; polar çözücülere daldırma, ısıtma gibi işlemlerle sağlanabilmektedir. Bu dönüşüm ipek fibroini biyomateryal olarak daha etkin kılmaktadır. Çünkü; ipek fibroinin  $\beta$ -düzlemsel tabaka yapısı suda kararlıdır ve daha iyi mekanik özelliklere sahiptir [41]. İpek fibroinin yapısal kararlılığı ve mekanik özelliklerini geliştirmek için kimyasal muamele sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak kimyasal muameleden sonra ipek fibroini içerdiği yüksek  $\beta$ -düzlemsel tabaka ve kristalizasyondan dolayı kırılğan bir materyal haline gelmektedir [42].





**Şekil 2.10** : İpek fibroinin  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -konformasyonu.

Etkili hücre uyumluluğu ile işlenebilirliği; deri, kemik, kan damarı, ligament ve sinir doku rejenerasyonunda kullanılan doku iskeleleri için ipek fibroinini popüler bir başlangıç materyali yapmaktadır. İdeal bir doku iskelesi; immunojen ve toksik değildir. Ayrıca biyoyuymuludur ve hücre yapışması, çoğalması ile farklılaşmasını desteklemektedir. Özellikle bu materyal, in vivo koşullarda biyobozunur olmalı ve bozunma ürünleri de toksik olmamalı ve vücuttan kolaylıkla atılabilmelidir. Doku mühendisliğinde kullanılan doku iskeleleri, doku büyüme hızına uygun bir oranda bozunmalıdır. Son yıllarda doku mühendisliğinde biyomateryal uygulamaları için bozunmanın önemine bağlı olarak, ipek fibroin materyallerinin bozunma davranışı üzerinde çalışılmaktadır. Bozunma hızı ve derecesi, doku iskelesinin özelliklerine bağlı olarak bir seri faktöre, proses koşullarına, implantasyon bölgesinin kimyasal ve biyokimyasal çevresine bağlı olarak büyük oranda değişkenlik gösterebilmektedir. Bu sonuçlar, ipek fibroin biyomateryallerinin biyobozunur olduğunu ve bozunma davranışlarının ayarlanabildiğini ispatlamaktadır [40].

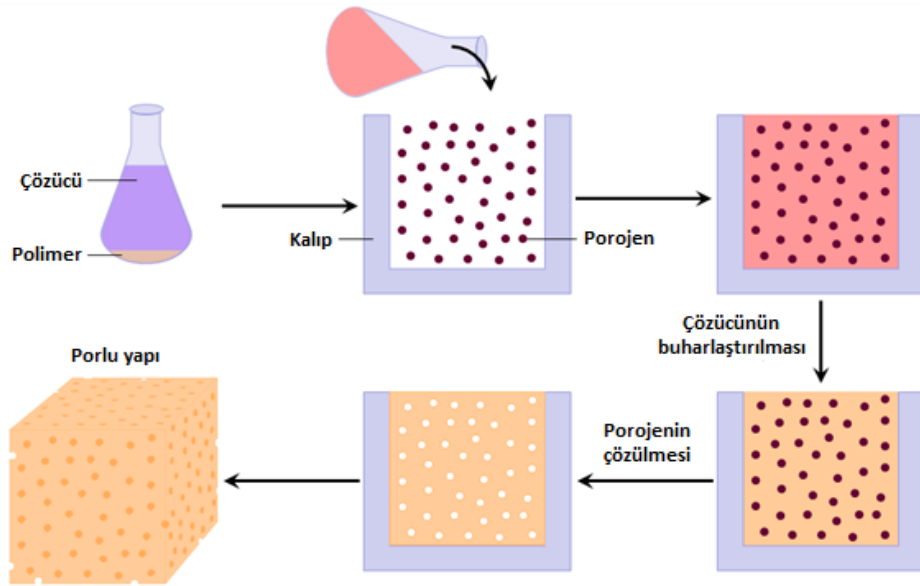
## 2.8 Doku İskelesi Fabrikasyon Teknikleri

Polimerik doku iskelelerinin; yüksek porozite ve yüzey alanı, yapısal kuvvet ve üç boyutlu şekiller gibi önemli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Doku iskelesi fabrikasyon tekniği ile bu özellikler doğrudan ilişkilidir. Doku iskelesi fabrikasyon teknikleri, doku mühendisliği gereksinimlerini karşılayabilecek doku iskeleleri üretmek için tasarlanmıştır. Doku iskelesinin görevi; doku iskelesi içerisine ekilmiş hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını sağlamaktır. Bu nedenle doku iskelesi; hücre yapışması, yayılması ve bazı durumlarda hücre göçü için uygun substratı sağlamalıdır. Bu gereksinimler doku iskelesi üretimi için uygun materyalin seçilmesiyle karşılanabilir fakat üretim tekniği de bu özellikleri etkilemektedir [43].

Kullanılan fabrikasyon tekniği polimerin biyouyumluluğunu olumsuz etkilememeli, doku rejenerasyonunda önemli yer tutan kontrol edilebilir porozite ve gözenek boyutlu doku iskeleleri üretimine izin vermelidir. Yüksek poroziteye sahip doku iskelesi hücrelerin ekilmesi ya da materyal içerisinde yayılması için istenilen bir özelliktir. Gözenek boyutu ise, doku büyümesi ve hücre yapışmasında önemli rol oynamaktadır. Büyük yüzey alanı, doku işlevinin restorasyonu için yararlı olan yüksek sayıda hücrenin kültürlenebilmesi için gerekmektedir. Doku iskelesi üretiminde kullanılan polimerin özellikleri ve doku iskelesinin porozitesi mekanik özellikleri etkileyen ana özellikler olmasına rağmen, üretim yöntemi de etkili olabilmektedir. Üretim prosesi polimerin molekül ağırlığında azalmaya yol açabilmektedir, bu da mekanik özellikleri olumsuz etkilemektedir. Geliştirilen üretim teknikleri polimerin ısıtılmasını ya da uygun bir organik çözücüde çözülmesini içermektedir. Doğal ve sentetik doku iskelesi materyalleri üretmek için çeşitli teknikler geliştirilmiştir [43].

### 2.8.1 Çözücü döküm-partikül uzaklaştırma

Çözücü döküm-partikül uzaklaştırma tekniğinde; polimer çözeltisi ile suda çözülebilen partiküller bir kalıba dökülür (Şekil 2.11). Çözücünün buharlaştırılmasından sonra partiküller suda çözündürülerek uzaklaştırılır ve böylece gözenekli yapıda bir doku iskelesi elde edilmiş olur. Bu prosesin uygulanması kolaydır, ancak bu yöntemle sadece ince membranlar veya çok ince üç boyutlu modeller üretilebilmektedir. Daha kalın doku iskeleleri üretiminde, polimer matrisinden çözülebilen partikülleri tamamen uzaklaştırmak çok zordur. İnce tabakaların üst üste konulduğu modifiye edilmiş bir metodla partikül uzaklaştırma problemi aşılmaktadır, fakat ince poröz tabakaların katmanlaştırılması zaman alıcıdır ve çok az sayıda birbiriyle bağlantılı gözenekler elde edilmektedir. Ayrıca bu yöntemde çözücülerin (bazıları toksiktir) kullanılması sonucunda oluşabilecek çözücü kalıntılarının doku iskelesi üzerinde hücre bağlanması ve çoğalmasını engellemesi de diğer bir dezavantajdır. Son çalışmalar, bu teknikte düşük toksisitede çözücülerin kullanılabilirliğini ve kalıntıların uygulamada kabul edilebilir bir seviyeye azaltılabileceğini göstermiştir [44].



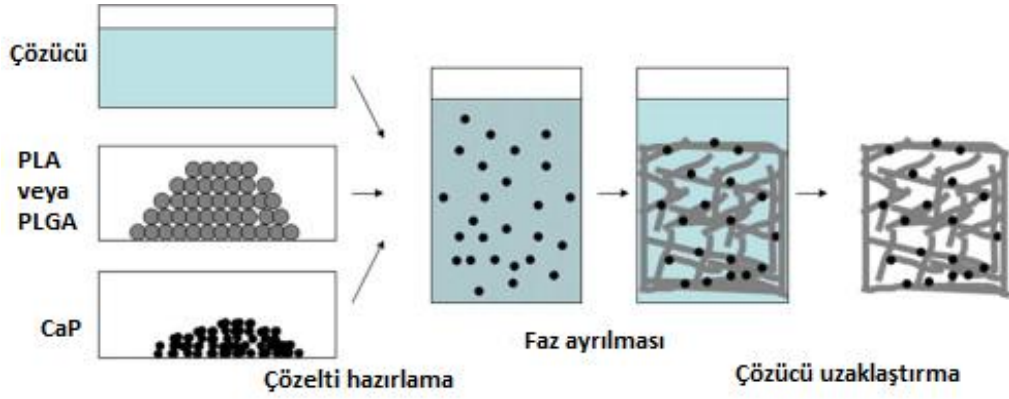
Şekil 2.11 : Çözücü döküm-partikül uzaklaştırma yöntemi.

### **2.8.2 Gaz köpüklendirme**

Birçok fabrikasyon tekniği organik solventler ve yüksek sıcaklıklar gerektirmektedir. Bunun bir sonucu olarak proses sonrası kalıntı oluşabilmekte ve bu da hücreler ile dokulara zarar verebilmektedir. Bu solvent kalıntıları ayrıca doku iskelesine yüklenmiş biyolojik olarak aktif moleküllerin de doğal yapısının bozulmasına yol açabilmektedir. Gaz köpürme tekniği organik solventler ve yüksek sıcaklıklar gerektirmemektedir. Bu teknikte gözenekli doku iskelesi üretimi için yüksek basınçta karbondioksit gazı kullanılmaktadır. Doku iskelelerinin porozitesi ve gözenekli yapısı polimer içinde çözülmüş gaz miktarı ile doğrudan ilişkilidir. Bu proseste; polimer yüksek basınçta (800 psi) karbondioksit gazına tabi tutulmaktadır. Bu şartlar altında, çözülmüş karbondioksit kararsız hale gelmektedir ve polimerden farklı bir faz yapısı oluşturmaktadır. Karbondioksit molekülleri serbest enerjiyi minimize etmek için biraraya gelerek gözenekli yapıyı oluştururlar. Bu gözenekler; polimerin hacminde önemli bir genişleme ile yoğunluğunda azalmaya neden olurlar [45].

### **2.8.3 Faz ayrılması**

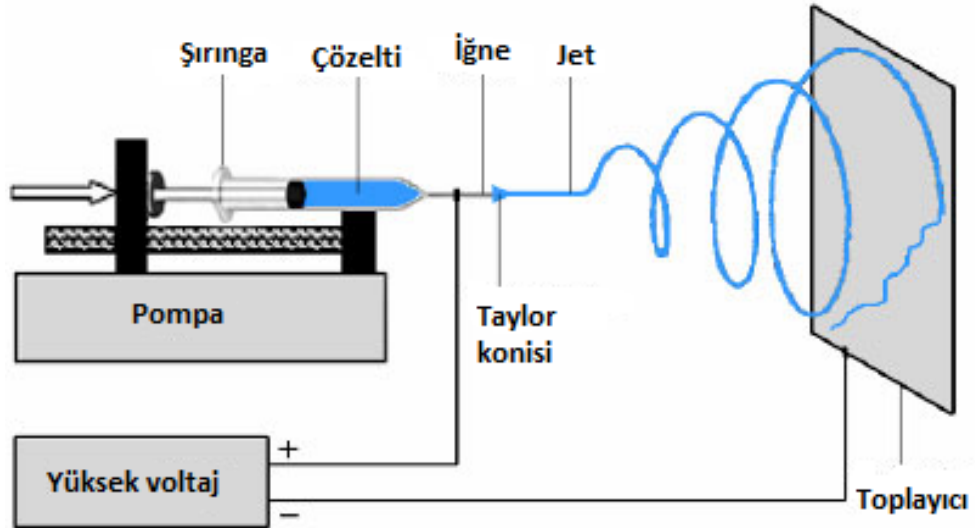
Faz ayrılması tekniğinde; polimer çözeltisini iki faza ayıran sıcaklık değişiminden yararlanılır ve böylece biri düşük diğer yüksek polimer konsantrasyonuna sahip iki ayrı faz oluşur. Polimer uygun bir çözücüde çözüdür ve elde edilen çözeltiliye biyolojik olarak aktif moleküller disperse edilir (Şekil 2.12). Bu çözeltili likit-likit faz ayrımı gerçekleşene kadar kontrollü olarak soğutulur ve ardından iki katı faz oluşması için su ile muamele edilir. Katılaşan çözücü süblimasyonla uzaklaştırıldıktan sonra biyoaktif moleküller içeren porlu doku iskeleleri elde edilmiş olur. Faz ayrılması tekniğinin avantajı; kontrol edilebilir por morfolojisine sahip üç boyutlu doku iskeleleri dizaynında diğer fabrikasyon teknikleriyle kolaylıkla kombine edilebilmesidir. Ayrıca bu teknik doku mühendisliği uygulamaları için nanofibröz doku iskeleleri yapımında hızlı prototipleme tekniğiyle de kombine edilebilmektedir [45].



Şekil 2.12 : Faz ayrılması yöntemi.

#### 2.8.4 Elektroğirme

Elektroğirme tekniğinde nanometreden mikrometreye kadar polimer fiber üretmek için elektrostatik güçten yararlanır. Bu proses; biri polimer çözeltisine diğeri toplayıcıya yerleştirilmek üzere iki elektrot arasında oluşan elektrik alanı ile kontrol edilmektedir (Şekil 2.13). Elektroğirme, doğal ya da sentetik polimerler kullanılarak 2 nm'den mikrometre boyutlarına kadar çeşitli çaplarda polimer fiberleri üretmek için elektriksel güçten yararlanan elektrostatik fiber oluşumu için yaygın şekilde kullanılan bir teknolojidir. Normal fiberlerden daha küçük çaplara ve daha yüksek yüzey alanına sahip elektroğirilmiş fiberler, çeşitli alanlarda başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. İpek fibroin, kolajen, kitosan, jelatin gibi 200'den fazla polimer elektroğirme yönteminde kullanılabilir [45].



Şekil 2.13 : Elektroğirme yöntemi.

Elektroğirme yöntemi, polimer çözelti veya eriyiklerinden fiberler üretmek için elektrostatik kuvvetlerin kullanıldığı eşsiz bir yaklaşımdır. Bu teknik ile üretilen fiberler geleneksel eğirme prosesleri ile üretilen fiberlerden daha ince çapa ve daha büyük yüzey alanına sahiptir. Bu proste ana prensip güçlü çift taraflı elektriksel kuvvetin, yüklü polimer sıvısının daha zayıf olan yüzey gerilimini yenmesidir. Elektroğirme işlemi oda sıcaklığında atmosfer şartlarında yapılmaktadır. Temel olarak elektroğirme sistemi; yüksek voltaj gücü sağlayıcısı, şırınga ve topraklanmış toplama plakası olmak üzere üç ana bileşenden oluşmaktadır. Elektroğirme işleminden önce polimer uygun bir çözücüde tamamen çözüldükten sonra polimer çözeltisi oluşur. Daha sonra polimer çözeltisi elektroğirme prosesi için şırıngaya çekilir. Fakat bazı polimerlerden kötü ve zararlı kokular yayılabilir, bu nedenle proses havalandırma sistemi olan yerlerde gerçekleştirilmelidir. Elektroğirme prosesinde, yüzey geriliminden dolayı şırınganın ucunda tutunan polimer çözeltisine elektrik alan uygulanır ve elektrik alandan dolayı sıvının yüzeyinde bir elektrik yük indüklenir. Elektrik alan kritik değere ulaştığında itici elektriksel güçler yüzey gerilimini yener ve çözelti şırınganın ucundan çıkar. Şırınganın ucundan toplayıcıya giden süre zarfında polimer çözeltisindeki çözücü buharlaşır ve böylece toplama plakasında polimer fiberler birikir [46].

### **2.8.5 Eriyik kalıplama**

Eriyik kalıplama prosesinde; polimer (PLGA) tozları ile belirli çaplarda jelatin mikrosferleri teflon kalıba alınır ve bu karışım polimerin camsı geçiş sıcaklığı (T<sub>g</sub>) üzerinde bir sıcaklığa ısıtılır. Bu aşamada polimer partiküllerinin biraraya gelmesi sağlanır. Daha sonra bu karışım kalıptan alınarak suya daldırılır ve bu işlemde jelatin mikrosferlerin çözülmesi sağlanarak gözenekli polimer doku iskelesi elde edilmiş olur. Bu teknikle üretilen doku iskeleleri kalıbın şeklini almaktadır [45].

Eriyik kalıplama üç boyutlu doku iskeleleri üretmek için alternatif bir metottur. Porozite; kullanılan jelatinin miktarı değiştirilerek kontrol edilebilmektedir. Doku iskelesinin gözenek boyutu farklı çaplarda mikrosferler kullanılarak poroziteden bağımsız olarak değiştirilebilmektedir. Sonuç olarak, bu teknikte organik çözücüler kullanılmadığı ve düşük sıcaklıklarda gerçekleştirildiği için potansiyele sahiptir [43].

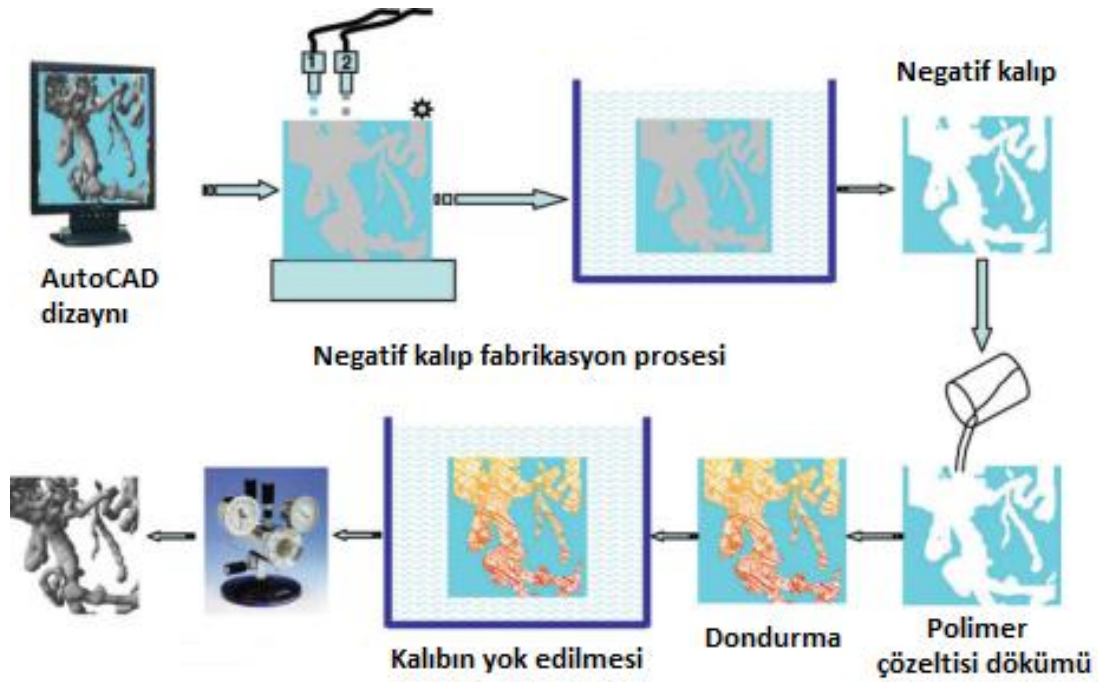
### **2.8.6 Dondurarak kurutma (Liyofilizasyon)**

Süblimasyon prensibine dayalı olan dondurarak kurutma tekniğinde; öncelikle istenilen konsantrasyonda bir çözelti hazırlamak üzere polimer uygun bir çözücüde çözülür. Elde edilen polimer çözeltisi, gözenekli matrisleri sağlamak için öncelikle dondurulur. Dispersiyon yada çözeltinin donması buz kristallerinin dokular arasında toplanmasıyla sonuçlanır. Daha sonra buz kristalleri dondurarak kurutma ile yok edilir. Liyofilizasyon ile yüksek vakum altında çözücünün uzaklaştırılmasıyla birbiriyle bağlantılı yüksek gözenekli bir yapı elde edilmektedir. Gözenek boyutu; dondurma oranı ve pH ile kontrol edilmektedir [43]. Gözenek boyutunun dondurma hızı ve pH ile kontrol edilebildiği bu teknikte hızlı bir dondurma ile daha küçük gözenekler sağlanabilmektedir. Homojen, üç boyutlu ve gözenekli bir yapı oluşturmak için tek yönlü kontrollü katılma yapılmaktadır. Bu tekniğin en önemli avantajı; tanecik uzaklaştırma işlemi ile yüksek sıcaklık gerektirmemesidir. Küçük gözenek boyutu ve uzun proses süresi ise bu teknikteki dezavantajlardır [45].

### **2.8.7 Katı serbest form fabrikasyonu**

Katı serbest form fabrikasyonu (SFF); bilgisayar destekli (CAD), bilgisayarlı tomografi (CT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi bilgisayar verilerinden yola çıkarak direkt olarak fabrikasyonunu mümkün kılan gelişmiş bir teknolojidir. Bu teknolojiyle elde edilen dijital bilgi daha sonra modeli bir katmanlar serisi olarak tanımlayan spesifik bir kesitsel formata dönüştürülür. Sonra bu dosya, katmanlı üretim stratejisi ile dizayn edilmiş üç boyutlu maddeleri inşa eden SFF makinesinde tamamlanır. Herbir katman spesifik bir seviyede modelin kesitsel şeklini yansıtır. SFF; klasik üretim metodlarının erişemediği hassas geometrilere malzemelerin üretilmesine olanak sağlar. SFF; özellikle doku iskelelerinin fabrikasyonunda kullanımı giderek artan bir teknolojidir. Çünkü SFF teknolojisiyle, yapay vasküler sistem gibi rol oynayabilecek hassas iç mimariye (gözenek boyutu ve şekli, birbirleriyle bağlantılı gözenekler, geometri ve oryantasyon) sahip doku iskeleleri üretebilmektedir [44].

Doku iskelesi üretiminde uygulanan SFF tekniği; direkt SFF ve indirekt SFF olmak üzere iki şekilde yapılabilmektedir. Direkt SFF tekniğinde malzemeden direk olarak yapı iskelesi inşa edilirken; indirekt SFF tekniğinde sentetik veya doğal olan biyomateryalin döküleceği bir kalıp inşa edilir. Ölçülebilirlik, yeniden üretilebilirlik ve uygulanabilirlik açısından direkt SFF tekniği daha çok tercih edilmektedir ve neredeyse tamamen otomatik bir işlemdir. İndirekt SFF tekniği ise daha geniş bir malzeme yelpazesine uygulanabilmektedir, ama genellikle daha çok proses gerektirir ve ticari talepleri karşılamada daha yetersiz kalabilir [46]. Doku iskelelerinin fabrikasyonunda kullanılan direkt SFF tekniği pratik bir tekniktir. İndirekt SFF tekniğinde, öncelikle doku iskelesi dizaynına uygun negatif bir kalıp üretilir. Daha sonra biyomateryal veya kompozit malzeme kalıba dökülür. Biyomateryal katılaştıktan sonra (dondurma prosesi) doku iskelesini elde etmek üzere negatif kalıp yok edilir (Şekil 2.14). Her SFF tekniği malzemenin viskozite, erime noktası ve çözünübilirlik gibi özellikleri için gerekli koşullara sahiptir. Prensip olarak, SFF tekniklerinin insan dokusunun yapısını taklit etme potansiyeli vardır [44].



**Şekil 2.14** : Katı serbest form fabrikasyonu (İndirekt SFF).



## **2.9 Antibakteriyel Yara Örtüleri**

Yara örtülerinde antibiyotik ve diğer antibakteriyellerin kullanılmasının amacı; özellikle diyabetik ayak ülserleri ve şiddetli travma sonucu direncin düşmesine bağlı olarak enfeksiyon oluşma sıklığı yüksek olan cerrahi ya da kaza yaraları için enfeksiyonlara karşı savaşmak ve yarayı enfeksiyondan korumaktır. Lokal yara bölgelerine antibiyotik iletimi bir çok nedenden ötürü daha çok tercih edilmektedir. Yeterli sistemik etkiyi sağlamak için gerekli olan antibiyotik dozları toksik reaksiyonlara neden olmaktadır. Yara bölgesine antibiyotik iletimi için örtülerin kullanımının amacı; yara iyileşmesi prosesi sırasında bakteriyel direnç sağlayabilmektedir. Yara örtülerinde daha düşük dozda antibiyotik kullanımı ayrıca sistemik toksisite riskini de azaltmaktadır. Sonuç olarak, yara örtülerinden lokal iletim sayesinde, diyabetik ayak ülserlerindeki düşük kan sirkülasyonundan kaynaklanan etkisiz sistemik antibiyotik tedavisi problemi aşılabilmektedir [47].

### **2.9.1 Gümüş sülfadiazin**

Yüzyıllardır gümüş içeren bileşiklerin tedavi edici özelliklerinden yararlanılmaktadır. 19. yüzyılda gümüş bileşiklerinin tetanos ve romatizmada kullanımı yaygındı ve daha modern antibiyotiklerin kullanıldığı 20. yüzyılın başlarına kadar soğuk algınlığı ve bel soğukluğu tedavisinde kullanılmaktaydı. II. Dünya Savaşı zamanında, terapötik (tedavi edici) gümüşe olan ilgi azaldı. Daha sonraları yanıkların tedavisinde iyileştirici olarak kullanılmak üzere gümüş nitrat öngörülmüştür. Gümüş nitrattan daha iyi bir ilaç profili tanımlamak üzere birbirini takip eden araştırmalar sonucunda 1968 yılında Fox referans bir makale ile gümüş sülfadiazin (AgSD) kullanımı ve formülasyonunu açıklamıştır. Bunu takiben gümüş sülfadiazin kısmi kalınlıklı yanıklarda enfeksiyonu önleyen ya da tedavi eden ve yara iyileşmesini hızlandıran standart bir iyileştirici olarak kabul görmüştür [48].

Gümüş sülfadiazin uzun yıllardır kısmi kalınlıklı yanıkların iyileştirilmesinde kullanılmaktadır. Günlük yara temizleme prosesinde acı ve ağrı temel problemdir. Steril bir ortamda daha az sıklıkta yara örtüsü değişimi ile kısmi kalınlıklı yara/yanıkları geçici örtülerle kapama reepitelizasyonu kolaylaştırır ve bu uygulama acı, ağrı ve yara iyileşmesi göz önünde tutulduğunda günlük temizlik uygulamasına üstün gelmektedir. Gümüş sülfadiazin yüklü yara örtüleri, enfeksiyonu azaltmakta ve yara bölgesinde antimikrobiyal aktivite göstermektedir [49]. Yapılan in vitro testler, gümüş sülfadiazinin diğer gümüş sülfonamidli ilaçlara kıyasla yara iyileşmesinde daha etkili olduğunu kanıtlamıştır. Gümüş sülfadiazinin bu etkinliğini, gümüş nitrat ya da diğer gümüş tuzlarından farklı olarak gümüş sülfadiazinin DNA ile güçlü bağlar oluşturması açıklayabilir. Bu ürünler bakteriyel direnç göstermektedir [50].

Yara/yanık tedavisinde amaç; yara bölgesinde enfeksiyon gelişimini engelleyerek en kısa sürede en iyi fonksiyonel ve kozmetik sonuçları elde etmektir. Uygulanan topikal ajanlar yara iyileşmesini hızlandırmakta ve aynı zamanda bakteriyel kontaminasyona engel olmaktadır. Gümüş sülfadiazinin %1'lik merhemleri (AgSD) dünyada halen en sık kullanılan topikal ajanlardır [51]. Gümüş iyonları bir çok mikroorganizmanın solunum membranında iyon transport sistemini bozarak etkili olmaktadır [52]. Gümüş sülfadiazinin bakteriyel kontaminasyona engel olduğu, epitelizasyonu hızlandırdığı ve yara kontraksiyonunu geciktirdiği bilinmektedir [53]. Gümüş içeren merhemlerin yanında gümüş içeren yara/yanık örtü materyalleri de bulunmaktadır. Bu yara örtü materyalleri sıvı absorbe edip ıslak hale gelince içindeki gümüş iyonunu yara yatağına serbestleştirir. Günlük değişim gerektirmeden uygulandığı için bu tür materyaller avantajlıdır. Yapılan çalışmalar bu antibakteriyel özellikteki yara örtü materyallerinin birçok bakteri ve mantara karşı etkili olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, gümüş sülfadiazin yüklü yara örtü materyalleri sık pansuman değişimine gerek duyulmaması ve hasta memnuniyeti gibi avantajları nedeniyle kısmi kalınlıktaki yara/yanıkların tedavisinde tercih edilen bir tedavi yöntemi olarak görülmektedir [54].

### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

İpek fibroin eldesinde kullanılan Bombyx Mori ipek kozaları, Bursa Tarım Satış Kooperatifleri Birliğin (Kozabirlik)'den satın alma yoluyla temin edilmiştir. Doku iskelelerine immobilizasyon için kullanılan Heparin Sodyum Tuzu (Sigma)'dur. Kullanılan diğer kimyasallar analitik ve satın alma yoluyla temin edilmiştir.

#### **3.2 İpek Kozalarından Fibroin İzolasyonu ve Saflaştırılması**

Doku iskelelerinin üretiminde kullanılan ipek fibroinin eldesi için öncelikle ipekten yapışkan serisin proteinin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla ipek kozaları küçük parçalar halinde kesilerek 2.12 g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilave edilmiş kaynar suda 30 dk boyunca kaynatılmıştır. Bu işlem toplam üç kere tekrarlandıktan sonra ipeğin yapısında bulunan serisin proteini ekstrakte edilerek saf ipek fibroini elde edilmiştir. Elde edilen ipek fibroin distile suda defalarca yıkandıktan sonra etüvde 35°C'de kurutulmuştur. Elde edilen fibroin filamentleri, 9.3M LiBr çözeltisinde 60°C'de 4 saat bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır. Bu işlemden sonra elde edilen çözelti diyaliz membranı (Molecular weight cut off, MWCO=3500) ile distile suda 2 gün süresince diyaliz edilmiştir.

#### **3.3 Çift Katmanlı Doku İskelelerinin Hazırlanması**

##### **3.3.1 İpek fibroin süngerimsi yapıların hazırlanması**

Diyaliz işleminden elde edilen sulu ipek fibroin çözeltisi filtre edildikten sonra bu çözeltinin yüzde konsantrasyonu hesaplanmıştır. % 7'lik sulu ipek fibroin çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti petri kaplarına belirli miktarlarda alınarak -20°C'de bir gün dondurulduktan sonra gözenekli bir yapının elde edilmesi amacıyla iki gün süreyle liyofilizasyon işlemine tabii tutulmuştur. Bu işlemden sonra süngerimsi yapıda ipek fibroin doku iskeleleri elde edilmiştir.

### **3.3.2 Süngerimsi yapılara heparin immobilizasyonu**

0.5x0.5 cm boyutlarda kesilmiş ipek fibroin süngerler öncelikle 30 dk süresince MES (pH=5.4) tampon çözeltisi ile ön ıslatmaya tabii tutulmuştur. Immobilizasyon işlemi için 50 mg heparin, 5 mL MES tamponunda (pH=5.4) çözülmüştür. Elde edilen bu çözeltiye 0.0182 g EDC ve 0,0103 g NHS eklendikten sonra 10 dk bekletilmiştir. MES tampon çözeltide 30 dk bekletilen ipek fibroin süngerler 5 saat süresince bu çözeltide çapraz bağlanma ile immobilizasyon işleminin gerçekleşmesi için bekletilmiştir. Bu işlemin ardından süngerler distile suda iyice yıkanmıştır. Son olarak heparin immobilize edilen ipek fibroin süngerler vakum altında kurutulmuştur.

### **3.3.3 Nanofibröz ipek fibroin/AgSD üst katmanın hazırlanması**

Bu aşamada elde edilen ipek fibroin süngerlerin üzeri nano boyutta ipek fibroin fiberlerle film şeklinde kaplanarak derinin epidermis tabakasına benzer bir yapı elde edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilecek olan malzemenin bakterilere karşı bariyer özelliği göstermesi için üzerine kaplanan film tabakası büyük bir öneme sahiptir. İpek fibroin süngerlerin bu üst katmanına antibakteriyel özellik kazandırmak için gümüş sülfadiazin (AgSD) kullanılmıştır. Elektroğirme yöntemi ile ipek fibroin süngerlerin üzerinde gümüş sülfadiazin içeren nanofibroz membran oluşturulmuştur.

İpek fibroin nano fiberlerin elde edilmesi için Şekil 3.1’de görülen elektroğirme cihazı kullanılmıştır. Elektroğirme cihazı ile konsantrasyon, akış hızı, voltaj ve şırınga ile toplama bölümü arasındaki mesafe değiştirilerek farklı çaplarda nano fiberler elde edilebilir. Yapılan deneylerde en ince kalınlıktaki fiberlerin 0,1 g/ml konsantrasyondaki ipek fibroin çözeltisi için 3 ml/h akış hızında, 20 kV’da ve şırınga ucu ile toplama bölümü arasında 10 cm’lik mesafede elde edildiği görülmüştür. Bu nedenle ipek fibroin süngerlerin nano fiber film tabakasıyla kaplanması bu şartlar altında yapılmıştır.



**Şekil 3.1** : Elektroeğirme cihazı.

İlk olarak 0.5x0.5 cm'lik boyutlarda kesilen ipek fibroin süngerler alüminyum folyo üzerine dikkatlice yapıştırılmıştır. İpek fibroin süngerlerden ipek fibroin çözeltisi hazırlamak için çözücü olarak 1,1,1,3,3,3-Hekzafloro-2-propanol (HFIP) kullanılmıştır. Hazırlanan 0,1 g/ml'lik 3 ml ipek fibroin çözeltisi 5 ml'lik şırıngaya çekildikten sonra şırınga pompaya yerleştirilmiştir. Pompa çalıştırıldıktan sonra şırıngadan çözelti damlayana kadar beklenilmiştir ve çözelti damlamaya başladığında voltaj açılarak fiberlerin süngerler üzerinde birikmesi sağlanmıştır. Bu işlem şırıngadaki çözelti tükenene kadar devam etmiştir. Çözelti bittiğinde önce voltaj daha sonra pompa kapatılarak süngerler dikkatli bir şekilde alüminyum folyodan çıkartılmıştır. Ancak tüm bu işlemler sonunda ipek fibroin süngerler suda kararsız olan  $\alpha$ -heliks yapıdadır. Bu nedenle süngerler suda kararlı olan  $\beta$ -tabakalı yapıya geçmesi için % 75'lik etanolde vakum altında 1 gün bekletildikten sonra kurutulmuştur.

### **3.4 Çift Katmanlı Doku İskelelerinin Karakterizasyonu**

#### **3.4.1 Morfolojik karakterizasyon**

Elde edilen sünger ve çift katmanlı doku iskelelerinin morfolojik açıdan karakterizasyonu Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır. Bu amaçla 0.5x0.5 cm boyutlarında kesilmiş doku iskelelerinin gözenek yapıları ve boyutu ile çift katmanlı görünüşleri incelenmiştir. Ayrıca ipek fibroin süngerlerin antibakteriyel özelliklerini incelemek üzere % 2, % 10 ve % 20 oranlarında gümüş sülfadiazin içeren ipek fibroin çözeltisi hazırlanmıştır. Gümüş sülfadiazinin doku iskelesi üzerindeki varlığı ve dağılımını belirlemek amacıyla Enerji Dağılımlı X-Işınları (EDX) analizi yapılmıştır.

#### **3.4.2 Yapısal analiz**

Doku iskeleleri hazırlamakta kullanılan ipek fibroin proteininin sulu ortamlardaki kararlılığını arttırmak için uygulanan etanol muamelesi ile proteinin konformasyonunda istenilen  $\alpha$ -heliks $\rightarrow\beta$ -düzlemsel tabaka yapısal geçişini sağlandığının ispatlanması amacıyla örneklerin Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FTIR) analizi yapılmıştır.

#### **3.4.3 İmmobilize heparin miktarının tayini**

Doku iskelelerine immobilize edilen heparin miktarını belirlemek amacıyla Toluidine Blue yöntemi kullanılmıştır. Bunun için 10 mg NaCl, 5 ml 0.1 M HCl'de çözüldükten sonra çözeltiliye 2 mg Toluidine Blue eklenmiştir. Kompleks oluşumu amacıyla heparin immobilize edilen ipek fibroin süngerler 4 saat süreyle bu çözeltide bekletilmiştir. Heparin ile reaksiyona girmeyen fazla boyanın uzaklaştırılması amacıyla süngerler distile suda defalarca yıkanmıştır. Süngerler üzerinde oluşan boya-protein kompleksi 0.1 M NaOH-Etanol (1:4) içinde çözülmüştür. Elde edilen supernatantların absorbans değerleri UV-Spektrofotometre'de 530 nm'de ölçüm yapılarak belirlenmiştir.

Bu çalışmalar üç adet örnek için tekrarlanmış ve immobilize olan heparin miktarı bu örneklerin ortalaması alınarak verilmiştir. Aynı işlemler heparin immobilize edilmemiş örnekler için uygulanmış ve bu örnekler için okunan absorbans değerleri heparin immobilize edilmiş örneklerden çıkarılarak heparin immobilize örnekler için düzeltme yapılmıştır.

Okunan değerlerden immobilize edilen heparin konsantrasyonunun hesaplanabilmesi için standard grafik oluşturulmuştur. Bu amaçla 2.5 mg/ml konsantrasyonunda heparin çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için belirli miktarlardaki heparin (5-50mg aralığında), % 0.2'lik NaCl (0.01 M HCl) çözeltisinde çözüldükten sonra, bu çözeltiye 0.4 mg/ml'lik Toluidine Blue çözeltisinden ilave edilmiştir. Elde edilen bu çözelti 4 saat süreyle bekletilmiştir. Daha sonra bu çözelti 5 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra elde edilen çökeltideki heparine spesifik bağlanmamış toluidine blue'nun uzaklaştırılması amacıyla % 0.2 'lik NaCl (0.01 M HCl) çözeltisi eklenerek tekrar santrifüjlenmiştir. Supernatantın uzaklaştırılması ile elde edilen son çökelti 0.1 M NaOH-Etanol (1:4) çözeltisi içinde çözülerek UV-Spektrofotometre'de 530 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Değişik heparin konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri kullanılarak standard grafik elde edilmiştir. Bu standard grafik kullanılarak ipek fibroin süngerlere immobilize edilen heparin miktarı belirlenmiştir.

#### 3.4.4 Şişme kapasitesi

Hazırlanan çift katmanlı ipek fibroin doku iskelelerinin ortalama % şişme oranlarının belirlenmesi amacıyla, doku iskelelerinin öncelikle kuru ağırlıkları tartılmıştır. Daha sonra ipek fibroin doku iskeleleri 37°C'deki su banyosunda bulunan fosfat tampon çözeltilerine (pH=7.4) daldırılmıştır. 15 dakika sonra ipek fibroin doku iskeleleri fosfat tampon çözeltisinden çıkarılarak filtre kağıdı yardımı ile üzerindeki fazla suyun emilmesi sağlanmıştır. Fazla su emildikten hemen sonra örnekler tartılmıştır. Daha sonra ipek fibroin doku iskeleleri tekrar fosfat tampon çözeltisine daldırılmıştır. 15 dakikada bir tartım alınarak ipek fibroin doku iskelelerinin (%) şişme oranları hesaplanmıştır. Bu işleme ipek fibroin doku iskelelerinin ağırlığı sabit bir değere yani denge şişme değerine ulaşana kadar devam edilmiştir. İpek fibroin doku iskelelerinin yüzde şişmesi hesaplanması için;

$$\text{Şişme oranı}(\%) = \frac{m_w - m_i}{m_i} \times 100 \quad (3.1)$$

formülü kullanılmıştır.

$m_w$ = süngerlerin çözeltiye daldırıldıktan sonraki ağırlığı (g),

$m_i$ = süngerlerin kuru ağırlığı (g).

### 3.5 Doku İskelelerinin Antibakteriyel Özelliklerinin İncelenmesi

Üretilen doku iskelelerinin epidermisi taklit edecek olan üst tabakasına antibakteriyel özellik sağlamak amacıyla değişik oranlarda eklenen gümüş sülfadiazinin minimum etkili konsantrasyonunun belirlenmesi için doku iskelelerine “Zon İnhibizasyonu” olarak bilinen antibakteriyel özellik ölçme testi uygulanmıştır. Buna göre, Gram (+) bir bakteri olan *Staphylococcus aureus* 2 ml LB besi yerinde 37°C’de 170 rpm çalkalama hızı ile gece boyu büyütülmüştür. Kullanılan besi yeri içeriği Çizelge 3.1’de verilmiştir. Ertesi gün 600 nm dalga boyundaki hücre yoğunluğu değerleri spektrofotometrik olarak ölçülerek literatürde Gram (+) bakteriler için önerilen  $1,6 \times 10^5$  bakteri sayısına ulaşmak için seri dilüsyonlar yapılmıştır.

**Çizelge 3.1 :** Kullanılan besi yeri içeriği.

Kullanılan besi yeri içeriği (g/L)	
Nutrientbroth	10 g/L
Yeast Extract	5 g/L
NaCl	8 g/L
Agar	15 g/L

90x10 mm boyutlarındaki steril petri kabına  $15 \pm 2$  ml LB-agar besi yeri dökülerek katılaşması beklenmiştir. Hazırlanan petrilere yukarıda belirtilen sayıda *Staphylococcus aureus* eklenerek bağıet yardımı ile ekim yapılmıştır. Örnekler steril penset ile agar yüzeyine dikkatlice yerleştirilip, 37°C’ta gece boyu inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak antibiyotik (AgSD) yüklü olmayan doku iskelesi kullanılmıştır. Petri kaplarını görüntüleme işlemi Vilber-Lourmat Görüntüleme Sistemi ile yapılmıştır. Örneklerin oluşturduğu bakteriyel inhibisyon zonlarının genişliği aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$W = \frac{(T - D)}{2} \quad (3.2)$$

W: İnhibisyon zonu genişliği (mm),

T: Toplam zon büyüklüğü (mm),

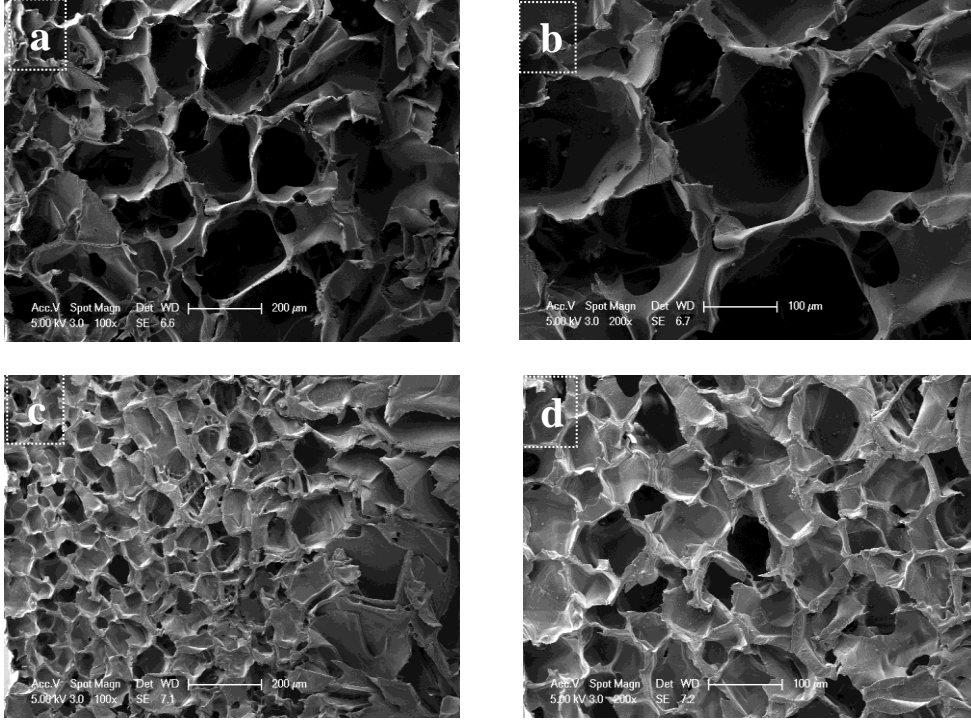
D: Örneğin büyüklüğü (mm).



## 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

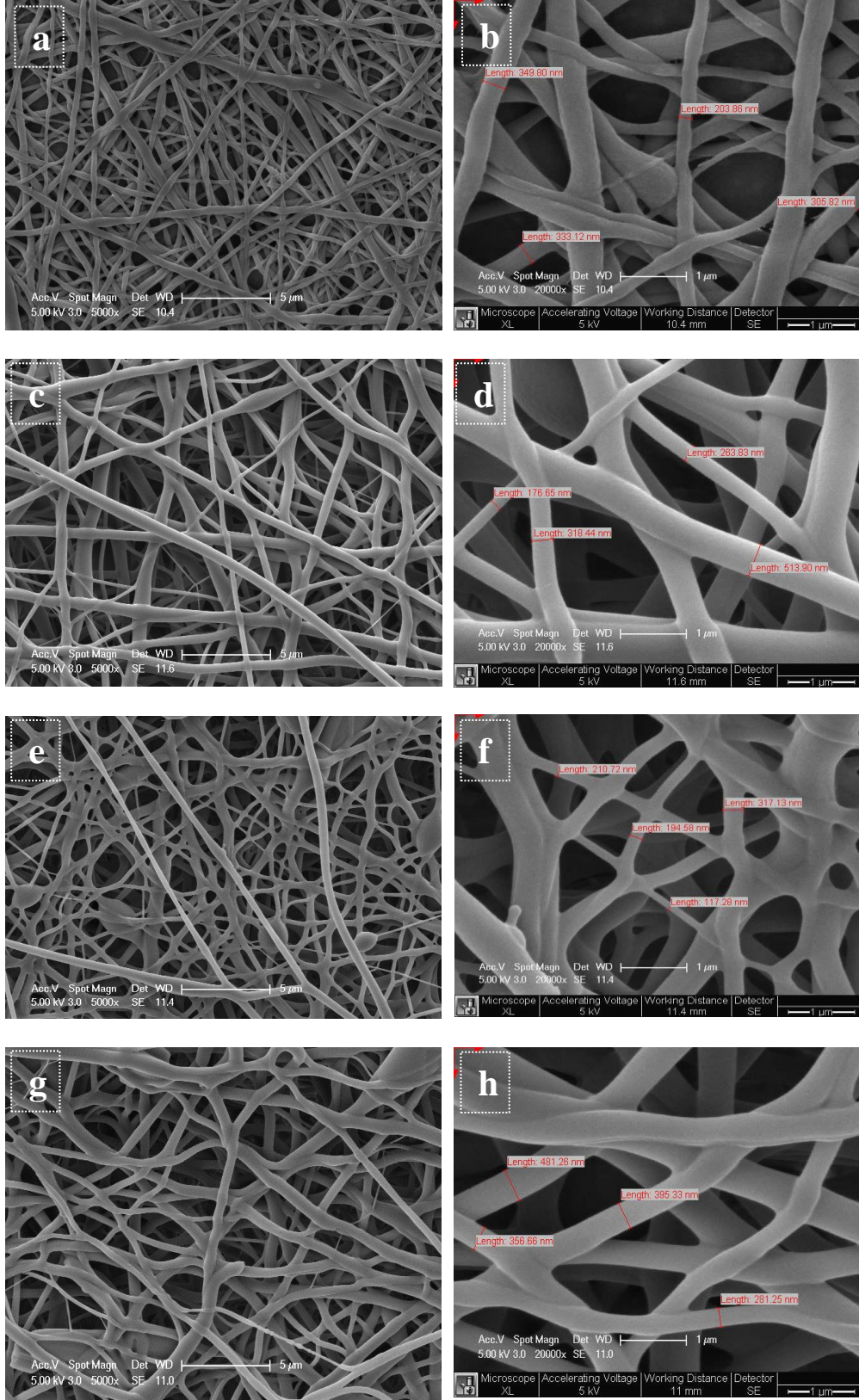
### 4.1 İpek fibroin Süngerlerin ve Çift Katmanlı Doku İskelelerinin Morfolojik Özellikleri

Doku mühendisliğinde kullanılacak olan doku iskelesinin mikroyapısının hücre proliferasyonu, fonksiyonu ve büyümesi üzerine etkisi büyüktür. Uygun gözenek boyutu ve gözeneklerin birbirleri ile bağlantılı olması, hücrelere oksijen ve besin transportu bakımından olduğu kadar hücreler arası ilişkilerin sağlanması açısından da önemlidir. Derinin yapısında da alt katmanı oluşturan dermis, fibroblast hücrelerini barındırır. Ayrıca damarlaşmanın da bu katmanda gerçekleşmesi nedeniyle bu katman için tasarlanmış bir doku iskelesinin yüksek ve bağlantılı gözeneklilikte bir yapıda olması istenir [55,56,57]. Bu tez kapsamında hazırlanan doku iskelelerinin de dermisi taklit eden alt tabakasının üretiminde dondurarak kurutma yöntemi seçilmiştir. Bu yöntem, yukarıda bahsedilen istenilen mikroyapıda tabakanın oluşması için en uygun yöntemlerden biridir. Hazırlanan doku iskelelerinin süngerimsi alt tabakasının mikroyapısını belirlemek üzere kullanılan SEM analizi sonuçları Şekil 4.1’de verilmiştir. Şekil 4.1a ve b’de ipek fibroin süngerlerin İpek I yapısı görülmektedir. Şekil 4.1b ve c’de ise  $\beta$ -düzlemsel tabaka yapısının (İpek II) SEM görüntüleri verilmiştir. Etanol ile muamele sonucu doku iskelelerinin gözenek yapısında değişiklikler gözlenmiştir. Etanolden önce gözenek çapı yaklaşık 250  $\mu\text{m}$  iken, etanol ile muamelenin doku iskelelerinin gözenek boyutunu 100  $\mu\text{m}$  civarına indirdiği bulunmuştur. İpek fibroin proteinin konformasyonel geçişini sağlamak üzere kullanılan metanol veya etanol gibi alkoller, proteinin dehidratasyonuna ve dolayısıyla yapının sıkışmasına neden olmaktadır. Bu durum literatürde de birçok çalışmada rapor edilmiştir [58,59].



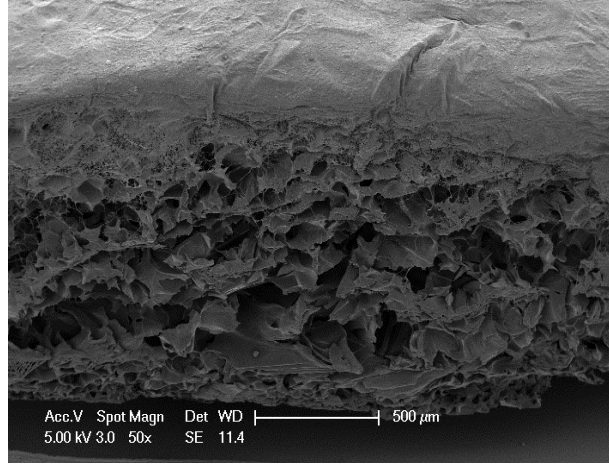
**Şekil 4.1 :** İpek fibroin süngerlerin morfolojisi: (a,b) Etanol ile muameleden önce. (c,d) Etanol ile muameleden sonra.

Bariyer fonksiyonunun öne çıktığı derinin epidermal üst tabakasını taklit etmek üzere, hem bu fonksiyonun gerçekleştirilmesi hem de oksijen ve nem dengesinin sağlanması açısından süngerimsi alt tabaka üzerinde nanofibröz membranlar oluşturulmuştur. Antibakteriyel özellik kazandırması amacıyla değişik oranlarda gümüş sülfadiazin (AgSD) eklenmiştir. Gümüş sülfadiazin (AgSD) içermeyen çift katmanlı doku iskelelerinin nanofibröz üst katmanı ile sırasıyla % 2, % 10 ve % 20 oranlarında AgSD içeren çift katmanlı doku iskelelerinin nanofibröz üst katmanlarının SEM görüntüleri Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Alt katmana kıyasla daha küçük gözenekler içeren bu nanofibröz katmanın fiber kalınlığı 117-513 nm aralığında ölçülmüştür. Elektroegirme prosesi sırasında ipek fibroin çözeltisine katılan AgSD miktarına göre proses şartlarının değiştirilmesi nedeniyle AgSD’nin fiber çapına etkisini tartışmak mümkün olmamıştır. Buna karşın AgSD oranı arttırılsa da proses koşulları değiştirilerek istenilen özellikle nanofibröz üst katmanın oluşturulabileceği söylenebilir.



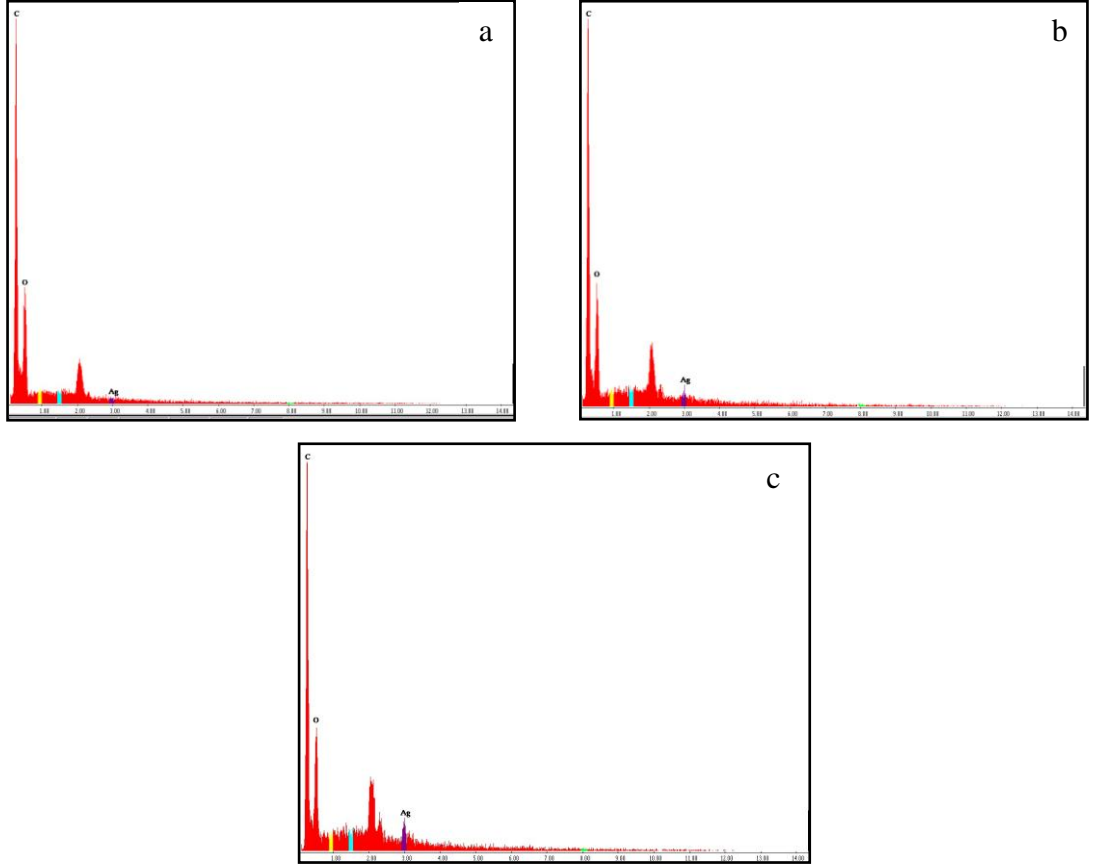
**Şekil 4.2 :** Çift katmanlı doku iskelelerinin nanofibröz katmanının SEM görüntüleri: (a,b) AgSD içermeyen. (c,d) % 2 AgSD. (e,f) % 10 AgSD. (g,h) % 20 AgSD içeren.

Şekil 4.3'te çift katmanlı doku iskelelerinin lateral SEM görüntüsü verilmiştir. Bu görüntüde süngerimsi yapı olan alt katman ile nanofibröz yapıdaki üst katmanın birbirine çok iyi entegre olduğu görülmektedir. Bu da üretilen doku iskelesinin uygulama sırasındaki kararlılığı açısından önemlidir.



**Şekil 4.3 :** Çift katmanlı doku iskelelerinin lateral SEM görüntüsü.

Çift katmanlı doku iskelelerinin AgSD yüklü nanofibröz üst tabakalarına yapılan EDX analizi ile gümüş elementinin varlığı ispatlanmıştır. Şekil 4.4'te sırasıyla % 2, % 10 ve % 20 AgSD yüklü doku iskelelerinin EDX spektrumları verilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucu yüzeyde analiz edilen gümüş elementi dağılım yüzdesinin, başlangıçta ipek fibroin ile karıştırılan fibroin yüzdesi ile bir korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Başlangıçta yüklenen miktarların olarak birbirine oranı 1/5/10 iken EDX ile yüzeyde bulunan gümüş dağılım yüzdelерinin birbirlerine oranı 1/4/8.4 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). Bunun yanısıra EDX sonuçlarının düşük bir standard sapma gösterdiği görülmüştür. Bu da AgSD'nin nanofibröz tabakada homojen bir şekilde dağıldığını göstermektedir. Bu verilerden yola çıkılarak başlangıçta elektroçirime için hazırlanan ipek fibroin/AgSD'nin homojen bir çözelti olduğu ve elektroçirime prosesi sırasında da homojenitesini koruduğu sonucuna varılabilir.



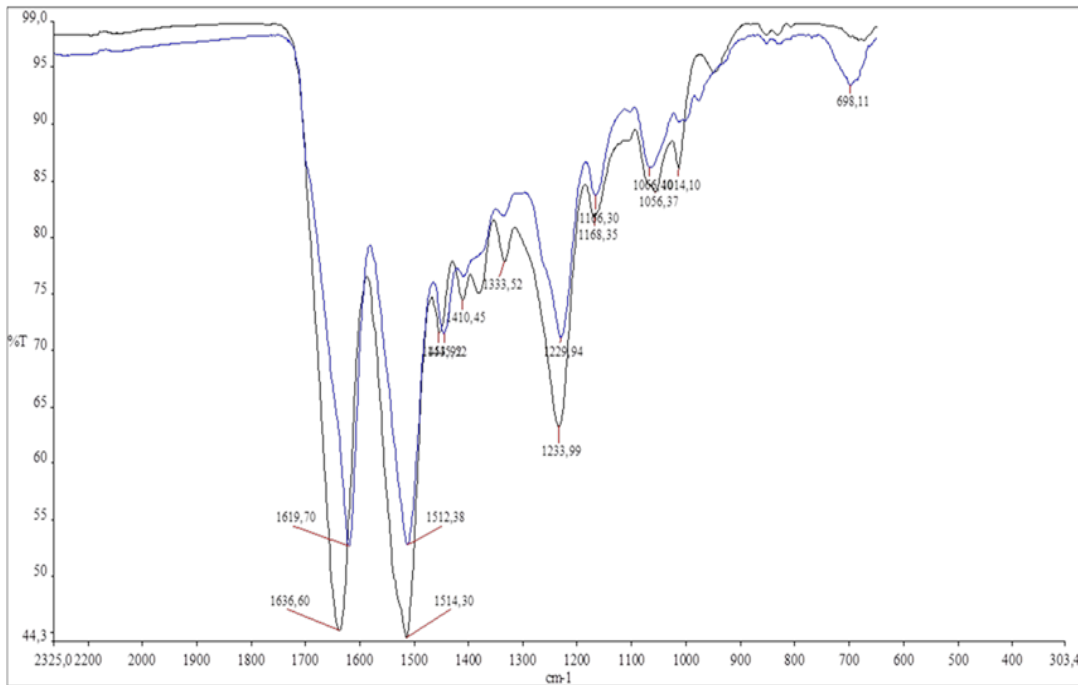
**Şekil 4.4 :** Doku iskelelerinin EDX spektrumları: (a) % 2 AgSD. (b) % 10 AgSD. (c) % 20 AgSD yüklü doku iskeleleri.

**Çizelge 4.1 :** AgSD yüklü doku iskelelerinin yüzeyindeki Ag elementinin dağılımı.

Doku iskelesi AgSD içeriği (%)	Yüzeyde bulunan Ag elementi dağılımı (%)
2	0.80±0.09
10	3.22±0.21
20	6.74±0.52

## 4.2 Yapısal Analiz

İkincil protein yapısındaki Bombyx mori ipek fibroin, İpek I ve İpek II olmak üzere iki temel konformasyonda bulunabilir. İpek I konformasyonun yapısı tam olarak anlaşılammakla birlikte  $\alpha$ -heliks ve rastgele sarmal yapılarının bir karışımı olduğu bilinmektedir. Bu yarıkararlı (metastabil) yapıdaki ipek fibroini, suda çözünmesi nedeniyle birçok uygulama için istenilen bir form değildir. Bunun yerine anti-paralel  $\beta$ - düzlemsel tabakaları içeren İpek II yapısındaki malzemeler tercih edilir. Bu tez kapsamında da deri dokusu onarımı için kullanılacak malzemenin sulu ortamda bütünlüğünü koruması doku iskelesi görevini yerine getirmesi bakımından önemlidir. Bu nedenle hazırlanan çift katmanlı doku iskelelerinin etanol ile muamele edilerek İpek I yapısından İpek II yapısına geçmesi sağlanmıştır. Bu konformasyonel geçişin gerçekleştiği Şekil 4.5'te FTIR spektrumunda da görülebilmektedir. Etanol ve metanol gibi alkoller ipek fibroin molekülleri için iyi birer kristalizasyon ajanı olarak bilinirler. Kristalizasyon mekanizmasının polar karakterdeki alkolün ipek fibroin moleküllerinden suyu çekmesi ve bu nedenle alanin ve glisin gibi hidrofobik amino asitlerin kümelenerek  $\beta$ -düzlemsel tabaka yapısını oluşturması şeklinde olduğu düşünülmektedir [60].



Şekil 4.5 : İpek I ve İpek II yapısındaki süngerlerin FTIR analizi.

Etanol ile muamele edilmeden önce İpek I yapısının karakteristik bandları olan amid I ve amid II, sırasıyla  $1636\text{ cm}^{-1}$  (amid I),  $1514\text{ cm}^{-1}$  (amid II)'de gözlemlenmiştir. Etanol ile muameleden sonra ise bu bandların sırasıyla  $1619\text{ cm}^{-1}$  ve  $1512\text{ cm}^{-1}$ 'e kaydığı görülmektedir. Bu da  $\beta$ -düzlemsel tabaka yapısına geçişin sağlandığını ispatlamaktadır [61].

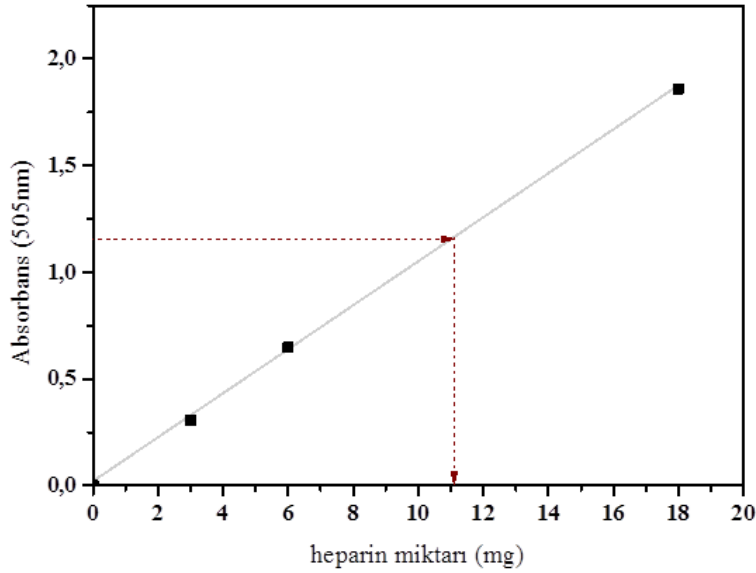
### 4.3 İmmobilize Heparin Miktarı

Heparin, granül formda mast hücrelerinde bulunan ve birçok büyüme faktörünü spesifik olarak bağlayabilen bir moleküldür. Heparinin, hücre tipine bağlı olarak hücre proliferasyonunu artırma [62] veya azaltma [63] özelliğine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanısıra heparinin yara iyileşmesinin birçok fazında görev aldığı bilinmektedir [64,65]. Ancak klinik uygulamalarda heparinin belirli terapötik konsantrasyonlarda tutulması önemlidir. Bu nedenle heparin molekülünün bir destek malzemesi üzerine immobilizasyonu, yara iyileşme prosesindeki etkisini en etkin düzeyde tutmak açısından önemlidir. Çalışmaların bu bölümünde doku iskelelerinin dermis tabakasını temsil eden ve fibroblast büyümesi, damarlaşıma gibi fonksiyonların gerçekleşeceği süngerimsi tabakaya heparin immobilize edilmiştir. İmmobilize edilen heparinin miktarı Toluidine Blue testi ile belirlenmiştir. Şekil 4.6'da heparin immobilize edilmiş ve heparin immobilize edilmemiş ipek fibroin süngerlerin Toluidine Blue ile reaksiyonu ve su ile yıkanması sonrası fotoğrafları görülmektedir. Heparin immobilize edilen süngerlerin koyu mavi bir renk aldığı, buna karşılık heparin immobilize edilmemiş süngerlerin de düşük fiziksel absorpsiyon nedeniyle açık mavi bir renkte kaldığı gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.6 :** Heparin immobilize olan (sol) ve heparin immobilize olmayan (sağ) ipek fibroin süngerlerin fotoğrafı.

İmmobilize heparin miktarı ise UV-Spektrofotometre kullanılarak standard eğriden okunmuştur. Şekil 4.7’de hazırlanan standard eğri ve okunan heparin miktarı grafik olarak verilmiştir. Buna göre 11.06 mg heparin immobilize edildiği bulunmuştur. Başlangıçta kullanılan heparin miktarının 50 mg olduğu düşünüldüğünde, heparinin yaklaşık % 22’lik bir verimle immobilize edildiği söylenebilir.

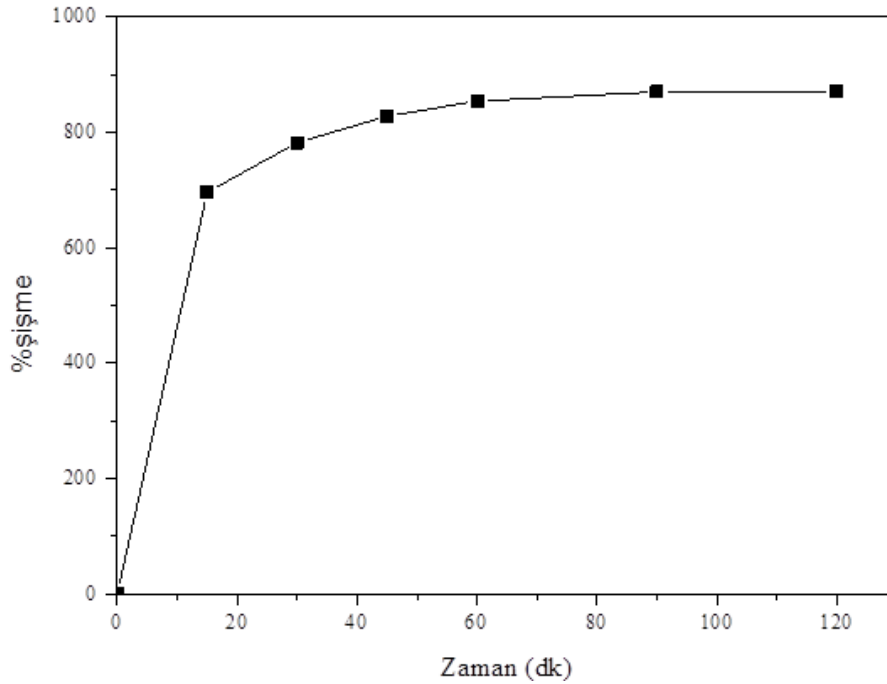


**Şekil 4.7 :** Standard eğriden immobilize heparin miktarının hesaplanması.



#### 4.4 Şişme Testi Sonuçları

Şekil 4.8’de doku iskelelerinin zamana karşı su absorblama kapasitesinin grafiği sunulmuştur. Alkol ile muamele sonrası suda çözünmeme özelliği kazanan ipek fibroinin su absorblama yeteneğinin beklenildiği gibi oldukça yüksek olduğu bulunmuştur. Yüksek gözenek yapısının da yardımıyla doku iskeleleri ilk 15 dakika içinde % 696 oranında şişme göstermişlerdir. 90 dk sonunda ise denge şişme değeri olan % 870’e kadar ulaşmıştır. Doku iskelelerinin gösterdiği bu yüksek şişme ve su absorblama kapasitesi yara iyileşmesi sürecinde eksüdanın emilimi ve yara bölgesinin uygun nemlilikte tutulması bakımından önemlidir. Hidrojel yapısındaki malzemelerin, yara bölgesindeki dokunun hidrotasyon durumuna bağlı olarak suyu absorblama veya salma yeteneğine sahiptir [66]. Bu çalışmada kullanılan ipek fibroin de suda kararlı  $\beta$ -düzlemsel tabaka yapısına sahip olduğu durumda hidrojel özelliğindedir ve yüksek oranda su absorblama yeteneği göstermektedir.

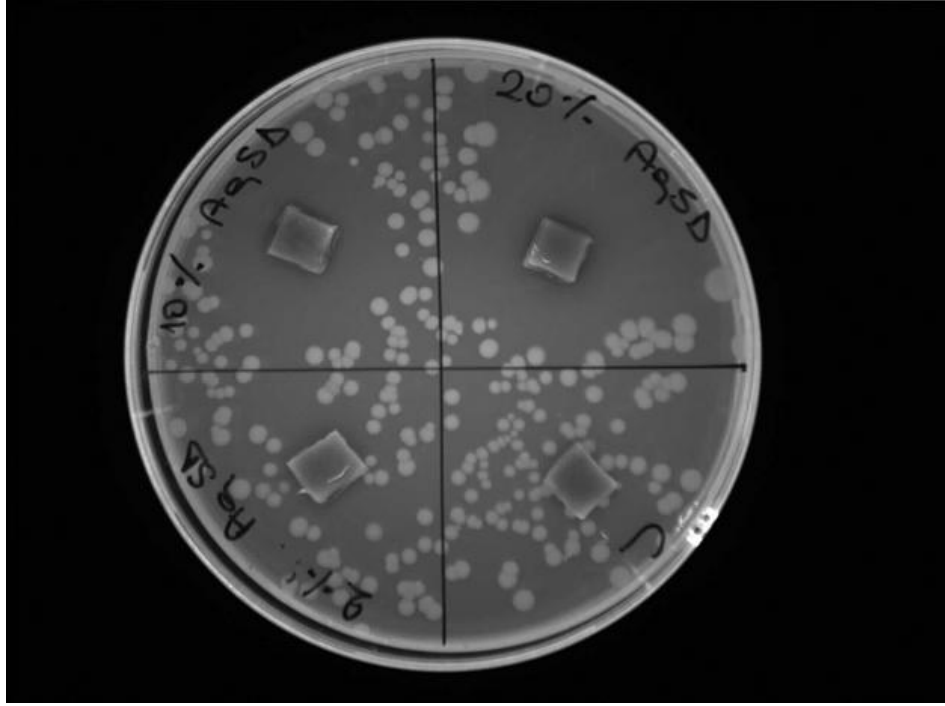


Şekil 4.8 : % Şişme oranı - Zaman grafiği.

#### 4.5 Doku İskelelerinin Antibakteriyel Özellikleri

Derinin üst tabakası epiderminin en önemli fonksiyonlarından biri dış çevreden gelen mikrobiyal saldırılara karşı bir bariyer gibi davranmaktadır. Yaralanma sonucu epiderminin yapısında oluşabilecek bir bozukluk, epiderminin bu fonksiyonunu yitirmesine dolayısıyla hasar gören bölgenin mikrobiyal saldırılara maruz kalmasına sebep olur. Bunu önlemek topikal antibiyotiklerle mümkündür. Ancak genellikle krem veya pomat şeklinde uygulanan bu ilaçların yara bölgesinde kalıcılığı ve kararlılığı düşüktür ve sıklıkla yenilenmeleri gerekir. Bu da uygulamalarda pratik değildir. Bu nedenle son yıllarda tasarlanan yara örtü malzemelerine antibakteriyel ajanlar yüklenerek daha etkin ve pratik bir yaklaşıma gidilmiştir.

Bu tez çalışmasında da yara/yanık tedavisinde etkinliği kanıtlanmış gümüş sülfadiazin değişik oranlarda doku iskelelerinin epidermisi taklit eden nanofibröz üst tabakasına elektroçirme sırasında yüklenmiştir. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi % 10 ve % 20 AgSD yüklü doku iskeleleri *Staphylococcus aureus* bakterisi ile gece boyunca inkübasyon sonucu bakteriyel inhibisyon zonu oluşturmuştur. Buna karşılık kontrol (AgSD yüklü olmayan) ve % 2 AgSD yüklü doku iskelelerinin bakteriyel inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Buradan doku iskelelerinin ancak belirli oranın üzerindeki AgSD'e sahip olduklarında antibakteriyel özellik gösterdiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca örnekler için inhibisyon zonlarının genişliği hesaplamıştır ve Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.9 : Doku iskelelerinin antibakteriyel test görüntüleri.

Çizelge 4.2 : Doku iskelelerinin antibakteriyel özellikleri.

	Kontrol	% 2 AgSD	% 10 AgSD	% 20 AgSD
Anti-bakteriyel özellik	-	-	+	+
“W” değeri (mm)	-	-	9.5	10



## 5. SONUÇ

Yara örtüleri, medikal tekstillerin giderek büyüyen önemli bir alanıdır. Özellikle, son yıllarda çok sayıda fonksiyonel polimerik yara örtüleri geliştirilmiştir. Yaranın fizyolojik özelliklerine bağlı olarak bu yara örtüleri tek başlarına ya da kombinasyonları halinde uygulanabilmektedir. Bu ürünlerin amacı, yara iyileşme sürecini hızlandırmak ve iyileştirmektir. Geniş yanıklarda ve kronik ülserasyonlarda, derinin rekonstrüksiyonu çözümü zor bir problemdir. Otolog deri greftleri, deri rekonstrüksiyonunda en ideal çözümdür. Ancak geniş yanık vakalarında, yeterli otogreft verici alan olmaması gibi zorluklarla karşılaşılır. Bunun sonucu olarak, hastalar sepsis ya da diğer komplikasyonlar nedeniyle kaybedilebilmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, diyabetik ayak ülserleri gibi kendiliğinden iyileşmesi zor olan yaralar ile derin yanıkların tedavisinde kullanılacak çift katmanlı ipek fibroin doku iskeleleri üretilmiştir. Doku iskelesinin yapımında kullanılan ipek fibroin, Bombyx Mori ipek kozalarından elde edilerek saflaştırılmıştır. Gözenekli yapıdaki ipek fibroin süngerler liyofilizasyon (dondurarak kurutma) yöntemiyle üretilmiştir. SEM analizleriyle üretilen ipek fibroin süngerlerin, dermis tabakasındaki hücre büyümesi ve yayılmasını destekleyebilecek porlu yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca doku iskelelerinin dermis tabakasını temsil eden ve fibroblast büyümesi, damarlaşma gibi fonksiyonların gerçekleşeceği süngerimsi tabakaya heparin immobilize edilmiştir.

Elde edilen ipek fibroin süngerlerin üzeri nano boyutta ipek fibroin fiberlerle film şeklinde kaplanarak derinin epidermis tabakasına benzer bir yapı elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu fiber tabakayla epidermisin bariyer ve oksijen/nem dengesini sağlama görevini gerçekleştirebilecek daha küçük gözenekli yapılar elde edilmiştir. Elde edilecek olan malzemenin bakterilere karşı bariyer özelliği göstermesi için üzerine kaplanan film tabakası büyük bir öneme sahiptir. İpek fibroin süngerlerin bu üst katmanına antibakteriyel özellik kazandırmak için gümüş sülfadiazin kullanılmıştır. Elektroçirme yöntemi ile ipek fibroin süngerlerin üzerinde gümüş sülfadiazin içeren nanofibroz membran oluşturulmuştur.

Elde edilen sünger ve çift katmanlı doku iskelelerinin morfolojik açıdan karakterizasyonu Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır. Lateral SEM görüntüleri ile iki katmanın yapısal bütünleşmesi incelenmiştir. Gümüş sülfadiazinin doku iskelesi üzerindeki varlığı ve dağılımını belirlemek amacıyla Enerji Dağılımlı X-Işınları (EDX) analizi yapılmıştır. EDX analizi ile doku iskelesine yüklenen gümüş sülfadiazinin fiberlere homojen şekilde dağıldığı gösterilmiştir. Doku iskelelerine uygulanan şişme testleri sonunda, süngerlerin % 870 şişme oranına sahip olduğu görülmüştür. Bu şişme oranı da yara iyileşmesi sırasında fibroblastların büyümesi için yeterlidir. Doku iskelelerinin antibakteriyel özelliği *S. aureus* bakterisine karşı incelenmiştir. Yapılan deneyde gümüş sülfadiazin yüklü doku iskelesi *S. aureus* bakterisine karşı antibakteriyel özellik göstermiştir.

Bu tez çalışmasında çift katmanlı ipek fibroin doku iskeleleri üretilmiştir. Bu çalışma sonunda elde edilen sonuçlar, antibakteriyel ajan yüklü yara örtü malzemelerinin yeni nesil yara örtü malzemesi olarak dermal yaraların tedavisinde iyi bir potansiyel oluşturabileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] **Wong, D. J., and Chang, H. Y.,** 2009: Skin Tissue Engineering. Program in Epithelial Biology, Stanford University, Stanford.
- [2] **Bouwstra, J. A., Honeywell-Nguyen, P. L., Gooris, G. S., and Ponec, M.,** 2003: Structure of the Skin Barrier and its Modulation by Vesicular Formulations. Progress in Lipid Research 42 1–36. Leiden University, Leiden, The Netherlands.
- [3] **Zhong, S. P., Zhang, Y. Z., and Lim, C. T.,** 2010: Tissue Scaffolds for Skin Wound Healing and Dermal Reconstruction. WIREs Nanomedicine and Nanotechnology 2:510-520.
- [4] **Metcalf, A. D., and Ferguson, M. W. J.,** 2006: Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. UK Centre for Tissue Engineering, Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester M13 9PT, UK.
- [5] **Shevchenko, R. V., James, S. L., and James, S. E.,** 2010: A Review of Tissue-Engineered Skin Bioconstructs Available for Skin Reconstruction. School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, University of Brighton, Brighton, UK.
- [6] **BlueCross and BlueShield,** 2007: Tissue-Engineered Skin Substitutes. Blue Cross and Blue Shield of Kansas Customer Service.
- [7] **MacNeil, S.,**2008: Biomaterials for Tissue Engineering of Skin. Materials today 11:26-35.
- [8] **Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D.,** 1994: Molecular Biology of the Cell. New York, Garland 971-995.
- [9] **Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. E., and Eccleston, G. M.,** 2007: Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems. Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Glasgow, UK. School of Pharmacy, The Robert Gordon University, School Hill, Aberdeen, UK.
- [6] **MacKay, D., and Miller, A. L.,** 2003: Nutritional Support for Wound Healing. Alternative Medicine Review, Volume 8, Number 4.
- [11] **Rodero, M. P., and Khosrotehrani, K.,** 2010: Skin Wound Healing Modulation by Macrophages. University of Queensland Centre for Clinical Research, Experimental Dermatology Group, Brisbane, Australia. Int J Clin Exp Pathol 2010;3(7):643-653.
- [12] **Watson, T.,** 2006: Soft Tissue Healing & Repair. Alındığı tarih: 01.03.2013, adres: <http://www.electrotherapy.org/>

- [13] **Rho, K. S., Jeong, L., Lee, G., Seo, B. M., Park, Y. J., and Hong, S. D.**, 2006: Electrospinning of Collagen Nanofibers: Effects on the Behavior of Normal Keratinocytes and Early-Stage Wound Healing. *Biomaterials* 27:1452-1462.
- [14] **Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J. S., Lu, H., Richmond, J., and Kaplan, D. L.**, 2003: Silk-based Biomaterials. *Biomaterials* 24:401-416.
- [15] **Schneider, A., Wang, X. Y., Kaplan, D. L., Garlick, J. A., and Egles, C.**, 2009: Biofunctionalized Electrospun Silk Mats as a Topical Bioactive Dressing for Accelerated Wound Healing. *Acta Biomater* 5:2570-2578.
- [16] **Powell, H. M., and Boyce, S. T.**, 2008: Fiber Density of Electrospun Gelatin Scaffolds Regulates Morphogenesis of Dermal-Epidermal Skin Substitutes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 84A:1078-1086.
- [17] **Matsumoto, Y., Arai, K., Momose, H., and Kurovanagi, Y.**, 2009: Development of a Wound Dressing Composed of a Hyaluronic Acid Sponge Containing Arginine. *J Biomat Sci-Polym E* 20:993-1004.
- [18] **Xu, S. S., Li J. X., He, A. H., Liu, W. W., Jiang, X. Y., Zheng, J. F., Hang, C. C., Hsiao, B. S., Chu, B., and Fang, D.F.**, 2009: Chemical Crosslinking and Biophysical Properties of Electrospun Hyaluronic Acid Based Ultra-Thin Fibrous Membranes. *Polymer* 50:3762-3769.
- [19] **Zhong, W., Xing, M. M. Q., and Maibach, H. I.**, 2010: Nanofibrous Materials for Wound Care. *Cutaneous and Ocular Toxicology* 29(3):143-152.
- [20] **Son, W. K., Youk, J. H., and Park, W. H.**, 2004: Antimicrobial Cellulose Acetate Nanofibers Containing Silver Nanoparticles. *Carbohydr Polym* 65:430-434.
- [21] **Schiffman, J. D., and Schauer, C. L.**, 2007: One-step Electrospinning of Cross-linked Chitosan Fibers. *Biomacromolecules* 8:2665-2667.
- [22] **Chen, G., Ushida, T., and Tateishi, T.**, 2002: Scaffold Design for Tissue Engineering. Tissue Engineering Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan. Biomedical Engineering Laboratory, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, Japan.
- [23] **Langer, R., and Vacanti, J. P.**, 1993: Tissue Engineering. *Science* 260:920-926.
- [24] **Sachlos, E., and Czernuszka, J. T.**, 2003: Making Tissue Engineering Scaffolds Work: Review on the Application of Solid Freeform Fabrication Technology to the Production of Tissue Engineering Scaffolds. Department of Materials, University of Oxford, Oxford, UK.
- [25] **Chan, B. P., and Leong, K. W.**, 2008: Scaffolding in Tissue Engineering: General Approaches and Tissue-Specific Considerations. *Eur Spine J* 17 (Suppl 4):S467-S479.



- [26] **Jean J., Garcia-Pérez, M. E., and Pouliot, R.**, 2011: Bioengineered Skin: The Self-Assembly Approach. *J Tissue Sci Eng* S5:001.
- [27] **Williams, D. F.**, 2006: To Engineer is to Create: The Link Between Engineering and Regeneration. *Trends in Biotechnology* 24:4-8.
- [28] **Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D., and Farson, D.**, 2007: Electrospinning for Tissue Engineering Scaffolds. *Materials Science and Engineering C* 27:504-509.
- [29] **Li, W. J., Laurencin, C. T., Catterson, E. J., Tuan, R. S., and Ko, F. K.**, 2001: Electrospun Nanofibrous Structure: A Novel Scaffold for Tissue Engineering. Wiley Periodicals, Inc. 613-621.
- [30] **Thomson, R. C., Yaszemski, M. J., and Mikos, A. G.**, 1997: Polymer Scaffold Processing and Principles of Tissue Engineering. T.X. Austin, R.G Landes 263-271.
- [31] **Reddi, A. H.**, 2000: Morphogenesis and Tissue Engineering of Bone and Cartilage: Inductive Signals, Stem Cells, and Biomimetic Materials. *Tissue Eng* 6:351-359.
- [32] **Freyman, T. M., Yannas, I. V., and Gibson, L. J.**, 2001: Cellular Materials as Porous Scaffolds for Tissue Engineering. *Progress in Materials Science* 46:273-282.
- [33] **MacNeil S.**, 2007: Progress and Opportunities for Tissue-Engineered Skin. The Tissue Engineering Group, Department of Engineering Materials and Division of Biomedical Sciences and Medicine, Kroto Research Institute, North Campus, University of Sheffield, Broad Lane, Sheffield, UK.
- [34] **Huang, S., and Fu, X.**, 2011: Tissue-Engineered Skin: Bottleneck or Breakthrough. Wound Healing and Cell Biology Laboratory, Institute of Basic Medical Sciences, General Hospital of PLA, Beijing, China. Burns Institute, The First Affiliated Hospital, General Hospital of PLA, Trauma Center of Postgraduate Medical College, Beijing, China.
- [35] **Zhang, Z., and Michniak-Kohn, B. B.**, 2012: Tissue Engineered Human Skin Equivalents. New Jersey Center for Biomaterials, Rutgers-The State University of New Jersey, Piscataway, USA. Ernest Mario School of Pharmacy, Department of Pharmaceutics, Rutgers-The State University of New Jersey, Piscataway, USA.
- [36] **Khang, G., Kim, M. S., and Lee, H. B.**, 2007: A Manual for Biomaterials & Scaffold Fabrication Technology. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore.
- [37] **Zhang, H., Li, L., Dai, F., Zhang, H., Ni, B., Zhou, W., Yang, X., and Wu, Y.**, 2012: Preparation and Characterization of Silk Fibroin as A Biomaterial with Potential for Drug Delivery. *Journal of Translational Medicine*, 10:117.

- [38] **Meinel, A. J., Kubow, K. E., Klotzsch, E., Garcia-Fuentes, M., Smith M. L., Vogel, V., Merkle, H. P., and Meinel, L.,** 2009: Optimization Strategies for Electrospun Silk Fibroin Tissue Engineering Scaffolds. Institute of Pharmaceutical Sciences, ETH Zurich, Department for Chemistry and Applied Biosciences, Zurich, Switzerland. Laboratory for Biologically Oriented Materials, ETH Zurich, Wolfgang-Pauli-Strasse, Zurich, Switzerland.
- [39] **Sashina, E. S., Bochek, A. M., Novoselov, N. P., and Kirichenko, D. A.,** 2006: Structure and Solubility of Natural Silk Fibroin. St. Petersburg State University of Technology and Design, St. Petersburg, Russia. Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia.
- [40] **Hu, Y., Zhang, Q., You, R., Wang, L., and Li, M.,** 2012: The Relationship between Secondary Structure and Biodegradation Behavior of Silk Fibroin Scaffolds. National Engineering Laboratory for Modern Silk, College of Textile and Clothing Engineering, Soochow University, Industrial Park, Suzhou, China.
- [41] **Baimark, Y., Srihanam, P., and Srisuwan, Y.,** 2009: Preparation of Flexible Silk Fibroin Film Plasticized with Glucose. Center of Excellence for Innovation, Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham, Thailand.
- [42] **Prasong, S., Wilaiwan, S., and Nualchai, K.,** 2010: Structure and Thermal Characteristics of Bombyx Mori Silk Fibroin Films: Effect of Different Organic Solvents. Mahasarakham University, Thailand. Kalasin Rajabhat University, Thailand.
- [43] **Lanza, R. P., Langer, R., and Vacanti, J.,** 1993: Principles of Tissue Engineering. Second Edition, Elsevier Inc. China.
- [44] **Liu, C., Xia, Z., and Czernuszka, J. T.,** 2007: Design and Development Of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. Department of Materials, University of Oxford, Oxford, UK. Botnar Research Centre, Nuffield Department of Orthopaedic Surgery, University of Oxford, Nuffield Orthopaedic Centre, Headington, Oxford, UK.
- [45] **Subia, B., Kundu, J., and Kundu, S. C.,** 2010: Biomaterial Scaffold Fabrication Techniques for Potential Tissue Engineering Applications. Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology, Kharagpur, India.
- [46] **Bhardwaj, N., and Kundu, S.B.,** 2010: Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique. *Biotechnology Advances* 28:325-347.
- [47] **Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. E., and Eccleston, G.M.,** 2008: Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97:2892-2923.
- [48] **Miller, A. C., Rashid, M. R., Falzon, L., Elamin, M. E., and Zehtabchi, S.,** 2010: Silver Sulfadiazine for the Treatment of Partial-Thickness Burns and Venous Stasis Ulcers. Bethesda, Maryland; Pittsburgh, Pennsylvania; Houston, Texas; New York, New York; and Tampa, Florida.

- [49] **Muangman, P., Muangman, S., Keorochana, K., Roeksomtawin, S., Somcharit, L., and Chuntrasakul, C.,** 2007: Advantages of Urgotul S.S.D over Silver Sulfadiazine Cream in the Outpatient Management of Partial Thickness Burns. Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- [50] **Atiyeh, B. S., Costagliola, M., Hayek, S. N., and Dibo, S. A.,** 2007: Effect of Silver on Burn Wound Infection Control and Healing. Division Plastic and Reconstructive Surgery, American University of Beirut Medical Center, Beirut, Lebanon. Department of Plastic Surgery, University of Toulouse, Toulouse, France.
- [51] **Papini, R. P., Wilson, A. P., and Steer, J. A., et al.,** 1995: Wound Management in Burn Centres in the United Kingdom. *Br J Surg*; 82: 505-509.
- [52] **Feng, Q. L., Wu, J., and Chen, G. Q., et al.,** 2000: A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect Of Silver Ions On Escherichia Coli And Staphylococcus Aureus. *J Biomed Mater Res*; 52: 662-668.
- [53] **Warriner, R., and Burrell, R.,** 2005: Infection and the Chronic Wound: A Focus on Silver. *Adv Skin Wound Care*; 18: 2-12.
- [54] **Wiegand, C., Heinze, T., and Hipler, U. C.,** 2009: Comparative In Vitro Study on Cytotoxicity, Antimicrobial Activity, and Binding Capacity for Pathophysiological Factors in Chronic Wounds of Alginate and Silver-Containing Alginate. *Wound Repair Regen*; 17: 511-521.
- [55] **Berry, C. C., Campbell, G., Spadicino, A., Robertson, M., and Curtis, A. S.,** 2004: The Influence of Microscale Topography on Fibroblast Attachment and Motility. *Biomaterials*. 25(26): 5781-5788.
- [56] **Lee, S. J., Lee, I. W., Lee, Y. M., Lee, H. B., Khang, G.,** 2004: Macroporous Biodegradable Natural/Synthetic Hybrid Scaffolds as Small Intestine Submucosa Impregnated Poly(D, L-Lactide-Co-Glycolide) for Tissue-Engineered Bone. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 15:1003–1017.
- [57] **Boyan, B. D., Hummert, T. W., Dean, D. D., and Schwartz, Z.,** 1996: Role of Material Surfaces in Regulating Bone and Cartilage Cell Response. *Biomaterials*. 17(2): 137–146.
- [58] **Ghosh, S., Parker, S. T., Wang, X., Kaplan, D. L., and Lewis J. A.,** 2008: Direct-Write Assembly of Microperiodic Silk Fibroin Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Advanced Functional Materials*. 18 (13):1883–1889.
- [59] **Dyakonov, T., Yang, C. H., Bush, D., Gosangari, S., Majuru, S., and Fatmi, A.,** 2012: Design and Characterization of a Silk-Fibroin-Based Drug Delivery Platform Using Naproxen as a Model Drug. *Journal of Drug Delivery*. Article ID 490514, 10 pages.
- [60] **Um, I. C., Kweon, H. Y., Park, Y. H., and Hudson, S.,** 2001: Structural Characteristics and Properties of the Regenerated Silk Fibroin Prepared from Formic Acid. *Int J Biol Macromol*. 20;29(2):91-7.
- [61] **Amiraliyan, N., Nouri, M., and Kish, M. H.,** 2010: Structural Characterization and Mechanical Properties of Electrospun Silk Fibroin Nanofiber Mats. *Polymer Science*. Vol. 52, No. 4, pp. 407–412.

- [62] **Flint, N., Cove, F. L., and Evans, G. S.**, 1994: Heparin Stimulates the Proliferation of Intestinal Epithelial Cells in Primary Culture. *J Cell Sci.*; 107: 401–411.
- [63] **Fager, G., Hansson, G. K., Ottosson, P., Dahlo, B., and Bondjers G.**, 1988: Human Arterial Smooth Muscle Cells in Culture. Effects of Platelet-Derived Growth Factor and Heparin on Growth In Vitro. *Exp. Cell Res.*; 176: 319–335.
- [64] **Ljunqvist, U., and Zederfeldt, B.**, 1968: The Effect of High Viscous Dextran and Heparin on Wound Healing. *Acta Chir Scan.*134: 321–5.
- [65] **McPherson, J., Ledger, P., and Ksander, G., et al.**, 1988: The Influence of Heparin on the Wound Healing Response to Collagen Implant In Vivo. *Cell Relat Res.* 8:83–100.
- [66] **Karen, L. K., Karen, L. E., and James, B. L.**, 2010: Hydrogel Dressings. in *Advances in Wound Care, Volume 1.* Mary Ann Liebert, Inc. Publishers. 131-136.

## ÖZGEÇMİŞ



**Ad Soyad:** Candan Özge Çakır

**Doğum Yeri ve Tarihi:** 31.10.1986

**Adres:** Petrol İş Mah. Besim Paşa Sk. No:11/14 Kartal/İSTANBUL

**E-Posta:** c\_ozgecakir@hotmail.com

**Lisans:** Kocaeli Üniversitesi-Metalurji ve Malzeme Mühendisliği

**Yüksek Lisans :** Yalova Üniversitesi Polimer Mühendisliği