

**3B BİYOYAZICI TEKNOLOJİSİ İLE CERRAHİ SONRASI PERİTONEAL
ADEZYONLARIN ÖNLENMESİNE YARDIMCI LİDOKAİN YÜKLÜ
NANOPARTİKÜL İÇEREN MEMBRAN GELİŞTİRİLMESİ**

Demet ÇÖÇÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Ocak 2020

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Demet ÇÖÇÜ'nün “3B Biyoyazıcı Teknolojisi ile Cerrahi Sonrası Peritoneal Adezyonların Önlenmesine Yardımcı Lidokain Yüklü Nanopartikül İçeren Membran Geliştirilmesi” başlıklı tezi 20/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı):	Prof. Dr. Arzu ERSÖZ	
Üye	: Doç. Dr. Bora GARİPCAN	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÜNLÜER	

Enstitü Müdürü

ÖZET

3B BİYOYAZICI TEKNOLOJİSİ İLE CERRAHİ SONRASI PERİTONEAL ADEZYONLARIN ÖNLENMESİNE YARDIMCI LİDOKAİN YÜKLÜ NANOPARTİKÜL İÇEREN MEMBRAN GELİŞTİRİLMESİ

Demet ÇÖÇÜ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2020

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Yapılan çalışmada, 3B biyoyazıcı teknolojisi kullanılarak, cerrahi sonrası peritoneal adezyonların önlenmesine yardımcı, operasyon bölgesinde analjezi sağlamak amacıyla lidokain moleküler bellekli nanopartikül içeren, kullanımı kolay, biyoyumlu ve biyobozunur membran geliştirilmiştir. Üretilen membranın yüksek biyoyumluluğa sahip olması gerektiğinden, 3B biyoyazıcıda basımı yapılacak biyomürekkep, izole edilen kolajen, karboksimetilselüloz ve sentezlenen lidokain moleküler bellekli nanopartiküllerden oluşmaktadır. 3B biyobasım ile üretilen membran, çapraz bağlama ajanı olan EDC/NHS ve sitrik asit ile çapraz bağlanmıştır.

Membranın karakterizasyon çalışmaları; SEM, optik mikroskop, şişme testi, biyoyumluluk ve biyobozunurluk testleri ile yapılmıştır. Ayrıca ilaç salım çalışmaları HPLC ile analiz edilip, kümülatif olarak hesaplanmıştır.

Geliştirilen peritoneal adezyonları önlemeye yardımcı membranın biyoyumluluğu, adezyon gelişimi için kritik süre olan ilk 7 gün yapı bütünlüğünü yüksek oranda koruması, yüksek su tutma kapasitesiyle sonuçlanan hidrofilik özelliği, yoğun gözenekli yapısı ve hızlı lidokain salım profili ile rejeneratif tıp yaklaşımı olarak doku mühendisliği alanında kullanıma uygun yenilikçi bir üründür.

Anahtar Sözcükler: 3B biyoyazıcı, kolajen, lidokain, peritoneal adezyon, rejeneratif tıp

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF MEMBRANE CONTAINING LIDOCAINE EMBEDDED NANOPARTICLE HELPING PREVENTION OF PERITONEAL ADHESIONS POST-SURGERY WITH 3D BIOPRINTER TECHNOLOGY

Demet ÇÖÇÜ

Department of Chemistry

Programme in Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Sciences, January 2020

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

In this study, an easy to use, biocompatible, biodegradable membrane containing lidocaine molecular memory nanoparticles has been developed to help prevent postoperative peritoneal adhesions and to provide analgesia at the site of operation using 3D bioprinter technology. The produced membrane must have high biocompatibility, the bio-ink to be printed in the 3D bioprinted consists of isolated collagen, carboxymethylcellulose, and synthesized lidocaine molecular imprinted nanoparticles. The membrane produced by 3D bioprinted is cross-linked with EDC/NHS and citric acid, the cross-linking agent.

Membrane characterization studies have been realized with SEM, optical microscope, swelling ratio, biocompatibility and biodegradability tests. Drug release studies have also been analyzed by HPLC and calculated cumulatively.

The biocompatibility of the membrane, which helps prevent peritoneal adhesion, maintains structure for the first 7 days of the critical time for adhesion development, the hydrophilic properties leading to high swelling rate, the highly porous structure and the rapid lidocaine release profile are an innovative and suitable for use in tissue engineering.

Keywords: 3D bioprinter, collagen, lidocaine, peritoneal adhesion, regenerative medicine

TEŞEKKÜR YAZISI

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde desteği, yol göstericiliği ve anlayışı için değerli hocam, tez danışmanım, bilim insanı Prof. Dr. Arzu ERSÖZ'e,

Çalışmalarımız boyunca bilgilerini bizlerle paylaşan, yol gösteren değerli bilim insanı Prof. Dr. Rıdvan SAY'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini paylaşan Prof. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ, Doç. Dr. Rüstem KEÇİLİ, Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÜNLÜER'e,

Laboratuvar çalışmalarımda bilgisini ve yardımını esirgemeyen sevgili Dr. Şennur GÖRGÜLÜ'ye,

Sevgili çalışma arkadaşlarım; Didem TOKLU, Kardelen ECEVİT, Banuay COŞKUN, Çiçek KIR, Yiğitcan SÜMBELLİ, Esra Ülkü KAYA'ya,

Yüksek lisans eğitimi alma kararımda ve eğitim sürecim boyunca, beni daima destekleyen ve yanımda olan sevgili annem Ülkü ÇÖÇÜ, sevgili babam Sefa ÇÖÇÜ, sevgili kardeşlerim Bülent ÇÖÇÜ ve Levent ÇÖÇÜ, sevgili dostum Elmas ENİŞ'e,

Yüksek lisans eğitimi alma kararımda beni destekleyen ve yanımda olan sevgili Dr. Zeki ÖZER'e,

En içten saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Demet ÇÖÇÜ

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Demet ÇÖÇÜ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR YAZISI	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GÖRSELLER DİZİNİ	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Rejeneratif Tıp Yaklaşımı Olarak Doku Mühendisliği	2
1.2. 3B Biyobaskı Teknolojisi.....	4
1.2.1. Biyomalzeme Seçimi	5
1.2.1.1. Doğal polimerler	5
1.2.1.2. Sentetik polimerler	6
1.2.1.3. Kompozit karışımlar.....	6
1.2.1.4. Kolajenin Yapısı ve Önemi	7
1.2.1.5. Karboksimetilselüloz	10
1.3. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi	10
1.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi	11
1.4.1. Lidokain	12
1.4.2. Miniemülsiyon Polimerizasyonu	13
1.5. Periton ve Yapısı.....	14
1.6. Adezyon Oluşumu.....	15
1.6.1. Adezyonların oluşumunda rol oynayan faktörler.....	17
1.6.1.1. Cerrahi operasyonlarda doku hasarı	17
1.6.1.2. İskemi.....	17
1.6.1.3. Periton bölgesinde fibrinolitik sistem yetersizliği	17
1.6.1.4. Büyüme faktörleri	17
1.6.1.5. Enfeksiyonlar.....	17

	<u>Sayfa</u>
1.6.1.6. <i>Ameliyat ipliği</i>	17
1.6.1.7. <i>Yabancı materyaller</i>	18
1.6.2. Adezyon oluşumunu önleyici uygulamalar	18
2. MATERYAL VE YÖNTEM	20
2.1. Kolajen İzolasyonu	20
2.1.1. Kolajen karakterizasyonu	21
2.2. Lidokain Moleküler Baskılı Nanoparçacıkların Sentezi.....	23
2.2.1. Lidokain moleküler baskılı ve baskısız nanopartiküllerin karakterizasyonu.....	24
2.3. 3B Biyobasım Çalışmaları.....	26
2.3.1. Peritoneal adezyonların önlenmesine yardımcı membran üretimi için biyomalzeme seçimi.....	26
2.3.2. Biyobasılabilirlik.....	27
2.3.3. Hücre Çoğaltılması ve 3B Hücre Kültürü.....	27
2.3.4. Peritoneal adezyonların önlenmesine yardımcı membran geliştirilmesi.....	27
2.3.5. Peritoneal adezyonların önlenmesine yardımcı membran karakterizasyonu.....	28
2.3.6. Peritoneal adezyonların önlenmesine yardımcı membrandan lidokain salım çalışmaları	29
3. SONUÇLAR	30
3.1. Kolajen İzolasyonu	30
3.1.1. Sirius Red ile kolajen miktar tayini	30
3.1.2. FT-IR analizi.....	30
3.1.3. UV-Vis spektroskopisi	31
3.1.4. SDS-Page analizi	32
3.1.5. CD analizi.....	33
3.2. Lidokain Moleküler Baskılı ve Baskısız Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	33
3.2.1. FT-IR analizi.....	33
3.2.2. SEM analizi	34
3.2.3. Lidokain bağlanma çalışmaları.....	35

	<u>Sayfa</u>
3.2.4. Kinetik çalışmalar	36
3.2.5. pH etkisi	38
3.2.6. Lidokainin yapay vücut sıvısı ortamında bağlanma çalışmaları .	38
3.2.7. Seçicilik çalışmaları	39
3.2.8. Desorbsiyon ve tekrar kullanılabilirlik	40
3.3. 3B Biyobasım Çalışmaları	40
3.3.1. Peritoneal adezyonların önlenmesine yardımcı membran karakterizasyonu	40
3.3.1.1. 3B Basılabilirlik	40
3.3.1.2. Biyouyumluluk	42
3.3.1.3. SEM analizi	44
3.3.1.4. Biyobozunurluk çalışmaları	45
3.3.1.5. İlaç salım çalışmaları	47
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	50
KAYNAKÇA	54

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. Kolajen türleri.....	8
Tablo 2. 1. Kullanılan cihazlar.....	20
Tablo 2. 2. SDS-PAGE jel içeriği.....	22
Tablo 2. 3. Vücut sıvısı iyonik bileşimi.....	26
Tablo 3. 1. 3B Biyobaskı parametreleri.....	40
Tablo 3. 2. MTT testi sonuçları.....	43



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. 1. Klasik doku mühendisliği yaklaşımı	3
Şekil 1. 2. 3B biyobaskı teknolojisi ile üretilen a) hava yolu ateli, b) aort kapağı doku ikameleri.....	4
Şekil 1. 3. Kolajenin üçlü sarmal yapısı.....	7
Şekil 1. 4. Kolajen proteinlerinin kendiliğinden çapraz bağlanması	8
Şekil 1. 5. Karboksimetilselülozun yapısı	10
Şekil 1. 6. Lidokainin moleküler yapısı	12
Şekil 1. 7. Emülgatör molekülünün yapısı	13
Şekil 1. 8. Miniemülsiyon sonikasyon sürecinin şematik gösterimi.....	14
Şekil 1. 9. Adezyon oluşum mekanizması.....	16
Şekil 2. 1. Miniemülsiyon hazırlanması şematik gösterimi	24
Şekil 2. 2. Lidokain moleküler baskılı nanopartiküllerin sentezi	24
Şekil 3. 1. Kolajenin FT-IR spektrumu	31
Şekil 3. 2. Kolajenin UV spektrumu	32
Şekil 3. 3. Kolajen CD spektrumu	33
Şekil 3. 4. FT-IR Spektrumları A) Lidokain B) NIP C) MIP D) Yıkama yapılmamış MIP.....	34
Şekil 3. 5. a) Lidokain moleküler baskılı b) Lidokain moleküler baskısız nanopartiküllerin SEM görüntüleri.....	35
Şekil 3. 6. Lidokainin derişimlerinin nanopartiküllere bağlanma üzerindeki etkisi	36
Şekil 3. 7. Lidokainin moleküler baskılı ve moleküler baskısız nanopartiküllere bağlanmasında zamanın etkisi.....	37
Şekil 3. 8. Lidokain baskılı nanopartiküllerin Scatchard eğrileri	37
Şekil 3. 9. Lidokainin moleküler baskılı nanopartiküllere bağlanmasında pH etkisi	38
Şekil 3. 10. a) Lidokain b) Bupivakain moleküler yapısı	39
Şekil 3. 11. Moleküler baskılı (MIP) ve moleküler baskılanmamış (NIP) nanopartiküllerin lidokain seçiciliği.....	39
Şekil 3. 12. Lidokain moleküler baskılı nanopartiküllerin tekrar kullanılabilirliği	40

Şekil 3. 13. Kolajen/Karboksimetilselüloz biyomalzeme optik mikroskop görüntüleri (A) %2,5 (w/v), (B) %4 (w/v) CMC, (C) %7 (w/v) CMC, (D-E) Lidokain-%1 (w/v) kolajen-%7,5 (w/v) CMC, (F-G) Lidokain MIP nanopartiküller - %1 (w/v) kolajen-%7 (w/v) CMC.....	41
Şekil 3. 14. Doku iskeleleri üzerinde canlılıklarını sürdüren hücrelerin mikroskop görüntüleri.....	43
Şekil 3. 15. CCD-19Lu (ATCC®CCL-210TM) akciğer fibroblast hücre sayısı kalibrasyon grafiği.....	43
Şekil 3. 16. a) %1 kolajen-%7 CMC-MIP doku iskelesinin SEM görüntüleri b) %1 kolajen-%7,5 CMC- Lidokain doku iskelesinin SEM görüntüleri.....	44
Şekil 3. 17. %1 kolajen-%7 CMC-MIP doku iskelelerinin; a) zamana göre biyobozunum profili b) zamana göre kütle kaybı içerisindeki % kolajen miktar kaybı.....	45
Şekil 3. 18. %1 kolajen-%7,5 CMC-Lidokain doku iskelelerinin; a) zamana göre biyobozunum profili.....	46
Şekil 3. 19. Lidokain HPLC kalibrasyon grafiği.....	47
Şekil 3. 20. %1 kolajen-%7 CMC-MIP doku iskelesinden lidokain salımı	48
Şekil 3. 21. %1 kolajen-%7,5 CMC-Lidokain doku iskelesinden lidokain salımı	48

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 1. 1. Joseph Lister görüntüsü, Walter William Ouless'in yağlı boya tablosu Wellcome Kütüphanesi'nin izniyle, Londra); William Macewen görüntüsü, Charles R. Dowell'in yağlı boya tablosu (Glasgow Kraliyet Hekimler ve Cerrahlar Koleji izniyle); 1875'de hazırlanmış, yağ içerisindeki catgut (King's Koleji izniyle, Londra)9	9
Görsel 3. 1. Sirius Red boyası ile kolajenin etkileşimi.....30	30
Görsel 3. 2. Kolajenin SDS-PAGE görüntüsü.....32	32
Görsel 3. 3. 3B Basılabilir biyomürekkep.....41	41
Görsel 3. 4. (A) Çapraz bağlanmış doku iskelesi, (B-C) Çapraz bağlama sonrası yıkama işlemi ve hemen sonrası, (D) Çapraz bağlanmış doku iskelesinin yapısal mukavemeti (E) Liyofilize edilen doku iskelesi.....42	42
Görsel 3. 5. Biyobozunurluk Çalışması (A) Liyofilize edilmiş doku iskelesi (B) 1. gün sonu, (C) 7. gün sonu, (D) 15. gün sonu, (E) 21. gün sonu liyofilize edilmiş doku iskelesi.....47	47

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIBN	: Azobisisobütironitril
APS	: Amonyum Persülfat
EDC	: 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) karbodiimit
EGDMA	: Etilen Glikol Dimetakrilat
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (Fouirer Transform Infrared)
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MAA	: Metakrilik Asit
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NHS	: N-hidroksisüksinimid
PDGF	: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat–Poliakrilamid jel Elektroforez
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TGF-s	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-s

1. GİRİŞ

Son yıllarda koruyucu sağlık hizmetleri kapsamında hastalıkları önleme amacıyla büyük yatırımlar yapılmaktadır. Bu yatırımların çoğu, AR-GE (araştırma ve geliştirme) hizmetlerinin artışına sebebiyet vermektedir. Halk sağlığını tehdit eden olgulardan bir tanesi de doku adezyonlarıdır. Günümüzde gelişen tıbbi yöntemlerin etkisiyle abdominal operasyonların sürekli yapılıyor olması, postoperatif peritoneal yapışıklıkların (adezyon) daha sık gelişmesine sebep olmuştur.

Adezyonlar, yüksek oranda batın ameliyatlarından sonra gelişmektedir. Bu adezyonların çoğu adezyolizis olarak bilinen yapışıklığı ayırmak amacıyla ikinci bir operasyon gerektirir. Cerrahi yönden bakıldığında, peritoneal adezyonlardan kaynaklanan en önemli morbitide intestinal obstrüksiyonlardır [1].

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki adezyolizis prosedürleriyle ilişkili yatan hasta bakımı ve harcamaları üzerine kapsamlı bir çalışma 1988 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, adezyolizis sebebiyle 303.836 kişinin hastaneye yatışı (ABD'deki hastaneye yatışların %1'i), 846.415 gün yatış süresi ve 1,33 milyar dolar maliyet oluşturduğunu göstermiştir. Ayrıca, maliyet, laboratuvar testleri, endoskopiler, görüntüleme, ambulans servisi, danışmanlık hekimi masrafları, taburcu sonrası masraflar, iş günü veya verimlilik kayıpları, erken ölüm oranlarının toplumsal maliyeti gibi diğer harcamaları içermemektedir [2].

Tez kapsamında, 3 boyutlu (3B) biyoyazıcı teknolojisi kullanılarak, cerrahi sonrası peritoneal adezyonların önlenmesine yardımcı, operasyon bölgesinde analjezi sağlamak amacıyla lidokain yüklü nanopartikül içeren kullanımı kolay, biyouyumlu, maliyeti düşük membran geliştirilmiştir.

Yüksek biyouyumluluk ve biyobozunurluk sergileyen kolajen ve karboksimetilselülozdan geliştirilen membranın, periton yüzeyleri arasında mekanik bir bariyer görevi üstlenmesi, ayrıca yapısına eklenen lidokainin operasyon bölgesinde analjezi sağlaması ve bunun sonucunda oksidatif stresi azaltması beklenmektedir. Lidokain kullanımıyla, postoperatif intravenöz yüksek analjezi gereksinimi minimuma indirilip, hem olası sistemik komplikasyonların önüne geçilmiş olunacak hem de hasta bakım ve tedavi maliyetleri azalacaktır. 3B biyoyazıcı teknolojisi ile üretilen doku iskelelerinin, operasyon bölgesinde adezyonu önlemesinin yanı sıra analjezi sağlaması, mevcut adezyon önleyici membran ve filmlere kıyasla yenilikçi hedefleri barındırmakta ve tez çalışmasına özgünlük katmaktadır.

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar şu ana başlıklar altında toplanmaktadır:

- Biyolojik bir materyalden Tip 1 kolajen izolasyonu,
- Lidokain molekül bellekli nanopartiküllerinin sentezlenmesi,
- Biyomürekkep hazırlanması ve 3B biyoyazıcı ortamında biyobasım işleminin gerçekleşmesidir.

1.1. Rejeneratif Tıp Yaklaşımı Olarak Doku Mühendisliği

Rejeneratif (yenileyici) tıp; yaşlanma, doğuştan bozukluklar, travmaya bağlı hasarlar ya da hastalıklar nedeniyle işlevini kaybeden hücre, doku veya organların normal fonksiyonunu yeniden yerine getirmesi amacıyla onarım, yerine koyma veya yenilenmesi işlemlerini kapsamaktadır.

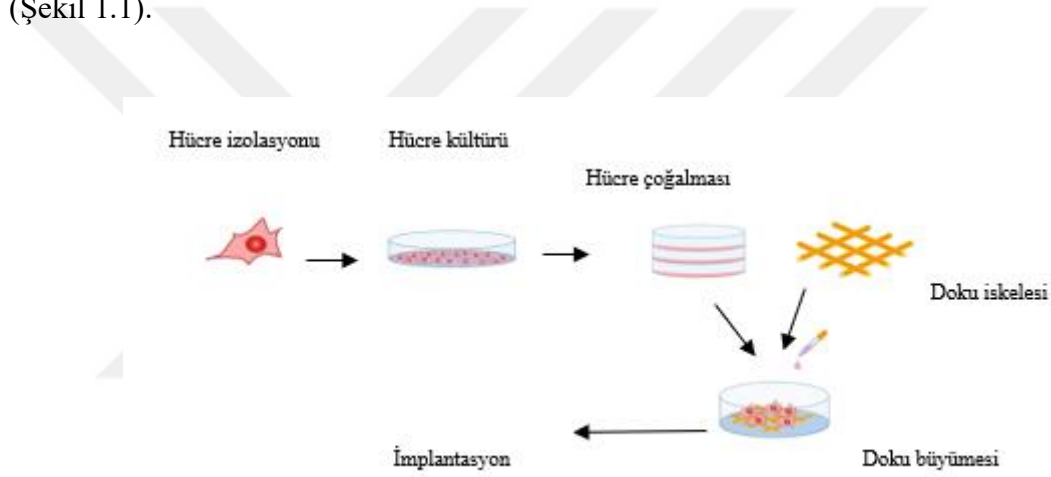
Rejeneratif tıptan üç alanda fayda sağlanılmaktadır;

1. Rejuvenasyon (gençleştirme); iyileşme için vücudun doğal işlevlerini arttırma,
2. Replasman (değiştirme); hasarlı organı sağlıklı organ ile değiştirerek yenileme (organ nakli),
3. Rejenerasyon (yenilenme); kişinin kendi hücrelerine veya kök hücrelerine laboratuvar ortamında belirli işlemler uygulayarak, kişiye yeniden vermek şeklinde problemlili dokuların yenilenmesini sağlamak olarak sıralanabilir.

Mevcut tedavi yöntemleri hastadan alınan dokunun yine aynı hastaya ait hasarlı bölgeye aktarımı (otogreft), bir kişiden diğerine (allogreft) aktarımı veya hayvandan insana (xenogreft) aktarımı üzerinde yoğunlaşmaktadır. Otogreftleri elde etme süreci oldukça pahalı ve ağırlı olmasının yanı sıra, donör bölge ile ilgili anatomik kısıtlamalar, hematoma gibi problemlerle de karşılaşmaktadır. Benzer şekilde, allogreftler ve xenogreftlerin tüm hastaların bu tedaviye erişiminin olmayışı, hastanın bağışıklık sistemi tarafından reddedilme riski ve donör kaynaklı enfeksiyon ve hastalıklar nedeniyle ciddi kısıtlamalara sahiptir [3].

Doku mühendisliği terimi kavramsal olarak 1988 yılında, mühendislik ve yaşam bilimlerinin ilke ve yöntemlerinin uygulanması, normal ve patolojik memeli dokularında yapı-fonksiyon ilişkilerinin anlaşılması ve doku fonksiyonunu iyileştirmek için biyolojik ikamelerin geliştirilmesi temel anlayışıyla ortaya konmuştur [4]. Kimya, fizik, malzeme bilimi, mühendislik, hücre biyolojisi, genetik ve tıp gibi birçok bilim dalını bir araya getiren disiplinler arası bir bilimsel çalışma alanıdır [5].

Hücreler ve biyomalzemeler, doku mühendisliği uygulamalarının temel yapı taşlarını oluşturmaktadır. Doku oluşumuna destek olarak kullanılan biyomateriyaller ‘*scaffold*’ denilen doku iskeleleridir [6]. Doku mühendisliğinde yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya olmak üzere 2 farklı yaklaşım kullanılmaktadır. Aşağıdan yukarıya yaklaşımda; hücre tabakaları, hücre agregatları ve biyobaskılama ile doku oluşumu gerçekleşmektedir. Yukarıdan aşağıya yani doku iskelesi temelli yaklaşımda ise biyoyumlu, biyobozunur, mekanik ve morfolojik olarak doğal dokuyu taklit edebilen polimerik veya kompozit yapıda, gözenekli doku iskeleleri kullanılmaktadır. Dokuların ve organların yenilenmesi için uygun ortamı sağlayan, hücre dışı matrisi taklit edebilen 3 boyutlu iskele kullanımı gerekli olup, hücreler burada doku iskelelerine ekilmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1. 1. Klasik doku mühendisliği yaklaşımı

Doku mühendisliği alanında kullanılan en güncel uygulamalardan birisi 3B biyoyazıcı teknolojisi. Rejeneratif tıp uygulaması ilk olarak Anthony Atala [7] ve ekibi tarafından 3B biyobaskı teknolojisi kullanılarak mesane üretilmesi ve 2006 yılında hastalık sonucu mesanesi alınan hastaya nakledilmesi şeklindedir. Kolajen ve poliglaktolik asitten oluşan yapı iskelesine, spina bífida hastası çocuğun kendi mesane hücrelerinden alınan otogenik urotal ve düz kası hücreleri ekilmesi ile yapay mesane üretilmiştir. Nakil yapılan hastanın mesane fonksiyonu artmış ve bu durum organ üretiminde öncü bir çalışma olmuştur.

1.2. 3B Biyobaskı Teknolojisi

Rejeneratif tıp alanında çalışan birçok araştırmacı, son zamanlarda biyoyazıcı teknolojisi ile biyomimetik mimariler geliştirmeye çalışmışlardır. Biyoyazıcı uygulamaları, doku mühendisliği içinde bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır. Bu teknoloji canlı hücreleri, biyomalzemeleri ve biyoaktif molekülleri kullanan iki boyutlu (2B) veya 3B bir üretim yöntemidir. Biyoyazıcı teknolojisi kullanılarak, çoklu hücre tiplerinden oluşan doku veya organ benzeri mimariler üretilebilmektedir. Ayrıca, bu tür baskı işlemleri bilgisayar destekli tasarım şablonları aracılığıyla otomatik hale getirilmiştir [8,9].

3B baskı ilk olarak 1986 yılında Charles W. Hull [10] tarafından tanımlanmıştır. ‘Sterolitografi’ adını verdiği yöntem, ultraviyole ışıkla sertleştirilebilen ince bir malzemenin, katı bir 3B yapı oluşturmak üzere sırayla katmanlar halinde basılması işlemidir. Sonrasında, hücre biyolojisi ve malzeme bilimindeki son gelişmelerle 3B biyobaskı teknolojisi doku mühendisliği formunu mümkün kılmıştır [11]. 3B biyobaskı teknolojisi kullanılarak Şekil 1.2’de gösterilen trakeal (hava yolu) ateli ve aort kapağı gibi doku ikameleri üretilebilmektedir [12,13].



Şekil 1. 2. 3B biyobaskı teknolojisi ile üretilen **a)** hava yolu ateli [12], **b)** aort kapağı [13] doku ikameleri

3B biyoyazıcılar, çalışma prensiplerine göre damlacık temelli, lazer temelli ve sıkma temelli biyoyazıcılar olmak üzere 3 ana başlıkta toplanmaktadır. 3B yapıların üretiminde en sık kullanılan teknik sıkma temelli biyoyazıcı tekniğidir. Plastik şırıngalarda bulunan biyomürekkebin mekanik veya pnömatik kuvvet ile iğne ucu kullanılarak dağıtılması temeline dayanmaktadır [14].

1.2.1. Biyomalzeme Seçimi

Biyomalzemeler, vücudun herhangi bir dokusunu, organını tedavi etmek, fonksiyonelliğini arttırmak veya iyileştirmek için biyolojik sistemler ile aracı oluşturmayı amaçlayan malzemelerdir. Biyomürekkep (bioink), doku yapıları ve organoidler geliştirmek için 3B biyoyazıcıda basımı yapılan biyomateryallerdir [15]. Biyomürekkebin katman birbiri üzerinde 3B basılması temeliyle doku iskeleleri elde edilmektedir.

Doku iskeleleri tasarlanırken geliştirilecek biyomürekkebin, doku tipine bakılmaksızın, göz önünde bulundurulması gereken bazı temel özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bunlar;

- Yüksek hücre / doku biyouyumluluğuna sahip olmalı, patojenik reaksiyonları tetiklememeli,
- İlk mekanik özelliklerini korumalı, gözenekler, kanallar ve ağlar gibi doku yapılarının çökmemesi için kısa süreli stabiliteye sahip olmalı, yani 3B basılabilir olmalı,
- Hücrelerin bağlanma, çoğalma ve fonksiyonları için uygun ortam oluşturmalı,
- İmplant edildiklerinde, hücresel ve fizyolojik süreçlerle yönlendirilen hücrelerin, kendi hücre dışı matrikslerini üretmesine izin verecek şekilde biyolojik olarak parçalanabilir olmalı,
- İskeleler, hücresel penetrasyonu, besinlerin ve oksijenin infiltrasyonunu sağlamak için birbirine bağlı gözeneklere ve yüksek gözenekliliğe sahip olmalıdır.

3B biyobaskı alanındaki en büyük zorluklardan birisi, biyolojik malzemelerin baskı işlemiyle uyumluluğunun düşük olması ve aynı zamanda doku konstrüksiyonları için istenen mekanik ve fonksiyonel özellikleri sağlayamamasıdır. Halen tamir ve rejenerasyon için rejeneratif tıp alanında kullanılan malzemeler, çoğunlukla hayvan veya insan dokularından izole edilerek elde edilen doğal polimerlere ve sentetik polimerlere dayanmaktadır [16,17].

1.2.1.1. Doğal polimerler

Doğal polimerler yenilenebilir kaynaklardan yani bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan üretilmekte, bu nedenle doğada yaygın şekilde bulunmakta ve

eşsiz, oldukça karmaşık yapı çeşitliliği sergilemektedir [18]. Doğal polimerlerin 3B biyobaskı ve diğer doku mühendisliği uygulamaları için avantajları, insan hücre dışı matriksine benzerlikleri ve doğal biyolojik aktiviteleridir. Kolajen, jelatin, hyalüronik asit, elastin, selüloz, aljinat, kitosan doğal polimerlerdir.

1.2.1.2. Sentetik polimerler

Sentetik polimerler, belirli uygulamalara uyarlanabilecek şekilde fiziksel özelliklerle tasarlanabilirler. Sentetik polimerlerin kullanımındaki zorluklar arasında zayıf biyoyumluluk, toksik bozunma ürünleri ve bozunma sırasında mekanik özelliklerin kaybı bulunmaktadır. Genellikle sentetik polimerlerin modifikasyonu ile elde edilen yarı sentetik polimerler kullanılmaktadır. Poli(glikolik)asit, poli(laktik)asit, poli(etilen glikol), poli(kaprolakton) sentetik polimerlerdir [6].

1.2.1.3. Kompozit karışımlar

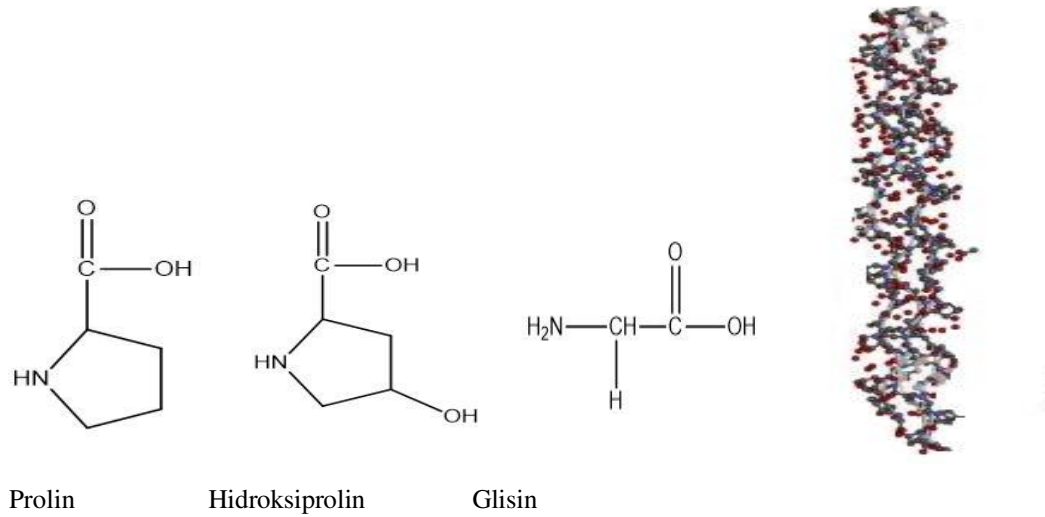
Kompozit biyomalzemeler, iki veya daha fazla sayıda farklı polimerlerin bir araya getirilmesi ile elde edilmektedir. Biyomürekkebin biyoyumluluğunu arttıracak bir doğal polimerin yanında, yapısal mukavemetini arttıran farklı bir polimer kullanımı yaygın olarak uygulanmaktadır [19].

Büyük ilaç molekülleri, oral yoldan verilmesi sonucu gastrointestinal kanaldan geçerken enzimler tarafından yüksek oranda tahrip ya da yok edilirler. Ayrıca, bu tür moleküller enjekte edilselerde vücut tarafından tahrip edilmekte, etki süreleri ve değerleri azalmaktadır. Yakın tarihe kadar moleküllerin biyoyumlu polimerlerden yavaşça salınamayacağı inancı mevcuttu [20]. 1989'da ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) yavaş yavaş bir peptidi serbest bırakan ilk sistemi onaylamıştır. Sistem, yaklaşık 1200 Da moleküler ağırlığa sahip olan luteinleştirici hormon (LHRH) analoglarını yavaşça serbest bırakan polimer mikrosferlerdir. Gelişmiş prostat kanseri, endometriozis ve erken ergenlik tedavisinde en yaygın kullanılan bir sistemdir. Bu hormon oral veya enjeksiyon yoluyla verilirse vücutta tahribata uğramaktadır. Fakat bir polimer matrisine yerleştirildiğinde, salım 4 ay boyunca devam etmektedir [21,22]. 1970'lerde genetik mühendisliği alanı ortaya çıkmış ve önemli miktarda büyük moleküler ağırlıklı ilaçların üretimi mümkün olmuştur. Bu ilaçların tahrip olmadan hedef dokuya teslimi için taşıyıcı sistemler üzerinde durulmuş ve biyopolimerlerle yoğun şekilde çalışılmıştır. Ayrıca ilaçların nazal emilimlerini, kornea penetrasyonlarını arttırmak gibi fikirler açığa çıkmış ve çalışmalara ağırlık verilmiştir [23,24].

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda kolajen doğal polimeri ve karboksimetilselüloz yarı sentetik polimeri kullanılmış, sentezlenen lidokain moleküler basılmış nanopartikülleri polimer matriksine gömülerek 3B basımı yapılmıştır.

1.2.1.4. Kolajenin yapısı ve önemi

Kolajen çoğu durumda iki α_1 zincirinden ve bir α_2 zincirinden oluşan bir heterotrimer molekülüdür. Molekül uzunluğu yaklaşık 300 nm, genişliği yaklaşık 1-5 nm arasında olup, her zincir 1000'den fazla amino asit bileşimine sahiptir. Bir N-terminal üçlü olmayan sarmal alan (N-telopeptid), merkezi bir üçlü sarmal alan ve bir C-terminal üçlü olmayan sarmal alan (C-telopeptid) olmak üzere üç alana sahiptir. Merkezi üçlü sarmal alan, toplam molekülün yaklaşık %95'ini oluşturmaktadır. Şekil 1.3'de görülen üçlü sarmal alan, çoğunlukla X'in bir prolin, Y'nin bir hidroksiprolin ve Gly'nin glisin olduğu Gly-XY tekrarlarının mevcudiyeti nedeniyle mümkün kılınmaktadır. Her üç pozisyondaki glisin tekrarı yapının doğru oluşumu için gereklidir [25,26]. Gly-XY tekrarlarının prolin ve lizin kalıntıları çoğu zincirde hidroksile edilir ve bu hidroksilasyonlar kolajen sarmalın stabilitesini sağlamaktadır [27].



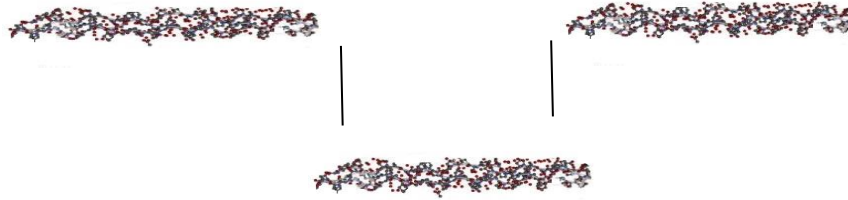
Şekil 1. 3. Kolajenin üçlü sarmal yapısı

Şimdiye kadar yaklaşık 28 kolajen türü tanımlanmıştır. Bunlar arasında en yaygın olanları Tablo 1.1.'de verilmiştir.

Tablo 1.1. *Kolajen türleri*

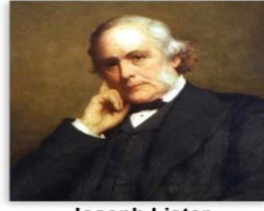
Kolajen Ailesi	Üyeler
Fibril Oluşturan Kolajenler	Kolajen tip I, II, III, V, XI, XXIV ve XXVII
Mikrofibriler Kolajen	Kolajen tip VI
Bazal Membran Kollajen	Kolajen tip IV
Kısa Zincirli Kolajenler	Kolajen Tip VIII ve X
Transmembran Kolajenler	Kolajen tip XIII, XVII, XXIII ve XXV

Kolajen, tüm omurgalı vücut proteinlerinin yaklaşık üçte birini oluşturmaktadır ve hücre dışı matriksin (ekstra sellüler matriks) birincil bileşenidir. Kemik, deri, tendon, ligament, sklera, kornea ve kan damarlarındaki ana proteindir. Tip I kolajen, kemiğin tüm kolajen içeriğinin yaklaşık %95'ini ve kemikte bulunan toplam proteinlerin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Kolajen molekülleri, biyolojik olarak çözünebilir, zayıf antijenik, biyolojik olarak uyumlu ve kendinden organize olarak fibril oluşturma özelliklerine sahiptir [28]. Ekstrakte edilen kolajende, bu doğal organizasyonun tahrip olması nedeniyle, mekanik özellikler ve stabilite doğal durumundan daha düşüktür. Bu, biyoteknolojik uygulamalarda kolajen potansiyelini ciddi şekilde sınırlandırmaktadır [29,30].

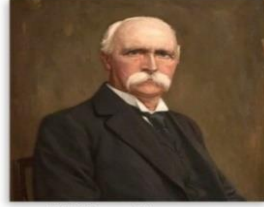


Şekil 1. 4. *Kolajen proteinlerinin kendiliğinden çapraz bağlanması*

Kolajenin modern bir biyomateryal olarak kullanılması, 1881 yılında modern bir ameliyat kuran Joseph Lister ve eski öğrencisi William Macewen tarafından, koyunun ince bağırsağından hazırlanmış biyolojik olarak parçalanabilen "catgut" olarak adlandırılan sütürün avantajları hakkında bilgiler yayınlanması ile gerçekleşmiştir [31,32].



Joseph Lister
(1827–1912)



William Macewen
(1848–1924)



catgut suture

Görsel 1. 1. *Joseph Lister görüntüsü, Walter William Oules'in yağlı boya tablosu (Wellcome Kütüphanesi'nin izniyle, Londra); William Macewen görüntüsü, Charles R. Dowell'in yağlı boya tablosu (Glasgow Kraliyet Hekimler ve Cerrahlar Koleji izniyle); 1875 'de hazırlanmış, yağ içerisindeki catgut (King's Koleji izniyle, Londra) [32].*

Kolajen protein ailesi, doku ve organların oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Birçok hücre yüzeyi proteini, kolajene bağlanmaktadır. Hücre-kolajen etkileşimlerine dört farklı türde protein aracılık etmektedir:

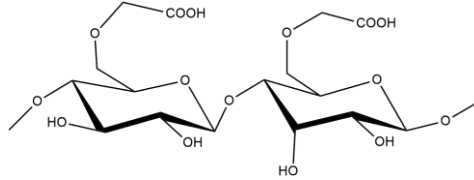
- Pro-Hyp-Gly ünitesini içeren peptid sekanslarını tanıyan reseptörler (glikoprotein VI gibi),
- Phe-Hyp-Gly sekansına bağlanan integrin reseptörlerinden discoidin domain reseptör 1 ve 2,
- Kolajen içindeki şifreli motifleri tanıyan integrin reseptörleri,
- Kolajen olmayan alanlar için afiniteye sahip reseptörler [33], şeklinde söylenebilmektedir.

RGD (arjinin-glisin-aspartik asit) sekansı veya benzer bir integrin tanıma sekansı içeren birçok protein, hem kolajene hem de integrinlere bağlanıp, hücre yapışmasını ve proliferasyonunu teşvik edebilmektedir [34].

Kolajenin bu özelliklerinden kaynaklı olarak, çapraz bağlanmış kolajen yapı iskeleleri hastalıklı, hasarlı organların yenilenmesini veya onarımını teşvik etmek için rejeneratif tıpta kullanılmaya devam etmektedir [35].

1.2.1.5. Karboksimetilselüloz

Selüloz türevlerinden, anyonik, suda çözünür, non-toksik bir polimerdir. Yapısındaki karboksil grupları ile biyoyapışkan, pH duyarlı ve jel oluşturuca özelliklere sahip olması, ilaç dağıtımı ve diğer biyomedikal araştırmalarda yaygın olarak kullanılmasıyla sonuçlanmıştır [36,37].



Şekil 1. 5. Karboksimetilselülozun yapısı

1.3. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi

Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi, belirli dalga boylarında moleküllerin dairesel spektrumlarını ölçen spektroskopik bir yöntemdir. Polarize ışık, tek bir düzlemde titreşerek ilerleyen ışığa denmekte ve birbirine dik iki doğrusal polarize bileşenin toplamıdır. CD, dairesel polarize ışığın sola doğru olan absorpsiyonu ile polarize ışığın sağa doğru olan absorpsiyonu arasındaki farka denmektedir. Kiral moleküllerde, dairesel polarize ışık farklı şekilde absorplandığından, CD spektrumunun elde edilebilmesi için kiral bir molekülün varlığı gerekmektedir [38].

Aşağıda verilen 1.1 eşitliğinde;

Δ , dalgaboyu, A polarize ışığın absorbansı, ΔA polarize ışığın sola doğru olan absorpsiyonu ile polarize ışığın sağa doğru olan absorpsiyonu arasındaki farktır.

$$\Delta A (\lambda) = A (\lambda) \text{ sol yönlü polarize ışık} - A (\lambda) \text{ sağ yönlü polarize ışık} \quad (1.1)$$

CD spektroskopisi, proteinlerin ikincil yapılarını, sıcaklığın ve pH değişikliklerinin nasıl etkilediğini ve proteinlerin diğer moleküllerle olan etkileşimini aydınlatmak için geliştirilmiş bir yöntemdir. Spektrumlar ile proteinlerin ikincil yapılarında olan α -heliks ve β katlanmalarının, proteinlerin tersiyer yapısındaki aromatik grupların varlığıyla ilgili bilgiler elde edilmektedir. Proteinlerin konformasyonel değişikliklerinin ifadesinde CD spektroskopisi büyük önem taşımaktadır. En sık, CD spektroskopisinin proteinlerin ikincil yapısının tayininde kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca; sıcaklık veya denatüre edici ajanlar varlığında proteinin ikincil yapısının nasıl değiştiğini incelemek için de kullanılmaktadır. Uzak UV bölgesinde (170-260 nm), peptit

bağlantılarına ait spektrumlar elde edilirken, yakın UV bölgesinde (240-360 nm) ise, aromatik amino asit yan zincirler (triptofan, tirozin ve fenilalanin) ve disülfür bağlarının spektrumları elde edilmektedir [39].

Yapılan tez çalışmasında koyun derisinden izole edilen Tip 1 kolajenin ikincil yapısının analizi CD spektroskopisiyle yapılmıştır.

1.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Enzim-substrat veya antijen-antikör sistemlerindeki biyolojik etkileşimlere moleküler tanıma dayanılarak karar verilmekte ve bunlar çoğunlukla anahtar kilit mekanizmalar olarak tanımlanmaktadır. Araştırmacılar bu genel konsepti, moleküler olarak basılmış polimerleri (MIP) sentezlemek için baskı teknolojisinde ve bu yaklaşımı, son derece spesifik bağlanma gerektiren uygulamalarda kullanmışlardır. MIP'ler, biyolojik ayırtırmalar, teşhis deneyleri, biyosensörler ve biyokataliz için biyomateryallere tanıma ve özgülüğün gerçekleştirilmesinde uygulanmıştır. Bu biyomimetik polimerlerin, hedef kitleleri arasında büyük bir seçicilik ile etkileşime girdiği gösterilmiştir [40,41].

MIP'lerin uygulanması düşük üretim maliyeti, zorlu işlem koşullarında kararlılık (pH, sıcaklık ve organik çözücüler) ve doğal reseptörlere benzer mükemmel tanıma özellikleri nedeniyle öne çıkmaktadır. Polimerler, bir hedef bileşik ile spesifik etkileşimler için baskı tekniği kullanılarak sentezlenmektedir. MIP'ler, hedef bileşik için seçici bağlanma bölgelerine sahip mühendislik malzemeleridir [42–46].

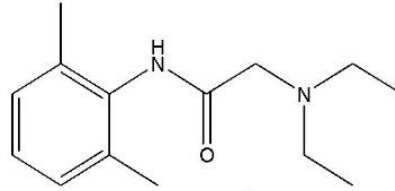
Temel olarak, hedef bileşik ve fonksiyonel monomer arasında kovalent, kovalent olmayan ve yarı kovalent etkileşimlere dayanarak üç tip moleküler baskı tekniği vardır [47]. Kovalent baskı tekniğinde polimerizasyon, hedef molekül ile alkol, diol, aldehit, keton, primer amin veya karboksilik asit fonksiyonel gruplarına sahip monomerler arasında kovalent bağ oluşumunu içerir [48]. Yıkamadan sonra, bağlar hidrolize edilir ve bağlama bölgelerinde kalan fonksiyonel gruplar, hedef molekülle birlikte kovalent bağları yeniden kurma eğilimine sahiptir. Kovalent olmayan baskılama tekniği, doğal olarak meydana gelen tanıma mekanizmalarına benzer ve MIP hazırlama için en yaygın yöntemdir [49]. Bu teknik, polimerleşme sırasında monomer ve hedef molekül arasında meydana gelen iyonik, dipol-dipol, π - π geçişleri, van der Waals, elektrostatik veya hidrojen bağları gibi etkileşimlere dayanır. Yarı kovalent baskı tekniği ise, kovalent olmayan ve kovalent baskı tekniklerinin avantajlarını birleştirir [50]. Burada fonksiyonel

monomer ve hedef molakül etkileşimi, polimerizasyon aşamasından önce kovalent etkileşim iken, polimerizasyon aşamasında kovalent olmayan etkileşimler yoluyla gerçekleşmektedir.

Tez kapsamında, lidokain moleküler basılmış nanopartiküller miniemülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir.

1.4.1. Lidokain

2-dimetilamino-N-(2,6-dimetilfenil) asetamid olarak bilinen Şekil 1.6’da görülen lidokain, lokal anestezik bir özellik sergilemektedir. Ayrıca; miyokard infarktüsünün ventriküler taşikardisinin tedavisinde başarıyla uygulanmaya devam etmektedir. Ağrıyı azaltmak için en yaygın kullanılan lokal anestetikler ve periferik analjeziklerden biridir [51–53]. Yapısındaki amid grubu, sodyum kanalında aktif Phe-1764 ve Tyr-1771 kalıntıları ile 1:1 oranında etkileşime giren ve sodyum iyonlarının voltaj kapılı kanallardan geçmesini önleyen bir görev görmektedir. Bu nedenle lokal nöronlar bloke edilir ve ağrı sinyalleri beyine iletilememektedir [54].

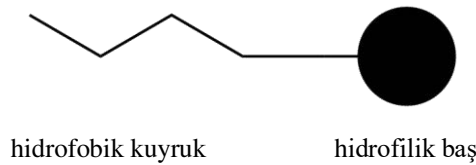


Şekil 1.6. Lidokainin moleküler yapısı

Verimli bir analjezi için, kısa bir etki süresi sağlanmalı ve ilaç hızlı hareket etmelidir. Bu nedenle, daha yüksek biyoyararlanım ve cilt geçirgenliği sağlayan ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Nanopartiküller, çözünürlüğü düşük ilaçlar için araç olarak hareket edebilmekte, ilaç güvenliğini ve dengesini artırabilmektedir. Ayrıca hedef bölgede önemli sistemik dağılım olmadan yüksek ilaç derişimi verebilme potansiyeline sahiptirler [55].

1.4.2. Miniemülsiyon Polimerizasyonu

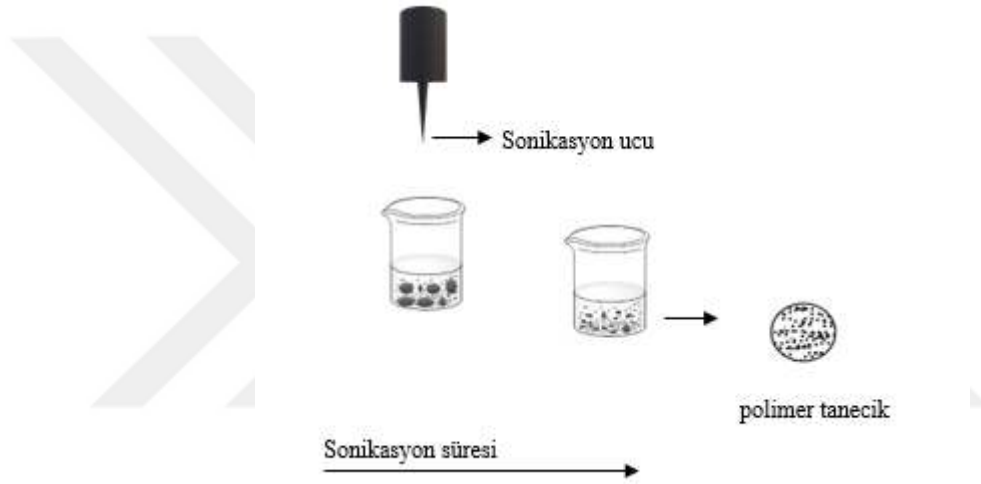
Miniemülsiyon polimerizasyonu, monomer ve bu monomerin çözünmediği ya da çok az çözündüğü dağıtma ortamı sıklıkla sudan oluşan bir sistemde meydana gelmektedir. Monomerin ortamda dağıtılması ve polimerizasyon sonunda emülsiyon ürününün kararlılığı için emülsiyon yapıcı maddeler (emülgatör/sürfaktan) ve suda çözünen başlatıcılar kullanılmaktadır. Emülgatör sulu fazda dağılırken, başlatıcı da sulu fazda çözünmektedir. Emülgatörler, hem hidrofilik hem de hidrofobik kısmı bulunan (Şekil 1.7), sabun olarak da bilinen moleküllerdir. Apolar hidrokarbon zincirleri su molekülleri ile çok az etkileşime girerken, polar hidrofilik baş gruplar su molekülleri ile dipol veya iyon-dipol etkileşimleri yapmaktadırlar. Suda çözünebilen emülgatörler, su molekülleri ile kuvvetli etkileşim içinde olduklarından, su molekülleri arasındaki hidrojen bağı, hidrokarbon zincirini suyun dışına sıkıştırmakta olup meydana gelen yapıda bu zincirler hidrofobiktir. Sulu çözeltilerde belli bir derişimde bulunduklarında, emülgatör moleküllerinin hidrokarbon zincirleri içeriye doğru yönelip, hidrofilik baş grupları da sulu ortamda etkileşmesi için dışarıda kalacak şekilde kümeleşecektir. Bu kümelere ‘misel’ adı verilmektedir. Emülsiyon polimerizasyonunda en sık kullanılan emülgatör sodyum dodesilsülfattır. Bu yapılarından dolayı sınırlı çözünürlüğe sahiptirler ve iki faz arasında olan yüzey gerilimini de azaltmaktadırlar. Miniemülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile, yüksek polimerizasyon hızında ve yüksek molekül ağırlığına sahip polimer üretimi mümkün olabilmektedir.



Şekil 1. 7. Emülgatör molekülünün yapısı

Polimerizasyon başlamadan önce, sulu faz içerisinde dağılmış durumda olan büyük monomer damlaları mevcuttur. Emülgatör, su ile monomer fazı arasında bir emülsiyon oluşmasını sağlamak ve kararlı kılmaktadır. Özellikle suda çözünmeyen bileşiklerin, misellere hareket ederek emülgatör çözeltisinde çözünmesi sağlanabilmektedir. Polimerizasyon, başlatıcının termal olarak parçalanması ve oluşan serbest radikallerin, misellere adsorplanan monomer molekülleri ile dimer ve trimer yapısında yeni radikaller

meydana getirmek üzere reaksiyona girmesiyle devam etmekte ve sonuç olarak, polimer misel içinde oluşmaya başlamaktadır. Polimer taneciklerinin yüzeylerine misellerin adsorblanmasıyla, çözeltideki emülgatör derişimi kısa sürede kritik misel derişiminin altına düşmekte ve bu derişimin altında aktif olmayan miseller kararsız hale geçerek sulu fazda dağılmaktadırlar. Polimerizasyonun geri kalan kısmı ise oluşan polimer taneciklerinin içinde gerçekleşir. Polimerizasyon sonunda, emülgatör molekülleriyle kararlılığı sağlanmış, sonikasyon ile mikro boyutlara ulaşılan, polimer taneciklerinin dispersiyonu biçiminde bir emülsiyon sistemi elde edilmektedir [56–61].



Şekil 1. 8. Miniemülsiyon sonikasyon sürecinin şematik gösterimi

1.5. Periton ve Yapısı

Karın boşluğunu ve karın boşluğunda bulunan organların yüzeyini örten seröz zara periton denmektedir ve vücudun en büyük seröz membranı özelliği taşımaktadır. Karın boşluğu yüzeyini örten zar olan paryetal periton, kesinti yapmadan organ yüzeylerini visseral periton adını alarak kaplamaktadır. Yüzey alanı yetişkinlerde yaklaşık olarak 2 m²'dir. Erkeklerde karın boşluğu dış ortama kapalıdır, kadınlarda ise fallop tüpleri ile peritoneal kavite dış ortama bağlanmaktadır. Periton boşluğunda, transüda karakterinde yaklaşık 50 mL kadar serbest sıvı bulunmakta ve içeriği, normal dansitesi 1010 gL⁻¹ 'den az, protein derişimi 3 gL⁻¹ 'nin altında, mm³'te hücre sayısı 3000'den düşüktür. Peritonun yüzeyini mezotel hücreler kaplamakta ve intersellüler bağlarla birbirine bağlanmış bir katman oluşturmaktadır. Mezotelin altındaki derin katmanda, kolajen, elastik lifler, yağ, retikulum hücreleri ve makrofajları içeren gevşek bağ dokusu

bulunmaktadır. Mezotel tabakasında bulunan mikrovillusların su yakalama ve yüzeyi yağlama özellikleri sürtünmeyi önlemektedir. Peritonun esas işlevi, karın içi organlarla karın duvarı arasında zararlı olmayan bir temas yüzeyi sağlamaktır. Ayrıca, visseral periton katlantısı olan omentumun karın içi enfeksiyonlarını lokalize etme fonksiyonu vardır [62,63].

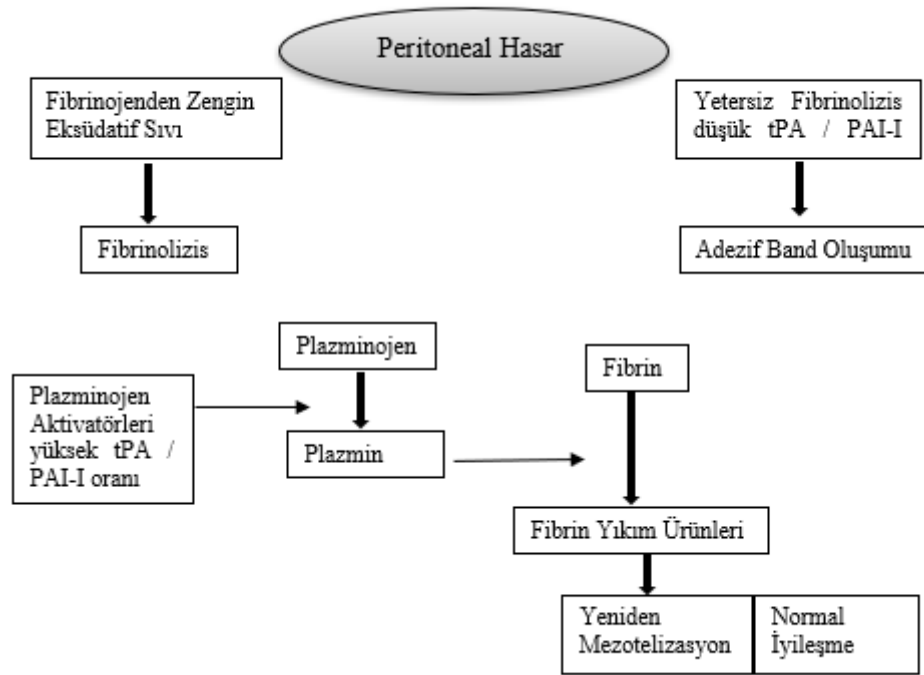
Adezyon oluşması veya engellenmesinde rol oynayan peritonun iki özelliği bulunmaktadır. Birincisi, peritonun çok ince ve hassas bir yapıya sahip olması, diğer özelliği ise, uniform şekilde ve hızla epitelizasyona uğruyor olmasıdır. İnce ve hassas yapısı, oluşan travma karşısında periton yüzeyinin çok duyarlı olmasına sebep olurken, hızla reepitelizasyona uğruyor olması, bu özelliğinden dolayı travmanın büyüklüğü önemini yitirmektedir. Peritonda bir travma oluştuğunda, tüm yüzeyin aynı anda epitelize olmaya başlaması, deri yaralarında olduğu gibi kenarlardan derece epitelize olmadığı ortaya konmuştur [64].

1.6. Adezyon Oluşumu

Cerrahi işlemler adezyonların ana sebebidir ve yüksek oranda batın operasyonları sonrası gelişmektedir. Adezyon gelişimi sonrası, kadınlarda infertilite, bağırsak obstrüksiyonları, kronik pelvik ağrı en sık görülen komplikasyonlar arasındadır. Bu komplikasyonlar ikincil bir operasyon gerektirmekte olup, halk sağlığı üzerinde önemli bir yük oluşturmaktadır. Bu durum, başta cerrahi olmak üzere tıp otoritelerinin 19. yüzyılın sonlarından itibaren bu konuyla yoğun bir şekilde çalışma yapmalarını sağlamıştır. 1960'lı yıllara kadar yoğun olarak temel teorik bilgilere dayandırılan adezyon önlenmesi ile ilgili öneriler, daha sonraları deneysel ve klinik çalışmalara evrilmiştir [65,66].

Adezyon oluşumu (Şekil 1.9), ilk önce periton hasarı ile başlayan bir dizi fizyolojik olaylar sonucunda meydana gelmektedir. Oluşan hasar ilk dört saatte nötrofiller tarafından kaplanmakta ve tam iyileşme yaklaşık bir haftada gerçekleşmektedir. Mezotelyal hücreler doku plazminojen aktivatörlerinden (tPA) zengin oldukları için periton boşluğunda biriken kan pıhtılaşmamaktadır. Bu fibrinolitik etki periton iltihabının engellenmesinde de rol oynamaktadır. Adezyon oluşumunun patofizyolojisinde kanama durumundan bağımsız olarak, doku faktörü tarafından aktive edilmiş fibrinojenden kaynaklanan fibrin pıhtısı yani fibrin gel matriks ile başlatıldığı bilinmektedir. Fibrinojen, çözünür bir proteindir ve dokular arasında bulunmaktadır. Trombin ile reaksiyona girerek

fibrin monomerlerini oluşturma ve bu oluşan fibrin, sağlıklı abdominal ortamda plazmin gibi fibrinolitik enzimler tarafından parçalanmaktadır. Mezotelyal hücrelerde bulunan tPA, cerrahi sonrası adezyon oluşumunun engellenmesine karşı önemli bir doğal savunma mekanizmasıdır. Bu mekanizma, inaktif plazminojen den tPA aracılığı ile aktif olan enzimler olan plazmin ve ürekinaz doku plazminojen aktivatörlerin, fibrin jel matriksini adezyon oluşumuna etkisi olmayan fibrin yıkım ürünlerine dönüştürmektedir. Fibrinolizis yeterliyse, fibrinöz adezyonlar lizise uğramakta, yeterli değilse adezyon gelişimine yol açabilmektedirler. Fakat inflamasyon varlığında, fibrinolitik enzimler inaktif hale geçtiğinden, fibroblastlar lokal olarak çoğalmakta, sonrasında kalıcı adezyonlar meydana gelmektedir. Ayrıca adezyon oluşumuna eğilim kişiye özel bir durumdur. Beslenme alışkanlığı, diyabet, lökosit ve fibroblast aktivitesini değişikliğe uğratan hastalıklar gibi bireysel durumlar adezyon oluşumunda etkili olmaktadır [67–69].



Şekil 1. 9. Adezyon oluşum mekanizması

1.6.1. Adezyonların oluşumunda rol oynayan faktörler

1.6.1.1. Cerrahi operasyonlarda doku hasarı

Periton çok ince ve hassas bir yapıya sahip olması nedeniyle travmalara açık durumdadır. Cerrahi operasyonlarda kullanılan mekanik, termal, elektriksel uygulamalar ve lazer yöntemleri periton yüzeyindeki mezotel tabakada travmaya sebep olmaktadır. Bundan dolayı, abdominal operasyonlarda cerrahi tekniğin travmaya izin vermeyecek şekilde seçilmesi gerekmekte, hassas cerrahi teknikler uygulanmalıdır [70].

1.6.1.2. İskemi

Vücudun bir bölgesindeki kanlanmanın yetersiz olması iskemi olarak adlandırılmaktadır. İskemi geliştiğinde, hasarlı bölge nekroze olmadan bu bölgede yeni damarlanmalar oluşmaktadır. Periton bölgesinde iskemik bir durum oluştuğunda omentum ve abdominal organlar, iskemik bölgeye ilk 3 saat içinde yaklaşıp adezyonu geliştirmektedirler. Gelişen adezyonun içinde yeni damarlanmalar aracılığıyla iskemik bölgenin beslenmesi sağlanmakta ve hasarlı bölge nekroza girmekten korunmaktadır [71].

1.6.1.3. Periton bölgesinde fibrinolitik sistem yetersizliği

İskemi ve inflamasyon durumlarında tPA aktivitesi normal seviyede iken, plazminojen aktivatör inhibitörlerinin (PAI) salınımında artış görülmektedir. Bu durum sonucu, fibrinolitik sistem aktivitesinde azalma oluşmakta, fibrin matriksin lizise uğrayabilmesi için gerekli enzimler yeterince sentezlenememekte ve adezyon oluşumu teşvik edilmektedir [72].

1.6.1.4. Büyüme faktörleri

Mezotel tabakanın hasar görmesi sonucunda, onarımı sırasında makrofaj ve lenfositler, fibroblast proliferasyonu ve kolajen oluşumunu sağlayan büyüme faktörlerini (PDGF, TGF- α , FGF) sentezlerler ve yapışıklık oluşumu artmaktadır [73].

1.6.1.5. Enfeksiyonlar

Enfeksiyon durumunda var olan bakteriler, periton mezotelyal dokusuna zarar veren enzimleri salgılayarak, doku hasarı, iskemi ve iltihaplanmaya sebep olmakta ve bu durum sonucunda yapışıklık oluşumu tetiklenmektedir [74].

1.6.1.6. Ameliyat ipliği

Abdominal cerrahi operasyonlarda kullanılan dikiş ipliklerinin adezyona yol

açtığı yapılan deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır. Ameliyat ipliği, periton bölgesinde iskemi ve nekrozu artırarak fibrinolitik aktivitenin azalmasına ve yabancı cisim enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Ayrıca ameliyat ipliği üzerinde bulunan gözenekler, bakterilerin yerleşimine olanak sağlayarak enfeksiyonların da sebebi olabilmektedirler [75].

1.6.1.7. Yabancı materyaller

Cerrahi müdahale esnasında karın içine etkileyen herhangi bir yabancı cisim, granülasyon oluşumuna sebep olduğu için adezyon oluşturmaktadır. Cerrahi eldivenlerin pudralarında bulunan magnezyum silikat ve magnezyum oksit, kullanılan tampon bezlerden düşen pamuk parçacıkları ve özellikle fitik onarımında kullanılan meshler adezyona sebep olan etkenlerdir. Literatürde, cerrahi operasyon sonrası oluşan adezyonların yaklaşık %69’unda yabancı cisim varlığı tespit edilmiştir [76].

1.6.2. Adezyon oluşumunu önleyici uygulamalar

Adezyonların önlenmesi için çeşitli stratejiler geliştirilmiş fakat tamamen önleyen bir formül bulunamamıştır. Genel olarak yaklaşımlar;

- Cerrahi operasyonlarda peritoneal travmanın azaltılmasına yönelik tekniklerin seçilmesi,
- Farmakolojik olarak inflamatuvar cevabın azaltılması, koagülasyonun inhibisyonu veya fibrinolizisin teşvik edilmesi,
- Normal iyileşme oluşurken, yapışıklık gösteren dokuların ayrılması şeklindedir.

Başlangıçta, fibrinolizin, plazmin, heparin ve fibrinolitik enzimler adezyon oluşumunu önlemek amacıyla yoğun şekilde kullanılmış, klinik ve deneysel olarak çalışmaları yapılmıştır. Son yıllarda ise periton yüzeyler arasında mekanik bariyer çalışmalarına ağırlık verilmiştir. Bu yaklaşıma ağırlık verilmesinin sebebi uygulanışı kolay, görece ucuz ve peritoneal fizyolojiye uygun olması olarak gösterilmesidir [77,78].

İdeal bir mekanik bariyerin özellikleri;

- Reaktif olmamalı,
- İyileşme aşamalarında etkisi devam etmeli,
- Yara iyileşmesine olumsuz etkisi olmamalı,
- Kolay emilebilir olmalı,

- Bakteriyel üremeyi artırmamalı,
- Kullanımı kolay olmalıdır.

Adezyon önleyici bariyerler genel olarak ikiye ayrılmaktadır:

Bariyer solüsyonlar; kristaloidler, %32 Dextran 70, hyalüronik asit, hyalüronik asit-fosfat tamponlu salin, karboksimetilselüloz.

Sentetik solid bariyerler; otolog peritoneal transplantlar, politetrafluoroetilen, okside-rejenere selüloz, Seprafilm®, Sepragel®, Spraygel™ [79].

- ❖ Adezyon oluşumunu engellemek amaçlı yapılan çalışmalardan bazıları şu şekildedir:

Poli-laktik asit (PLLA), poli(laktik-glikolik asit) (PLGA) ve polietersülfon (PES) polimerlerinden elde edilen nanolifli yüzeyler, fareler üzerinde adezyon bariyeri olarak uygulanmış, insan mezenkimal hücrelerinin nanolifli yüzeylere tutunmasının in vivo ortamda değerlendirilmesi yapılarak ticari adezyon önleyici ürün olan Interceed'e göre daha etkin olduğu vurgulanmıştır [80].

Kitosan alginat ve kalsiyum alginat nanolifli yüzeyler in vitro ve in vivo ortamlarda adezyon bariyeri olarak birbiriyle kıyaslanmış, kitosan alginatlı yüzeyin adezyon önlemede daha etkin olduğu tespiti yapılmıştır [81].

Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) katkılı PLGA polimerinden nanolifli yüzeyler üretilmiş, yüzeylerin adezyonu engellemede katkısız PLGA yüzeylere göre daha etkin olduğu in vivo deneylerle gösterilmiş ve çalışmalar ticari bir bariyer olan Interceed ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir [82].

Karboksimetil kitosan/karboksimetil selüloz/kolajen polimerlerinden membran hazırlanmış ve in vivo çalışmalar sonrasında peritoneal adezyonu önlediği vurgulanmıştır [83].

Ayrıca klinikte kullanılan FDA onaylı adezyon önleyici iki ürün bulunmaktadır. Bunlardan birisi olan Seprafilm, hyaluronik asit ve karboksimetil selüloz polimerlerinden oluşan, EDC/NHS ile çapraz bağlı, hidrofilik, biyobozunur bir membran bariyeridir. Diğer adezyon önleyici ticari ürün Interceed, okside rejenere selülozdan oluşan hemostatik bir ajandır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Yapılan çalışmada kullanılan kolajen tip 1 izolasyonu için kullanılan, n-bütanol, pepsin, asetik asit, kullanılan 50k Amicon Ultra-15 santrifüj filtresi Sigma Aldrich'ten tedarik edilmiştir.

Lidokain moleküler bellekli nanopartiküllerin sentezi için kullanılan lidokain, metakrilik asit (MAA), etilenglikol dimetakrilat (EGMA), sodyum dodesilsülfat (SDS), sodyum hidroksit (NaOH) Sigma - Aldrich (ABD) tarafından, heksadekan, metanol (MeOH), etanol (EtOH), potasyum bromür (KBr) Merck (Almanya) tarafından, 2,2'azobis-(2-metilpropionitril) (AIBN) Fluka tarafından, asetik asit Kimetsan (Türkiye) tarafından, asetonitril, Carlo Erba (Fransa) tarafından tedarik edilmiştir.

Biyomürekkebi oluşturan biyomalzemenin hazırlanması ve çapraz bağlanması için kullanılan karboksimetilselüloz (CMC), N-hidroksisüksinimid (NHS) ve 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimide (EDC), sitrik asit Sigma Aldrich'ten tedarik edilmiştir.

Deneyisel çalışmalar sırasında kullanılan cihazlar, Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2. 1. Kullanılan cihazlar

Cihazlar	Firma
Mikroplaka Okuyucu	BioTek Synergy H1, Amerika
Etüv	Innovens, Jouan, Amerika
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektrometresi	PerkinElmer Spectrum 100
EnvisionTEC 3D-Bioplotter®	Developer Series, 4. nesil
Liyofilizatör	Labconco, Freezone, Amerika
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	Zeiss Ultra Plus, Almanya
CD Spektrofotometresi	Chirascan™ Plus (Applied Photophysics), İngiltere
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	HPLC Agilent 1100 serisi

2.1. Kolajen İzolasyonu

Kolajenin koyun derisinden izolasyon prosedürü aşamaları 4°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Prosedür aşamaları şu şekildedir:

Kolajen izolasyonu için kullanılacak koyun derisi yerel kaynaklardan tedarik edilmiş, 4°C'de soğuk zincir ile taşınmış ve kullanım zamanına kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Deriler yaklaşık 1 x 1 cm parçalara kesilmiş, her bir parça bol su ile iyice temizlenmiştir. Tüyler ve yağlı doku bistüri yardımıyla deriden uzaklaştırılmıştır. 100 g deri tartılarak mikroorganizmaların çoğalmaması için 10 dakika etanol ile yıkanmış, izolasyon için hazır hale getirilmiştir.

Hazırlanan 100 g deri parçaları uygun behere alınarak, kolajen olmayan dokuları uzaklaştırmak için 600 mL 0,1 M NaOH alkali ortamında ve 4°C’de 2 gün karışmaya bırakılmıştır. Her 6 saatte 0,1 M NaOH alkali çözeltisi tazelenmiştir. Deri parçaları, pH nötr olana kadar soğuk distile su ile yıkanmıştır.

Minerallerin uzaklaştırılması amacıyla deriler 0,5 M 600 mL EDTA-Na ile 2 gün karıştırılmıştır. Deri parçaları tekrar uygun bir behere alınıp yağların ortamdan uzaklaştırılması için 600 mL %10 n-bütanol (v/v) ortamında 48 saat karışmaya bırakılmıştır. %10 (v/v) n-bütanol her 6 saat aralığında yenisiyle tazelenmiştir. Deri parçaları, bol distile su ile yıkanmıştır.

Deri parçaları %1 (w/v) pepsin içeren 0,5 M 600 mL asetik asit içerisinde kolajenin sindirimi için 7 gün karıştırılmıştır.

7. günün sonunda deri parçaları süzölmüş, elde edilen viskoz süzöntü hacmi ölçölmüştür. Elde edilen viskoz sıvının tuz derişimi 2 M olacak şekilde NaCl ile muamele edilmiştir. Bu işlem 2 gün sürdürölmüş ve kolajenlerin tuz ile çöktürme işlemi sağlanmışır. Santrifüj tüplerine alınan viskoz sıvı, 13000 g hızında 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen pelet 0,5 M asetik asit içerisinde vorteks yardımıyla çözündürölmüştür.

Tuzların uzaklaştırılması için, 50k Amicon Ultra-15 santrifüj filtresi ile ultrasantrifüj işlemi 4000 rpm hızında 4°C’de 1 saat ve 4 kez tekrar edilerek sürdürölmüştür. 4 saatin sonunda toplanan 80 mL kolajen örneğı karakterizasyon işlemlerinin yapılması için 4°C’ye kaldırılmışır.

2.1.1. Kolajen karakterizasyonu

Kolajen karakterizasyon işlemleri, Sirius Red boyası ile kolajen miktar tayini, Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) ile fonksiyonel grup tayini, Dairesel dikroizm spektrumu (CD spektrumu) ile ikincil yapı analizi ve Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile boyut analizi şeklinde yapılmıştır.

Sirius Red kolajen miktar tayini, Keira vd. [84] uyguladığı metoda göre gerçekleştirilmiştir. Direct Red 80 Sirius Red boyası son derişim 50 µM (69 µg/mL⁻¹) olacak şekilde 0,5 M asetik asit içerisinde çözdürölmüştür. Ependorf tüplerine alınan 0,5 M asetik asit içerisinde çözündürölen 100 µL kolajen çözeltisi üzerine 1 mL Sirius Red boyası eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş, 30 dakikanın sonunda 30.000 g’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra üst fazdan örnek alınarak

mikroplaka okuyucuda 540 nm’de absorbans ölçülmüş ve sirius red boyasının azalan miktarına göre kolajen miktarı belirlenmiştir.

FT-IR ile fonksiyonel grup analizi için 4 mL kolajen çözeltisi alınarak çözücüsünün uzaklaştırılması için liyofilize edilmiştir. Elde edilen süngerimsi yapıdaki kolajen toz haline getirilerek, etüvde su içeriğinden uzaklaştırılmış KBr ile muamele edilip cihaza yerleştirilmiş 400-4000 cm^{-1} aralığında ölçüm yapılmıştır.

UV-Vis spektrumu, kolajen örneği 1:75 oranında 0,5 M asetik asit ile seyreltilerek 210-600 nm dalga boyları arasında ölçümü yapılarak elde edilmiştir.

CD spektrum analizi 180-300 nm aralığında, 20 nm bant genişliği ile oda sıcaklığında 0.1mm ışık yollu Hellma Analytics kuvars küvet kullanılarak elde edilmiştir. Kolajen örneği 0.1 mg mL^{-1} olacak şekilde 0.5 M asetik asit ile seyreltilerek ölçüm yapılmıştır.

Koyun derisinden elde edilen tip 1 kolajen örneğinin boyut analizi ve saflığının belirlenmesi için Laemmli, (1970) metodu kullanılmıştır. Bu çalışmada, %7,5’lik ayırma ve %4’lük yükleme jeli kullanılmıştır (Tablo 2.2.).

Tablo 2. 2. SDS-PAGE jel içeriği

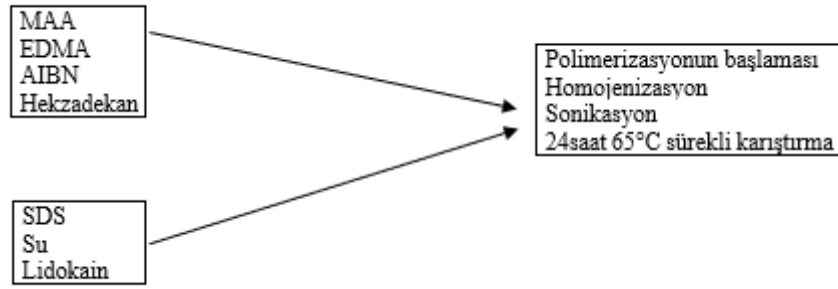
%7,5 Ayırma Jeli	
Bileşen	Miktar
H ₂ O	5 mL
Akrilamid/N, N'-metilenbis akrilamid (%30/%0,8 w/v)	2,5 mL
1,5 M Tris (pH:8,8)	2,5 mL
%10 (w/v) SDS	0,1 mL
%10 (w/v) amonyumpersülfat (APS)	100 μL
Tetrametiletildiamin (TEMED)	10 μL
%4 Yükleme Jeli	
Bileşen	Miktar
H ₂ O	3 mL
Akrilamid/N, N'-metilenbis akrilamid (%30/%0,8 w/v)	0,67 mL
0,5 M Tris-HCl (pH:6,8)	1,25 mL
%10 (w/v) SDS	50 μL
%10 APS	50 μL
TEMED	5 μL

0,5 M asetik asit ile çözündürülmüş 15 µL kolajen örneğinin üzerinde 15 µL 4x SDS-PAGE yükleme boyası eklenmiştir. Kolajen proteininin denatürasyonu için örnek 95°C'de 10 dakika bekletilmiş, 15 µL alınıp kuyucuklara yüklenmiştir. Örnekler ayırma jeline yürütülene kadar elektroforez sisteminden 20 mA akım geçirilmiş, ayırma jelinde akım 30 mA yükseltilerek işlem devam ettirilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel 30 dakika fiksatif çözeltisi ortamına alınmış ve 50 rpm'de çalkalanmaya bırakılmıştır. 30 dakikanın sonunda fiksatif çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmış ve boya çözeltisi eklenerek 1 gece 50 rpm'de çalkalanarak jel boyamaya bırakılmıştır. Boya çözeltisinden alınan jele, proteinlere ait bantların görüntülenmesi için belirli aralıklarla yıkama çözeltisi eklenmiş ve belirli periyotlarda değiştirilmiştir.

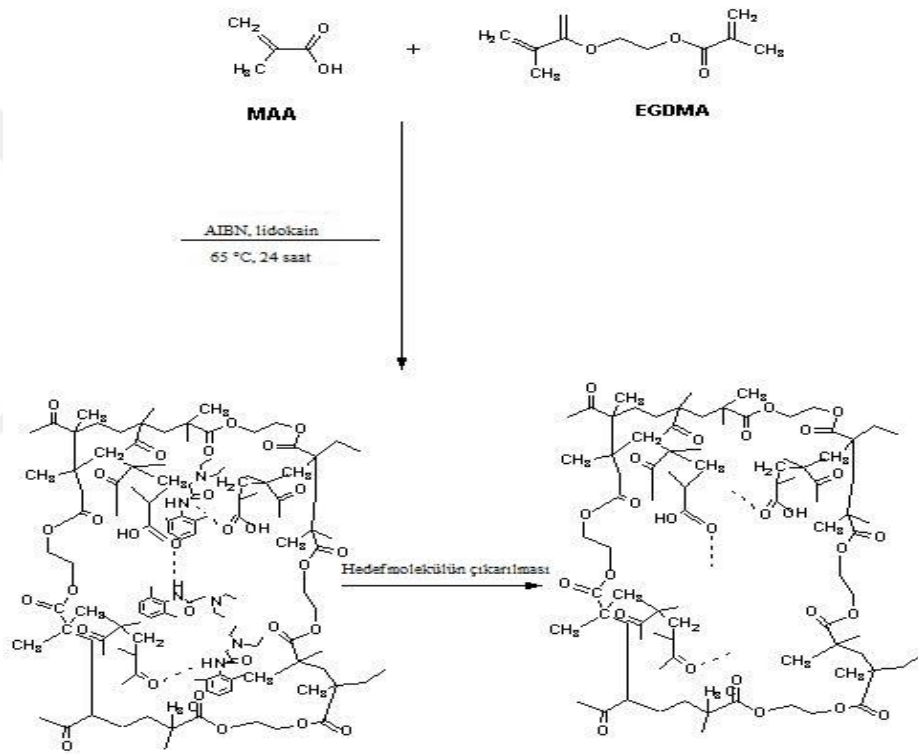
2.2. Lidokain Moleküler Baskılı Nanopartiküllerin Sentezi

Lidokain baskılı nanopartiküllerin (MIP) sentezi kısaca miniemülsiyon polimerizasyon tekniği kullanılarak şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

İlk adımda MAA (1.72 mmol), EDMA (6.8 mmol), 75 µL heksadekan ve 25 mg AIBN'den oluşan organik faz hazırlanmıştır. İkinci aşamada, hedef bileşik lidokain (0.5 mmol) ve SDS'den (40 mg) oluşan sulu faz 20 mL deiyonize su içinde hazırlanmıştır. Bir sonraki adımda, miniemülsiyon elde etmek için organik faz yavaş yavaş sulu faza eklenmiştir. Karışım önce 1 dakika boyunca ultrasonik banyoya alınmış ve sonrasında bir prop uçlu homojenizatör kullanılarak homojenleştirilmiştir. Polimerizasyon, 65°C'de 24 saat kesintisiz çalkalama ile devam etmiştir. Polimerizasyon tamamlandığında, hedef molekül lidokain, polimerin metanol/asetik asit (4:1, v/v), metanol/su/5.0 M sodyum hidroksit (5:3:2, v/v/v) metanol/asetik asit/su (8:1:1, v/v/v) ile yıkanmasıyla yüksek oranda çapraz bağlanmış polimerik yapıdan çıkarılmış ve metanol sonra deiyonize su ile yıkanmıştır. Son olarak, sentezlenen baskılı nanopartiküller, vakum altında 40°C 'de kurutulmuştur. Lidokain moleküler baskılanmamış nanopartiküllerin (NIP) sentezi, lidokain kullanmadan aynı protokolü uygulayarak gerçekleştirilmiştir. Lidokain MIP sentezi, Şekil 2.2.'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2. 1. Miniemülsiyon hazırlanması şematik gösterimi



Şekil 2. 2. Lidokain moleküler baskılı nanopartiküllerin sentezi

2.2.1. Lidokain moleküler baskılı ve baskısız nanopartiküllerin karakterizasyonu

FT-IR ile fonksiyonel grup analizi için, yaklaşık 2 mg kurutulmuş MIP ve NIP nanopartikülleri ve 100 mg KBr peleti hazırlanarak 400-4000 cm^{-1} aralığında ölçüm yapılmıştır.

Hazırlanan nanopartiküllerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak da incelenmiştir. SEM analizleri için numuneler analizden önce oda sıcaklığında kurutulmuş; MIP ve NIP nanopartikülleri SEM analizi öncesinde 2 dakika boyunca altın ile kaplanmıştır. Nanopartiküller daha sonra SEM cihazında numune tutucuya yerleştirilip, görüntüleme için farklı büyütme uygulamaları uygulanarak taranmıştır.

Lidokain bağlanma çalışmaları, 5, 10, 25, 50, 100 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) derişimlerinde 5 mL stok çözeltileri, 5 mg MIP nanopartiküllerine ilave edilmiş ve 37°C 'de 24 saat karışmaya bırakılmıştır. Ardından, çözeltiler 10000 rpm'de 10 dakika santrifüje tabi tutulmuş ve nanopartiküllerin ayrılmasından sonra, süpernatant alınarak 263 nm dalga boyunda HPLC-UV sistemi ile analiz edilmiştir. Bütün çalışmalar aynı koşullarda NIP nanopartikülleri için de tekrarlanmıştır.

HPLC analizlerinde, mobil faz olarak %1 asetik asit içeren 20:80 (v/v) metanol/deiyonize su kullanılmıştır. Analitik kolon C_{18} kolonu olup (5.0 μm , 150x4.0 mm), analiz sırasında izokratik elüsyon uygulanmıştır. Enjeksiyon hacmi ve akış hızı değerleri sırasıyla 10 μL ve 1.5 mL min^{-1} idi.

Hazırlanan MIP ve NIP'lerin hedef bileşik lidokaine karşı lidokain bağlama kapasitesi, aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Q = (C_0 - C_t) V/m \quad (2.1)$$

Denklem 2.1.'de Q bağlanma kapasitesi ($\mu\text{g mg}^{-1}$), C_0 lidokainin ilk derişimi ($\mu\text{g mL}^{-1}$), C_t lidokain'in denge derişimi ($\mu\text{g mL}^{-1}$), V numune hacmidir. m ise MIP ve NIP'nin kütlesidir (g).

MIP ve NIP'lerin lidokaine karşı bağlama denge sabitleri ve baskılama faktörü aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

$$K_d = Q/C_t \quad (2.2)$$

$$IF = K_{\text{MIP}}/K_{\text{NIP}} \quad (2.3)$$

Denklem 2.2'de K_d bağlama denge sabiti, Denklem 2.3'de IF moleküler baskılama faktörüdür.

MIP nanopartiküllerinin, *in vivo* performansı hakkında bir fikir edinmek için, lidokainin vücut sıvısı iyonik bileşimini taklit eden bir ortamdaki lidokainin bağlanması da araştırılmıştır. Bu amaçla, derişimleri 1 L için Tablo 2.3'de verilen bileşenlerden oluşan sulu çözelti hazırlanmıştır.

Lidokain bağlanma çalışmaları kapsamındaki işlemlerin aynısı yapılmıştır.

Bağlanma kinetiği üzerinde yapılan çalışmalar, lidokain MIP nanopartiküllerinin hedef bileşik lidokaine karşı bağlanma yeteneğinin zaman içinde nasıl değiştiğini değerlendirmek için yapılmıştır.

Tablo 2. 3. Vücut sıvısı iyonik bileşimi

NaCl	6,8 g
KCl	0.4 g
CaCl ₂	0.2 g
NaHCO ₃	2,2 g
Na ₂ HPO ₄	0.126 g
NaH ₂ PO ₄	0.026 g
MgSO ₄	0.1 g

MIP nanopartiküllerinin lidokain bağlama kapasitesinin, asidik ve alkali pH ortamında değerlerini saptamak amacıyla pH çalışmaları yapılmıştır.

MIP nanopartiküllerinin lidokain seçiciliği çalışmaları, benzer bir moleküler yapıya sahip olan bupivakain kullanılarak incelenmiştir.

Yeniden kullanılabilirliğin araştırılması için hazırlanan lidokain moleküler baskılı nanopartiküllere lidokain bağlama işlemi, aynı nanopartiküller kullanılarak kalıp molekülün yıkama ile polimerik yapıdan uzaklaştırılması ve tekrar lidokain ile muamele edilmesi şeklinde 10 kez gerçekleştirilmiştir.

2.3. 3B Biyobasım Çalışmaları

2.3.1. Peritoneal adezyonların önlenmesine yardımcı membran üretimi için biyomalzeme seçimi

Destek malzemesi olarak, yüksek biyouyumluluk ve biyobozunurluk sergileyen doğal biyopolimer olan kolajen seçilmiştir. Ayrıca kolajenin antioksidan aktivitesi yara iyileşme sürecine katılarak iyileşmeyi hızlandırır. Diğer bir biyopolimer olan karboksimetilselüloz hem 3B yapılar elde etmek için 3B basılabilirliği artırmakta, hem de şişme/kalınlaşma fonksiyonundan dolayı membran oluşumuna yardımcı olmaktadır. Lidokaine doygun hale getirilen MIP nanopartikülleri, yapısından lidokaini salması ve analjezi sağlaması amacıyla biyomalzemeye eklenmiştir. 3B basılabilir biyomalzeme karışım oranlarını belirlemek için farklı derişimlerde denemeler yapılmıştır.

2.3.2. Biyobasılabilirlik

Biyomalzemenin optimum basılabilirlik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla bazı parametreler üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Öncelikle basılabilir bir biyomalzeme karışımı elde etmek için kolajen miktarı %1 (w/v) sabit kalacak şekilde, karboksimetilselüloz oranları değiştirilmiş ve miktarı belirlenmiştir. Biyomalzeme total hacmi içerisinde %2,5, %4, %7 ve %7,5 oranlarıyla karboksimetilselüloz basılabilirlik denemeleri yapılmıştır. Sıcaklık aralığı 18°C ve 30°C, basınç denemeleri 0,7 bar ile 2,5 bar arasında, 25G ve 22G iğne ucu kullanarak biyobasım optimum koşulları belirlenmiştir.

2.3.3. Hücre Çoğaltılması ve 3B Hücre Kültürü

Çalışmalarda, CCD-19Lu (ATCC®CCL-210TM) akciğer fibroblast hücre türü kullanılmıştır. Hücre kültürü yapılmış ve hücreler triphan-blue ile etkileştirilerek LUNA-II hücre sayım cihazında sayımı yapılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında, normal akciğer hücresi DMEM besi yeri ortamında çoğaltılarak pasajlanmıştır. Pasajlama işleminde, inkübatörden çıkarılan hücreler ışık mikroskopunda kontrol edildikten sonra besi yerleri dökülerek fosfat tamponuyla yıkanmıştır. Ardından, Tripsin-EDTA çözeltisi ile etkileştirilerek hücrelerin flastan kaldırılması sağlanmıştır. Üzerine besi yeri eklenen hücreler, santrifüj tüpüne alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek hücre peleti elde edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak hücre peleti besiyerinde pipetlenmiş ve flaska konularak CO₂'li inkübatöre konulmuştur.

Doku iskeleleri, hücre ekim işleminden önce 4 saat UV altında steril edilmiştir. Steril 6 hücreli plakalara yerleştirilen doku iskelelerine 5x10⁴ hücremL⁻¹ olacak şekilde 1mL hücre süspansiyonu damlatılmış ve doku iskeleleri 37°C sıcaklık altında, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

2.3.4. Peritoneal adezyonların önlenmesine yardımcı membran geliştirilmesi

Biyomürekkep bileşimi, %5 asetik asit içerisinde çözündürülmüş %1 kolajen, deiyonize su içerisinde 60°C 'de 2 saat karıştırılmış %14 CMC'nin 1:1 (v/v) oranlarıyla, kolajen miktarının %2,5 (w/v) oranına tekabül eden lidokain MIP nanopartiküllerinin eklenmesiyle oluşturulmuştur. Homojen hale getirilen biyomalzemenin biyobasılabilirlik

optimum koşulları belirlenmiş ve 1 x 1 cm boyutlarında, 1,5 mm aralıklı tasarlanan doku iskeleleri 3B basım işlemi yapılarak elde edilmiştir. Ayrıca lidokain, sulu çözelti (20 mgmL⁻¹) şeklinde biyomalzeme bileşenine eklenerek aynı tasarımda doku iskeleleri de elde edilmiştir.

2.3.5. Peritoneal adezyonların önlenmesine yardımcı membran karakterizasyonu

Üretilen membran karakterizasyonu biyobozunurluk çalışmaları, şişme derecesi, SEM görüntüleri ve optik mikroskop görüntüleri ile yapılmıştır.

Doku iskeleleri, biyobozunurluk çalışmaları için 37°C sıcaklıkta, 50 rpm çalkama hızında fosfat tamponu içerisinde bırakılmıştır. Farklı zamanlarda önceden belirlenmiş doku iskeleleri ortamdan alınarak yapısal değişiklikleri gözlemlenmiş ve bozunma dereceleri Denklem 2.4'de gösterilen denkleme göre hesaplanmıştır. Ayrıca fosfat tamponu içerisinde yaşanan kütle kaybının % olarak ne kadarının kolajen olduğu Sirius Red boyası kullanılarak kolajen miktar tayini ile belirlenmiştir.

$$\text{Bozunurluk \%} = [W_0 - W_s / W_0] \times 100 \quad (2.4)$$

W_s ve W_0 , sırasıyla doku iskelerinin son ve ilk ağırlıklarını temsil etmektedir.

Optik mikroskop görüntüleri, 4x ile 8x aralığında büyütme değerleri ile doku iskelelerinin yapısal özelliklerini belirlemek için kullanılmıştır.

Şişme derecesi, Denklem 2.5 ile belirlenirken, W_s doku iskelesinin su içerisinde bekletilmiş ve 24 saat sonundaki şişmiş ağırlığını, W_0 ise su içerisine konulmadan önceki kuru ağırlığını ifade etmektedir.

$$\text{Şişme derecesi \%} = [W_s - W_0 / W_0] \times 100 \quad (2.5)$$

Üretilen doku iskelelerinin biyoyumumluluğu, CCD-19Lu (ATCC®CCL-210TM) akciğer fibroblast hücreleri ile 7 gün sürdürülen hücre canlılık testi ile belirlenmiştir. MTT (3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) testi için PBS tamponu ile 5 mgmL⁻¹ MTT çözeltisi hazırlanmıştır. 1., 3. ve 7. günlerde hücre ekilmiş doku iskeleleri üzerine 15 µL MTT çözeltisi eklenmiş ve 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. MTT metabolik olarak aktif hücrelerde dehidrogenaz enzimi aktivitesi ile indirgenerek mor renkli formazan kristalleri oluşturur. Formazan kristallerinin çözünmesi için doku iskeleleri üzerine 100 µL DMSO (dimetil sülfoksit) eklenmiş ve 37°C sıcaklık altında 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Doku iskelelerinin üzerinden alınan sıvı numunelerin absorbanları 545 nm dalga boyunda mikroparka okuyucu ile ölçülmüş ve farklı hücre sayılarına karşı hazırlanan kalibrasyon grafiğine göre canlı hücre sayıları belirlenmiştir.

2.3.6. Peritoneal adezyonların önlenmesine yardımcı membrandan lidokain salım çalışmaları

İlaç salım çalışmaları, kolajen, CMC ve lidokain MIP tabanlı doku iskeleleri, 7,35 pH'da hazırlanmış PBS tampon çözeltisi içerisinde 37°C sıcaklıkta, sabit karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Farklı zaman dilimlerinde numuneler alınmış, bu numunelerin HPLC analizi yapılmış ve salım profili oluşturulmuştur.

Lidokainin kromatografik ayrımı için 1.5 mLdk⁻¹ akış hızı, %1 asetik asit içeren 20:80 oranla metanol : deiyonize su mobil fazı ile C₁₈ kolonu kullanılmış ve bu HPLC koşulları altında 2.5 dakika süreyle elde edilmiştir.



3. SONUÇLAR

3.1. Kolajen İzolasyonu

3.1.1. Sirius Red ile kolajen miktar tayini

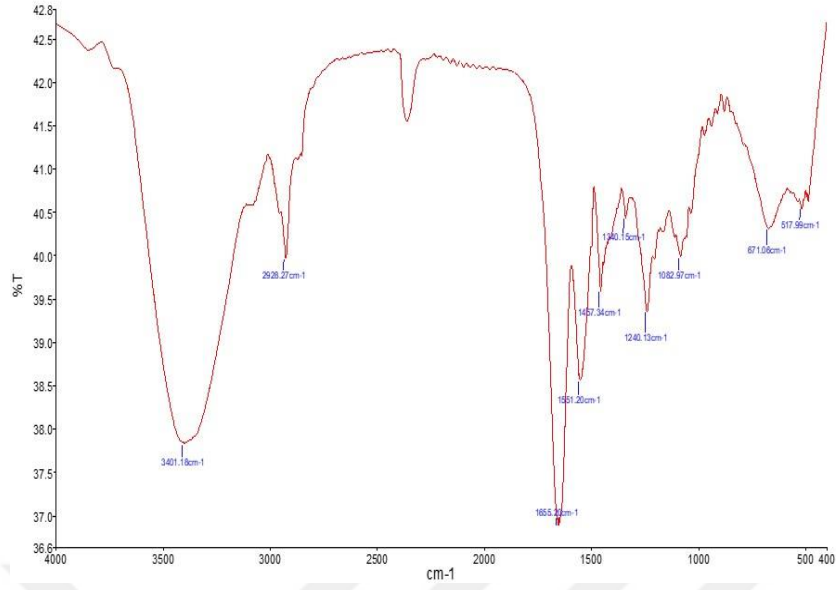
Güçlü bir anyonik boya olan Sirius Red, sülfonik asit grupları vasıtasıyla kolajen molekülünde mevcut olan bazik gruplar ile reaksiyona girerek kolajeni kırmızı renge boyamaktadır. Görsel 3.1.'de eppendorflarda sırasıyla kör örneği ve kolajen boya etkileşimi olan iki örnek görülmektedir. Boya ve kolajen etkileşimi sonucu kolajenler kırmızıya boyanmış ve santrifüj işlemi sonucu çökmüştür. Üst fazdan alınan örneklerin 540 nm'de mikropilaka okuyucu ile absorbanslarının ölçülmesiyle Sirius Red boyasının [7,7-(Karbonildiimiino) bis [4-hidroksi-3-[[2-sülfo-4-[(4-sülfofenil) azo] fenil] azo]-2-naftalensülfonik asit] heksasodyum tuzu] azalan miktarına göre derişim 2 mgmL^{-1} olarak hesaplanmıştır.



Görsel 3. 1. *Sirius Red boyası ile kolajenin etkileşimi*

3.1.2. FT-IR analizi

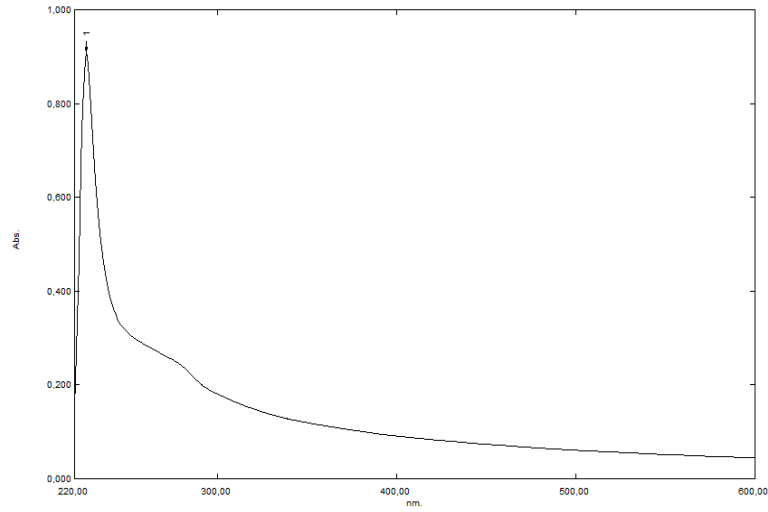
Tip 1 kolajenin FT-IR spektrumu Şekil 3.1.'de görülmektedir. Kolajene ait karakteristik bantlar 3401 cm^{-1} görülen Amid A bandı N-H gerilme frekansı, 2928 cm^{-1} de görülen Amid B bandı H-C-H grubunun asimetrik uzamını, 1655 cm^{-1} de görülen keskin Amid I bandı C=O ve C=N 'nin germe titreşimleri ve N-H'nin eğilme titreşimleri, 1551 cm^{-1} de görülen Amid II bandı C=N germe titreşimleri ve N-H eğilme titreşimleri, 1240 cm^{-1} de görülen Amid bandı amid bağlantılarından C-H ve N-H germe titreşimleridir. Ayrıca 1240 cm^{-1} de görülen Amid III bandı ve 1457 cm^{-1} bandının konumları arasındaki band, sarmal bir yapının varlığını göstermektedir.



Şekil 3. 1. Kolajenin FT-IR spektrumu

3.1.3. UV-Vis spektroskopisi

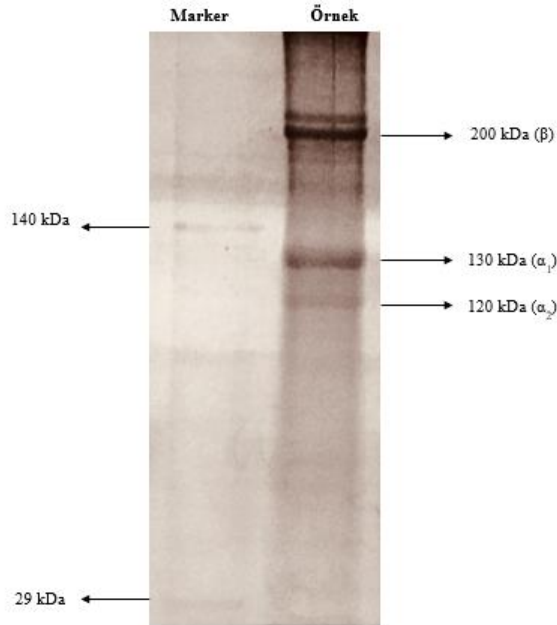
Proteinlerin çoğu ultraviyole bölgesinde, peptid bağındaki C=O bağının $n \rightarrow \pi^*$ geçişi nedeniyle 215-235 nm arasında olan absorpsiyon tepe noktasına ve ayrıca tirozin, triptofan ve fenilalanin aromatik kalıntılarındaki $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişi nedeniyle yaklaşık 250-290 nm'de olan başka bir absorpsiyon bölgesine sahiptir. Kolajende triptofan bulunmamakta, tirozin ve fenilalanin bulunmaktadır. İzole edilen tip 1 kolajenin 200-600 nm dalga boyları arasında absorpsiyon taraması yapılmıştır. Absorpsiyon spektrumu, 230 nm'de keskin bir tepe noktası, 250-290 nm bölgesinde geniş ve düşük tepe noktası göstermiştir. Bu veriler kolajenin polipeptid zincirlerinde -COOH, CONH₂ ve C=O gruplarına sahip amino asitlerin mevcudiyetini göstermiştir.



Şekil 3. 2. Kolajenin UV spektrumu

3.1.4. SDS-PAGE analizi

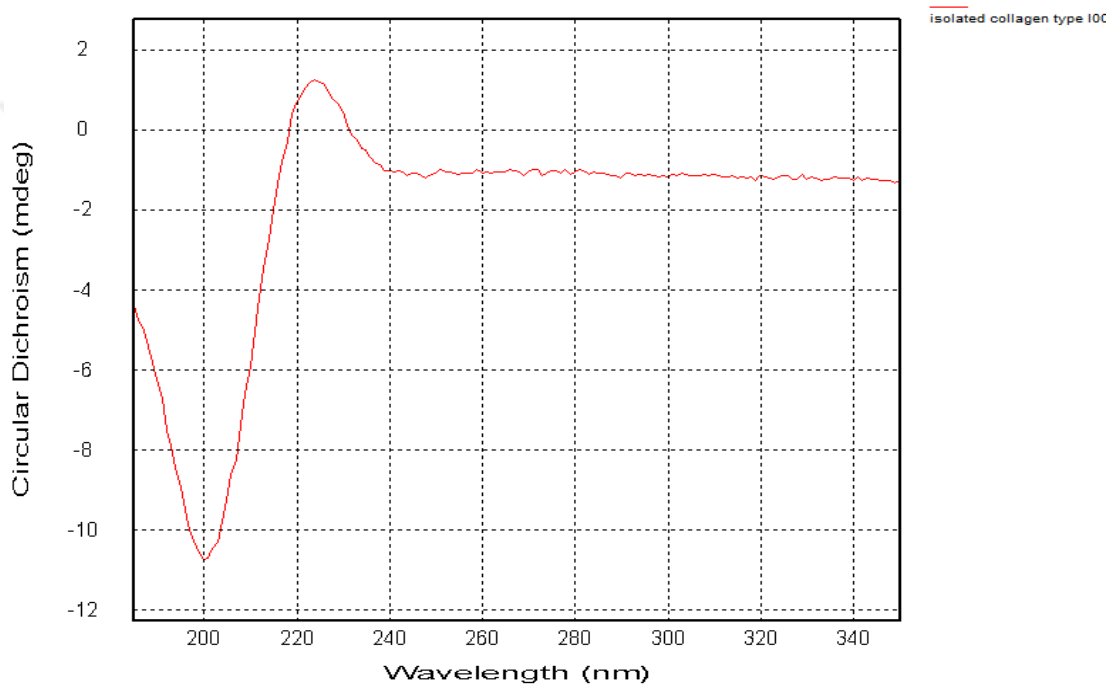
Koyun derisinden izole edilen kolajenin SDS-Page görüntüsü Görsel 3.2.'de görülmektedir. Görselde 200 kDa molekül ağırlığında β zinciri bandı, 120-130 kDa civarında α_1 , α_2 zincirlerini temsil eden spesifik bandlar görülmektedir. Bu bandlar, Tip 1 kolajenin α_1 , α_2 ve β zincirlerinin spesifik bandları olup, kolajen izolasyonunun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Marker olarak 140 kDa ağırlığında alkol dehidrogenaz ile 29 kDa karbonik anhidraz enzimi kullanılmıştır.



Görsel 3. 2. Kolajenin SDS-PAGE görüntüsü

3.1.5. CD analizi

Kolajenin CD spektrumunda Şekil 3.3.'deki gibi 200 nm'de minimum band ve 224 nm'de maksimum band alanı görülmektedir. Kolajenin CD spektrumu, poliprolin ve polihidroksiprolin zincirlerinde olan 200 nm'de $\pi \rightarrow \pi^*$ amid geçişine ve 224 nm'de pozitif bir $n \rightarrow \pi^*$ geçiş zirvesine sahiptir. CD spektrumunda uzak UV bölgesinde görülen bu iki band, peptit bağlarına ait olup, kolajenin üçlü sarmal yapı içeriğinin bir ölçüsüdür ve Tip 1 kolajen varlığını kanıtlamaktadır.



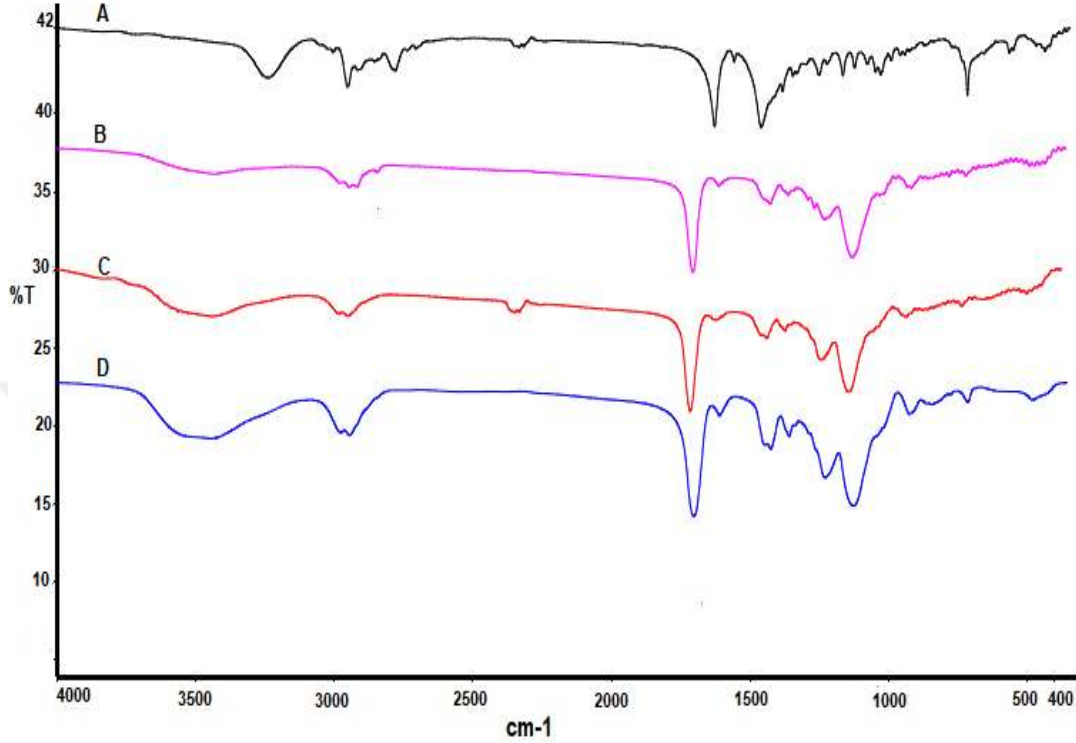
Şekil 3. 3. Kolajen CD spektrumu

3.2. Lidokain Moleküler Baskılı ve Baskısız Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.1. FT-IR analizi

Şekil 3.4. lidokain baskılı nanopartiküller ve baskısız nanopartiküllerin FT-IR spektrumlarını göstermektedir. 3254 cm^{-1} bir amid grubunu (H-N-C=O), 754 cm^{-1} civarında aromatik C-H halkasını, 1497 cm^{-1} güçlü sinyali C=C bağı, 1665 cm^{-1} bir karbonil grubu varlığını göstermektedir. Lidokain moleküler yapısında bulunan tersiyer amin, diğer aminler gibi -H'a doğrudan bağlı olmadığı için $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ aralığında bir sinyal vermemektedir. Bunun yerine 1073 cm^{-1} , 1208 cm^{-1} , 1292 cm^{-1} bölgelerinde sinyal

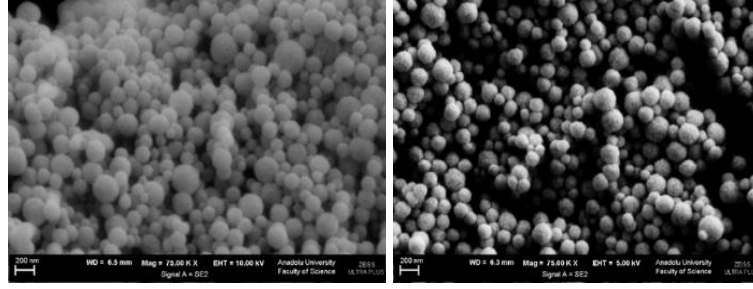
vermiştir. Yıkanmamış MIP spektrumunda görülen 754 cm^{-1} 'deki sinyal, lidokainden gelen aromatik C-H halkasına aittir.



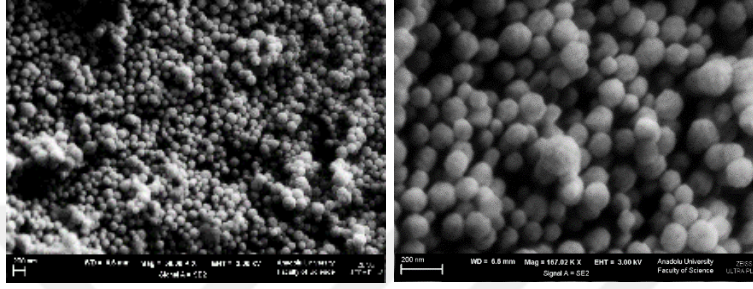
Şekil 3. 4. FT-IR Spektrumları A) Lidokain B) NIP C) MIP D) Yıkama yapılmamış MIP

3.2.2. SEM analizi

Lidokain baskılı nanopartiküllerin ve baskısız nanopartiküllerin elde edilen SEM görüntüleri, Şekil 3.5.'te verilmiştir. Baskılı nanoparçacıkların oldukça pürüzlü bir yüzeyle çevrili mikro gözenekli bir iç yapıya sahip olduğu ve lidokain moleküler baskılanan nanopartiküllerin baskısız nanopartiküllerden daha gözenekli olduğu görülmüştür. Nanopartiküllerin yüzeylerinin pürüzlülüğü, yüzey alanında bir artış sağlayan önemli bir faktördür.



a)

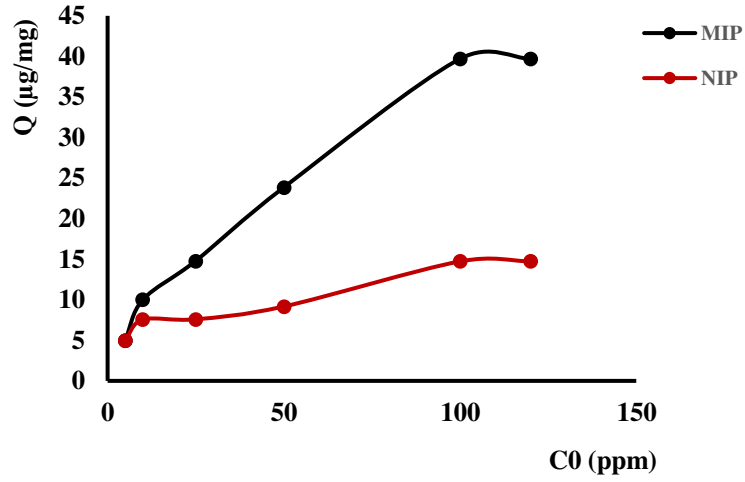


b)

Şekil 3. 5. a) Lidokain moleküler baskılı b) Lidokain moleküler baskısız nanopartiküllerin SEM görüntüleri

3.2.3. Lidokain bağlanma çalışmaları

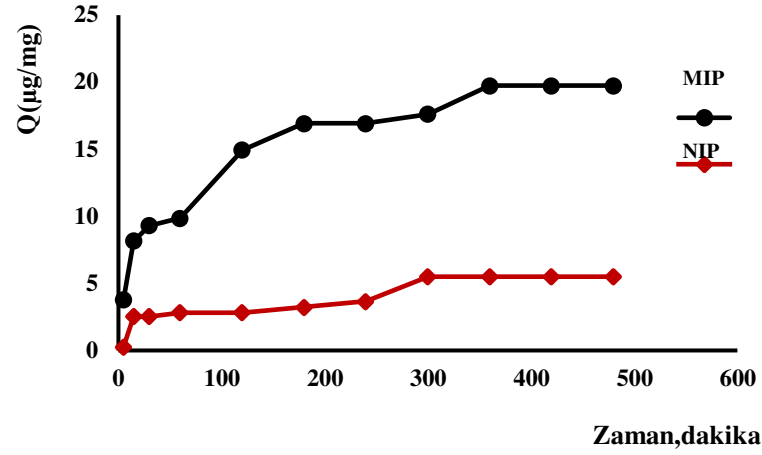
Lidokainin farklı derişimlerinin nanopartiküllere bağlanma üzerindeki etkisi, Şekil 3.6.'da verilmiştir. Baskılanan nanopartiküllerin, 5 ppm ila 150 ppm aralığında lidokain için yüksek bir bağlanma kapasitesi sergilediği görülmüştür. Şekil 3.6'da gösterildiği gibi, artan lidokain derişimi ile MIP'lerin lidokain bağlama kapasitesi artmış ve 100 ppm lidokain derişiminde lidokain molekülleri, bütün baskılı nanopartiküllerde bağlanma bölgelerini doldurmuş ve MIP maksimum bağlama dengesine ulaşmıştır. Baskılı nanopartiküllere bağlanan maksimum lidokain miktarı, $39.7 \mu\text{gmg}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bölüm 2.2.1'de gösterilen Denklem 2.2'ye göre, hesaplanan K_{MIP} ve K_{NIP} denge sabitleri ile Denklem 2.3'e göre IF değeri 3,26 olarak hesaplanmıştır. IF değeri, baskılı nanopartiküllerin hedef bileşiği bağlama kabiliyetinin bir göstergesidir ve değeri moleküler bağlanma için 1'in üzerinde olmalıdır.



Şekil 3. 6. Lidokainin derişimlerinin nanopartiküllere bağlanma üzerindeki etkisi

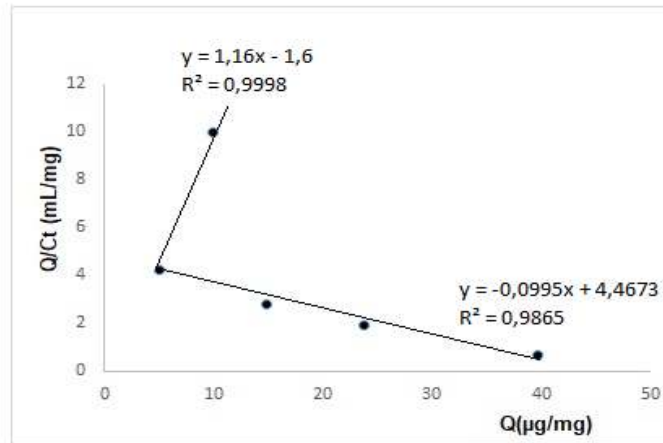
3.2.4. Kinetik çalışmalar

Bağlanma kinetiği üzerinde yapılan çalışmalar, baskılı nanopartiküllerin hedef bileşik lidokaine karşı bağlanma yeteneğinin zaman içinde nasıl değiştiğini değerlendirmek için yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.7. 'de verilmiştir. Baskılı nanopartiküllere yavaş yavaş 6 saatte bağlanan lidokain daha sonra dengeye ulaşmıştır. Nanopartiküllere lidokain bağlanması, bağlanma işleminin ilk 2 saatinde hızla gerçekleşmiş sonra, baskılı nanopartiküllerdeki lidokain moleküllerinin penetrasyonundaki zorluklar nedeniyle çok daha zor hale gelmiştir. 40 dakikaya kadar nanopartiküllere hızlı bağlanan lidokain ve baskılanan nanopartiküllerin polimerik yapısında bağlama grupları arasında güçlü afinite etkileşimleri olmaktadır. Baskısız nanopartiküllerin yapısında, lidokaine özgü bağlanma bölgeleri oluşmadığından güçlü etkileşimler görülmemektedir. Lidokainin ilk 15 dakikada başlayan ve devam eden, baskısız nanopartiküllere düşük bağlanma özelliği, nanopartiküller ile lidokain arasındaki elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanmaktadır.



Şekil 3. 7. Lidokainin moleküler baskılı ve moleküler baskısız nanopartiküllere bağlanmasında zamanın etkisi

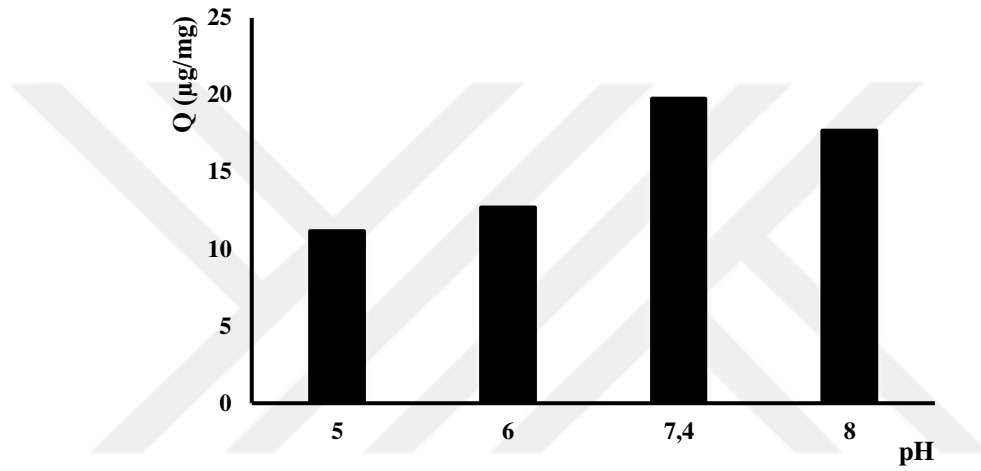
Scatchard grafikleri Q/C_t ve Q hesaplanarak elde edilmiştir. Hesaplanan doğruların eğimleri denge sabitini ve yatay eksenini kestikleri yer Q_{max} 'ı vermektedir. Şekil 3.8.'de gösterildiği gibi, elde edilen iki farklı doğru, lidokain baskılı nanopartiküllerin, hedef bileşik lidokain için iki bağlama bölgesine sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 3. 8. Lidokain baskılı nanopartiküllerin Scatchard eğrileri

3.2.5. pH etkisi

Maksimum lidokain bağlama kapasitesi, asidik ve alkali pH değerlerinde önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 3.9). 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişimindeki lidokain bağlanma çalışmalarında, en yüksek bağlanma pH 7.4 fosfat tamponunda 19.75 $\mu\text{g mg}^{-1}$ olarak elde edilmiştir. Lidokain'in pKa değeri 7.9 olduğundan, 7.9'dan daha düşük pH değerlerinde, lidokainin protonlanması sebebiyle lidokain ve baskılı nanopartiküllerin bağlanma bölgeleri arasındaki etkileşimlerin kuvvetinde azalma olmaktadır.



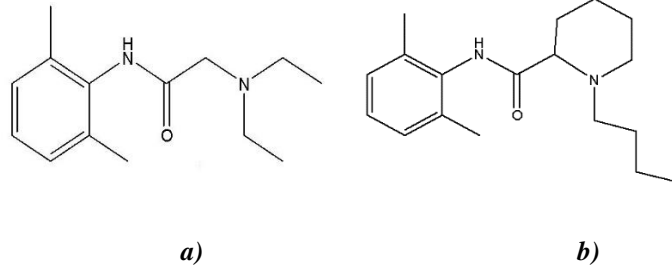
Şekil 3. 9. Lidokainin moleküler baskılı nanopartiküllere bağlanmasında pH etkisi

3.2.6. Lidokainin yapay vücut sıvısı ortamında bağlanma çalışmaları

Lidokainin Tablo 2.3'e göre hazırlanan yapay vücut sıvısı iyonik bileşimi ortamında bağlanma davranışı incelenmiştir. Bu çalışmalar kapsamında 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ lidokain derişimi ile çalışılmış ve maksimum lidokain bağlama kapasitesi 27.8 $\mu\text{g mg}^{-1}$ olarak elde edilmiştir. Yapılan pH çalışmalarında MIP'ler, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişimindeki lidokain için, en yüksek lidokain bağlama kapasitesini pH 7.4 fosfat tamponunda 19.75 $\mu\text{g mg}^{-1}$ değeri ile sergilemiştir. Yapay vücut sıvısı ortamında bağlama kapasitesi 27.8 $\mu\text{g mg}^{-1}$ olarak bulunmuş ve MIP'lerin bağlama kapasitesi artan iyonik kuvvet ile %16 artmıştır.

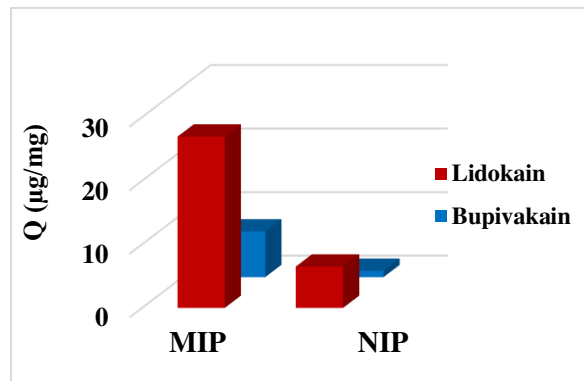
3.2.7. Seçicilik çalışmaları

Baskılı nanopartiküllerin lidokain seçiciliği çalışmaları, benzer bir moleküler yapıya sahip olan bupivakain (Şekil 3.10) kullanılarak incelenmiştir.



Şekil 3. 10. *a)* Lidokain *b)* Bupivakain moleküler yapısı

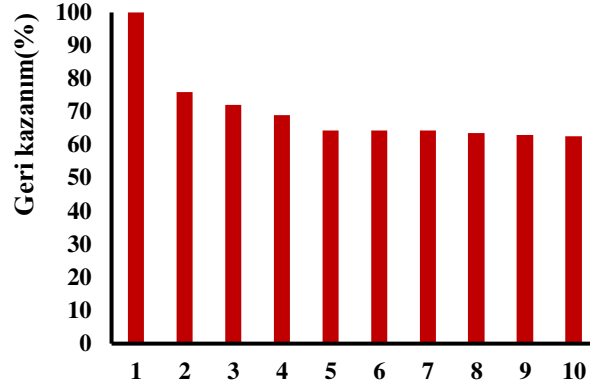
Şekil 3.11'de görüldüğü gibi, moleküler baskılı nanopartiküller, bupivakain varlığında lidokain için daha yüksek bağlanma kapasitesi sergilerler. Bu, hedef bileşik lidokain için polimerik yapıdaki şekil seçici oyukların var olması sebebiyle beklenen bir durumdur. Çapraz bağlanmış polimerik yapıdaki üç boyutlu boşluklar, lidokain moleküler şekli ve büyüklüğü ile eşleştirdiğinden, farklı bir şekle ve moleküler ağırlığa sahip olan bupivakainin lidokain baskılı nanopartiküllerdeki boşluklara / şekil seçici oyuklara bağlanması zor olmaktadır. Bupivakainin MIP'lere bağlanmasının düşük düzeyde olması, hem lidokaine özgü seçici boşluklardan, hem de bupivakain lidokaine göre daha fazla yer kapladığından, bağlanmanın MIP yüzeylerinde kısıtlı kalmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 3. 11. Moleküler baskılı (MIP) ve moleküler baskılanmamış (NIP) nanopartiküllerin lidokain seçiciliği

3.2.8. Desorbsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

Yeniden kullanılabilirliği araştırmak için hazırlanan lidokain baskılı nanopartiküllerin lidokain bağlama işlemi, aynı nanopartiküller kullanılarak 10 kez gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, tekrar kullanılabilme oranının %65'in üzerinde olduğunu göstermiştir.



Şekil 3. 12. Lidokain moleküler baskılı nanopartiküllerin tekrar kullanılabilirliği

3.3. 3B Biyobasım Çalışmaları

3.3.1. Peritoneal adezyonların önlenmesine yardımcı membran karakterizasyonu

3.3.1.1. 3B Basılabilirlik

Hazırlanmış biyomalzeme biyobasımı için parametrelerin (Tablo 3.1) belirlenmesi amacıyla biyomalzeme bileşim oranları, sıcaklık, basınç, iğne ucu seçimi denemeleri yapılmıştır.

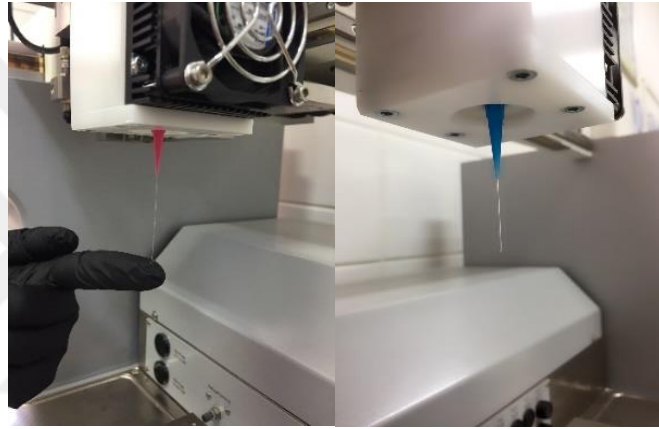
Tablo 3. 1. 3B Biyobaskı parametreleri

İğne Çapı (mm)	0.25
Baskı Sıcaklığı (°C)	30 °C
Baskı Hızı (mm/s)	10
Basınç (bar)	2.0 – 2.2
Akış Sonrası ve Öncesi Gecikmesi (s)	- 0.1 – 0.1
Kullanılan ink miktarı (µL)	~ 20
Baskı Süresi (s)	60
Boyutlar (mm) (X Y)	100 x 100

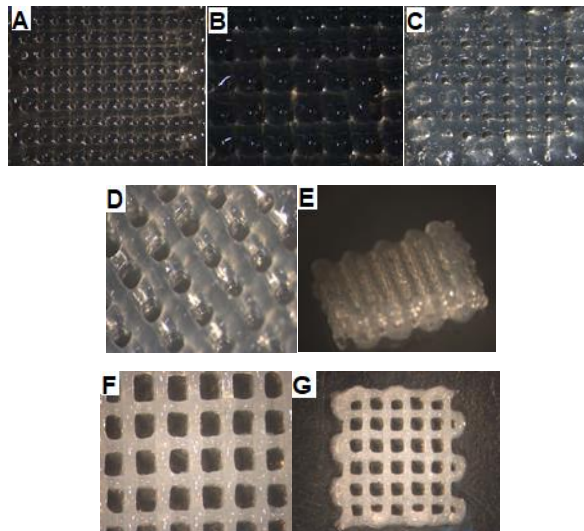
Şekil 3.13. A, B, C’de görülen %1 kolajen (w/v) oranı sabit tutularak, 25°C sıcaklıkta sırasıyla %2,5, %4 ve %7 (w/v) CMC oranıyla yapılan biyobasım işleminden elde edilen doku iskelelerinde çökme ve dağılmalar yoğun şekilde meydana gelmiştir.

Şekil 3.13. D ve E’de görülen doku iskeleleri, lidokain çözeltisi biyomalzeme bileşimine eklenmiş ve optimum koşullar 30°C sıcaklık, 1.5 bar basınç koşulları altında, 25G iğne ucu kullanılarak %1 kolajen, %7,5 CMC karışımından elde edilmiştir.

Şekil 3.13. C’de görülen doku iskeleleri ise, MIP nanopartikülleri biyomalzemeye eklenmesiyle ve optimum koşullar 30°C sıcaklık, 2,3 bar basınç ve 25G iğne ucu kullanılarak %7 CMC, %1 kolajen karışımından elde edilmiştir.



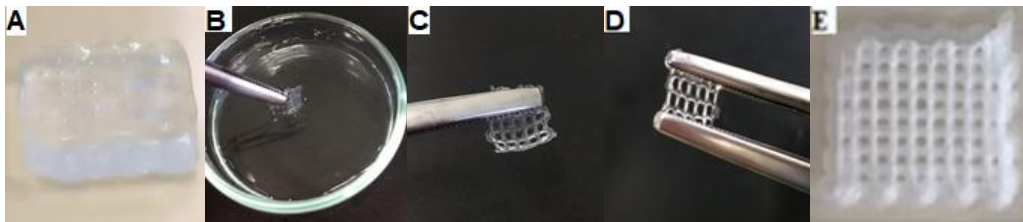
Görsel 3. 3. 3B Basılabilir biyomürekkep



Şekil 3. 13. Kolajen/Karboksimetilselüloz biyomalzeme optik mikroskop görüntüleri (A) %2,5 (w/v), (B) %4 (w/v) CMC, (C) %7 (w/v) CMC, (D-E) Lidokain-%1 (w/v) kolajen-%7,5 (w/v) CMC, (F-G) Lidokain MIP nanopartiküller-%1 (w/v) kolajen-%7 (w/v) CMC

Kolajenin koyun derisinden izolasyonu ile, kolajen fibrillerin kendiliğinden doğal çapraz bağlanmasının tahrip olması sonucu, kolajenin mekanik mukavemeti ve stabilitesi doğal durumundan düşüktür. Bu, kolajenin doku iskelesi olarak kullanım potansiyelini sınırlamakla birlikte, bu durumu iyileştirmek ve kolajenin enzimatik degradasyona karşı direncini artırması için çapraz bağlama gerekmektedir. Yaygın olarak kimyasal çapraz bağlama ajanı olan glutaraldehit kullanılmıştır. Glutaraldehit, kolajen molekülleri arasında tutulmakta ve reaksiyona girmemiş glutaraldehitin yapıdan uzaklaştırılması tam gerçekleşmediğinden toksik etkiler ortaya çıkabilmektedir. Bu sebeplerden daha düşük toksisite ve iyi biyoyumluluk sergilediği için [85] çapraz bağlama ajanı olarak EDC/NHS seçilmiştir. Çapraz bağlama işleminin, farklı derişim ve sürelerde deneme çalışmaları yapılmıştır. Doku iskeleleri, 3B basımdan hemen sonra belirlenen derişimde EDC/NHS (100 mM/50 mM) ve sitrik asit (4 M) ile 4 saat boyunca çapraz bağlanmıştır. Bu sürenin sonunda çapraz bağlanmamış biyopolimerlerin ve çapraz bağlama ajanlarının ortamdan uzaklaştırılması için doku iskeleleri 2 kez deiyonize su ile yıkanmıştır (Görsel 3.4. A, B, C). Çapraz bağlı doku iskeleleri, kırılğan olmayan sert bir yapıda elde edilmiş ve yapısal mukavemeti Görsel 3.4.D’de gösterilmektedir.

Elde edilen doku iskeleleri uygun sıcaklıkta dondurularak ardından liyofilize edilmiştir (Görsel 3.4.E). İskelelerde bulunan çözelti içerisinde oluşan buz kristallerinin, liyofilizatörde düşük sıcaklıkta ve vakum altında süblimleşerek mikro gözeneklerin oluşması sağlanmıştır.



Görsel 3. 4. (A) Çapraz bağlanmış doku iskelesi, (B-C) Çapraz bağlama sonrası yıkama işlemi ve hemen sonrası, (D) Çapraz bağlanmış doku iskelesinin yapısal mukavemeti, (E) Liyofilize edilen doku iskelesi

3.3.1.2. Biyoyumluluk

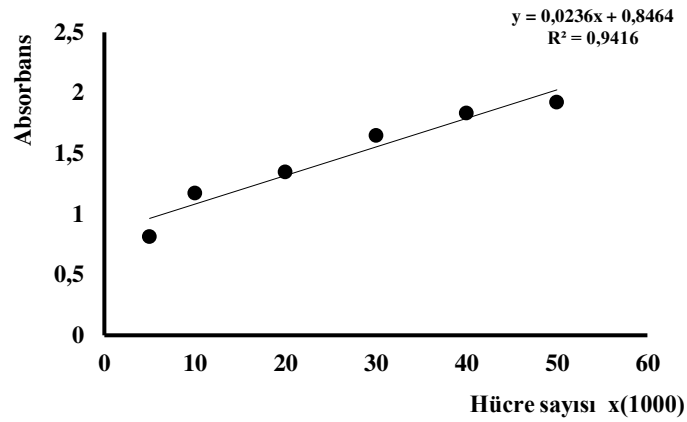
CCD-19Lu (ATCC®CCL-210TM) akciğer fibroblast hücreleri, doku iskeleleri üzerine ekilmeden önce %98 canlılık göstermiştir. MTT testi sonuçlarına göre, doku

iskeleleri üzerine ekilen hücrelerin 7. gün sonunda sitotoksik etkiye maruz kalmadıkları ve canlılıklarını çoğalarak sürdürdükleri (Tablo 3.2) görülmüştür.

Absorbans değerlerinin ifade ettiği hücre sayıları çizilen kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 3.15). Şekil 3.14’de doku iskeleleri üzerinde canlılıklarını sürdüren hücrelerin mikroskop görüntüleri görülmektedir.



Şekil 3. 14. Doku iskeleleri üzerinde canlılıklarını sürdüren hücrelerin mikroskop görüntüleri (4x büyütme, 7. gün sonu)



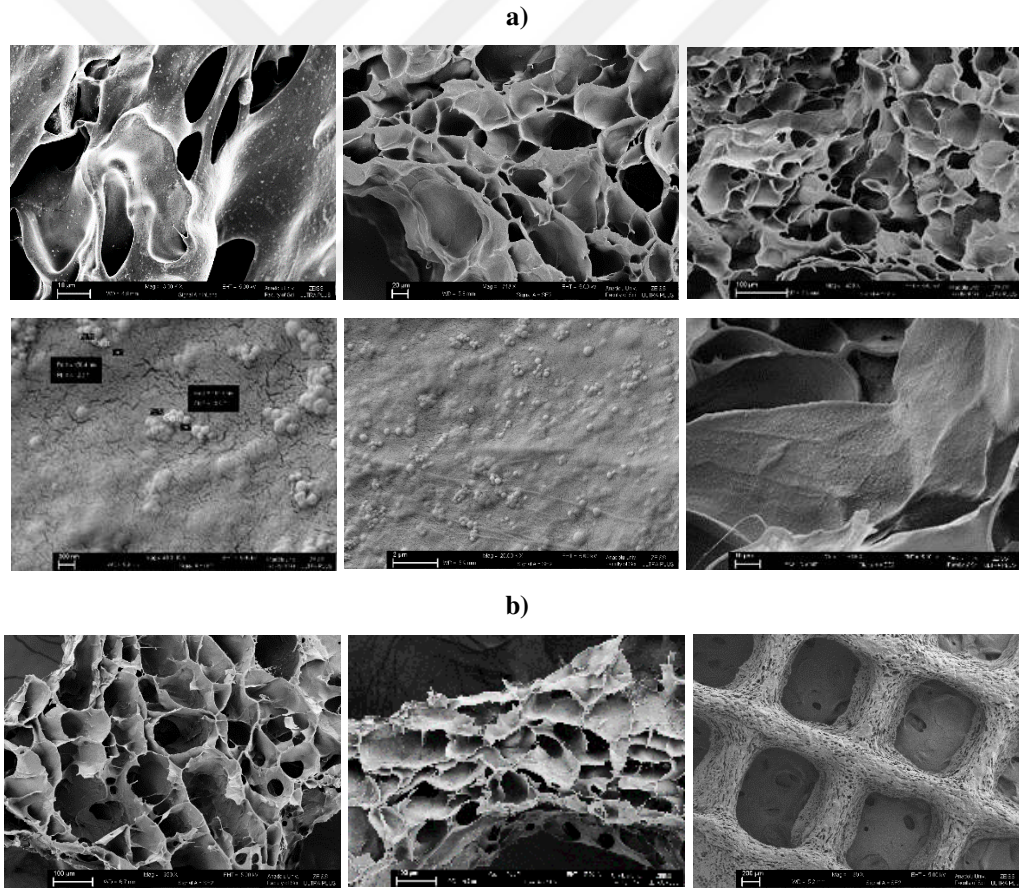
Şekil 3. 15. CCD-19Lu (ATCC®CCL-210TM) akciğer fibroblast hücre sayısı kalibrasyon grafiği

Tablo 3. 2. MTT testi sonuçları

	Kolajen-CMC Hücre Sayısı	Kolajen-CMC-MIP Hücre Sayısı	Kolajen-CMC-Lidokain Hücre Sayısı
1.gün	2,4 x 10 ⁴	2,2 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴
3.gün	3,2 x 10 ⁴	2,9 x 10 ⁴	2,7 x 10 ⁴
7.gün	5,7 x 10 ⁴	4,3 x 10 ⁴	4,2 x 10 ⁴

3.3.1.3. SEM analizi

Liyofilize edilen doku iskelelerinin gözenekliliğinin ve yüzey morfolojisinin belirlenmesi için SEM analizi yapılmıştır. Üretilen doku iskelelerinin, hücrel penetrasyonu, besinlerin ve oksijenin infiltrasyonunu sağlamak için birbirine bağlı gözeneklere ve yüksek gözenekliliğe sahip olduğu görülmüştür. Bu gözenekli yapının iskelelerde homojenize dağılımı gözlenmiştir. Gözeneklilik ilaç taşıma mekanizmasına ve ilaç salım hızına önemli ölçüde etki etmektedir. MIP nanopartiküllerinin dahil olduğu doku iskelelerinde gözenekliliğin daha fazla olması, nanopartiküllerin bu gözenekler aracılığıyla yapıya daha fazla difüze olmasını sağlamış, toplam ilaç tutma kapasitesi de artmıştır. Doku iskelelerinin morfolojik olarak doku mühendisliğinde kullanımı açısından uygun olduğu görülmüştür.



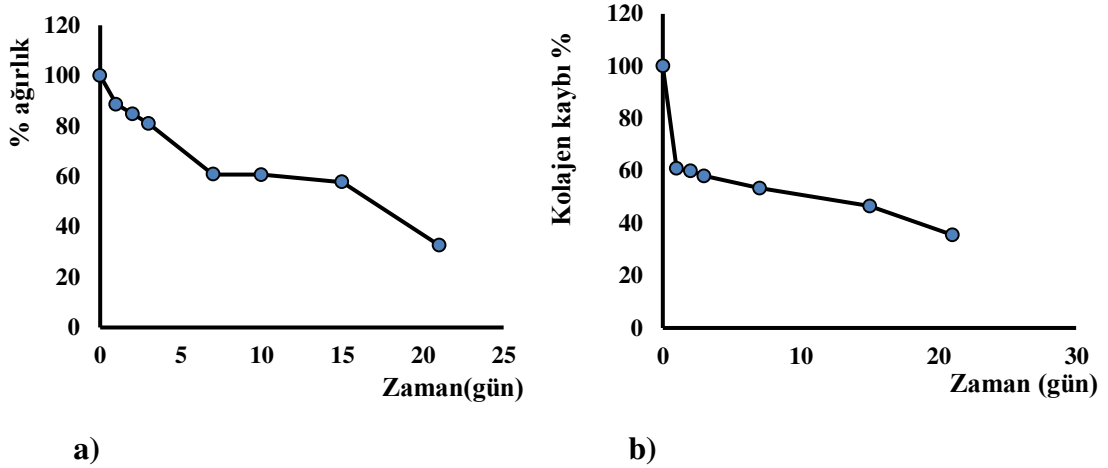
Şekil 3. 16. a) %1 kolajen-%7 CMC-MIP doku iskelesinin SEM görüntüleri b) %1 kolajen-%7,5 CMC-Lidokain doku iskelesinin SEM görüntüleri

3.3.1.4. Biyobozunurluk çalışmaları

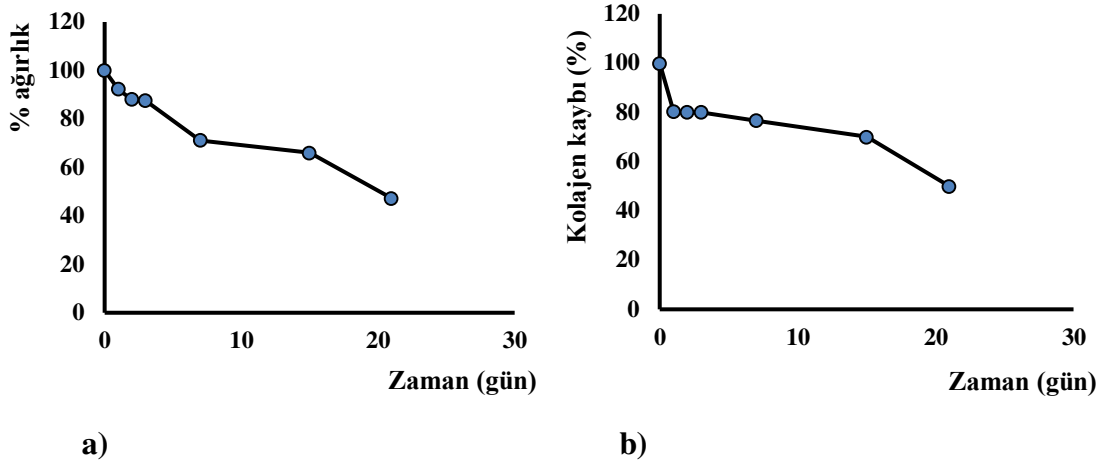
Biyobozunurluk çalışmaları kapsamında üretilen doku iskeleleri ağırlıkları tartılarak, pH 7,35 PBS tamponu içerisine, 37°C’de ve 50 rpm çalkalama hızında bırakılmıştır. Belirli zaman aralıklarında ortamdan alınan doku iskeleleri, yüzeyindeki tuzların uzaklaştırılması amacıyla deiyonize su ile yıkanarak liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyondan sonra tartılarak ağırlığı belirlenen iskelelerin bozunurluk hesaplamaları Denklem 2.2’e göre yapılmıştır.

İskelelerin yapısal özelliklerindeki değişiklikler gözlenmiş ve %1 kolajen-%7 CMC-MIP doku iskeleleri ilk 1. günde yapısının %88,68’ini, 3. günde %80,95’ini, 7. günde %60,84’ünü, 21. günde %32,64’ünü korumuştur (Şekil 3.15).

%1 kolajen-%7,5 CMC-lidokain doku iskeleleri ise, 1. günde yapısının %92,3’ünü, 3. günde %87,5’ini, 7. günde ise %71,15’ini, 21. günde %47,25’ini korumuştur (Şekil 3.16).



Şekil 3. 17. %1 kolajen-%7 CMC-MIP doku iskelelerinin; **a)** zamana göre biyobozunum profili
b) zamana göre kütle kaybı içerisindeki % kolajen miktar kaybı



Şekil 3. 18. %1 kolajen-%7,5 CMC-Lidokain doku iskelelerinin; **a)** zamana göre biyobozunum profili
b) zamana göre kütle kaybı içerisindeki % kolajen miktar kaybı

Ayrıca biyobozunurlukları hesaplanan iskelelerde, yaşanan kütle kaybı içeriğinin kolajen miktarı da Sirius Red boyasının azalan miktarına göre belirlenmiştir. Buna göre belirli zaman aralıklarında doku iskeleleri PBS içerisinden alınmış ve bu PBS ortamındaki kolajen miktarı Bölüm 2.1.1 'de anlatıldığı gibi tayin edilmiştir.

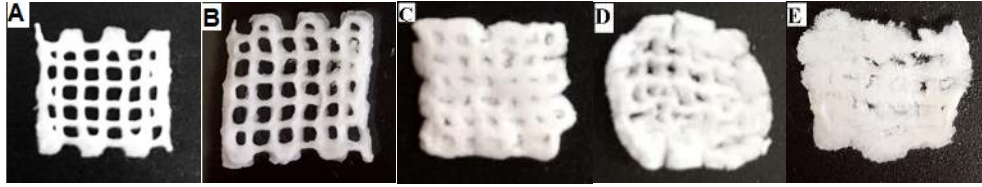
Bir adet doku iskelesi için, 3B biyobasımda yaklaşık olarak 20 μ L homojen biyomalzeme harcanmaktadır. Her bir doku iskelesi içeriği 50 μ g kolajen ve 700 μ g CMC'den oluşmaktadır. Bu veriler ile belirli günlerde PBS ortamından alınan doku iskelelerinin kütle kaybındaki kolajen miktarının belirlenmesiyle, toplam kütle kaybının içindeki % kolajen miktar kaybı hesaplanmıştır.

%1 kolajen-%7 CMC-MIP doku iskelesi, 1.gün kaybettiği %11,32 'lik kütlelerinde bulunan kolajen miktarının yaklaşık %60'ını ilk gün korumuştur (Şekil 3.15).

%1 kolajen-%7,5 CMC-lidokain doku iskelesi ise 1.gün kaybettiği %7,7 'lik kütlelerindeki kolajen miktarının yaklaşık %80,45'ini ilk gün korumuştur (Şekil 3.16).

Genel olarak bakıldığında, MIP nanopartiküllerinin bulunduğu iskelelerde bozunma daha fazla olmuştur. MIP nanopartiküllerinin iskeleye gömülü olması dolayısıyla, çapraz bağlanma daha zayıf gerçekleşmiş olabilir. Kolajen moleküllerinin arasında MIP nanopartikülleri olduğundan, kolajenin amin ve karboksilik gruplarına EDC/NHS çapraz bağlama ajanının ulaşma ihtimali zayıflamaktadır. Sonuç olarak daha az çapraz bağlı iskelelerin yüksek kayıpları 15. günden itibaren gözlemlenmiştir. Adezyon oluşumu için ilk 7 gün kritik süre olduğundan bu süreçteki toplam kütle kaybı ve kolajen miktar kaybı iskele bütünlüğü korunduğundan gözardı edilebilmektedir.

Doku iskelelerindeki gözle görülür bozulmalar, yüzey erozyonları şeklinde olmuş ve 15. günden sonra belirginleşmektedir. Görsel 3.5 'de 1, 7, 15, ve 21. gündeki iskele yapıları görülmektedir.

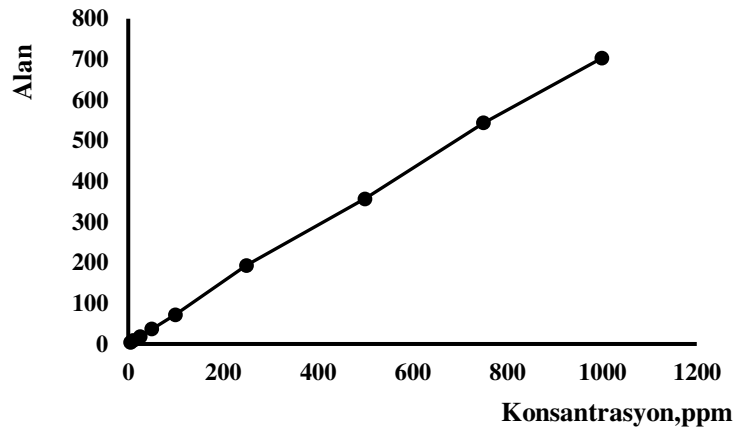


Görsel 3. 5. *Biyobozunurluk Çalışması (A) Liyofilize edilmiş doku iskelesi (B) 1. gün sonu, (C) 7. gün sonu, (D) 15. gün sonu, (E) 21. gün sonu liyofilize edilmiş doku iskelesi*

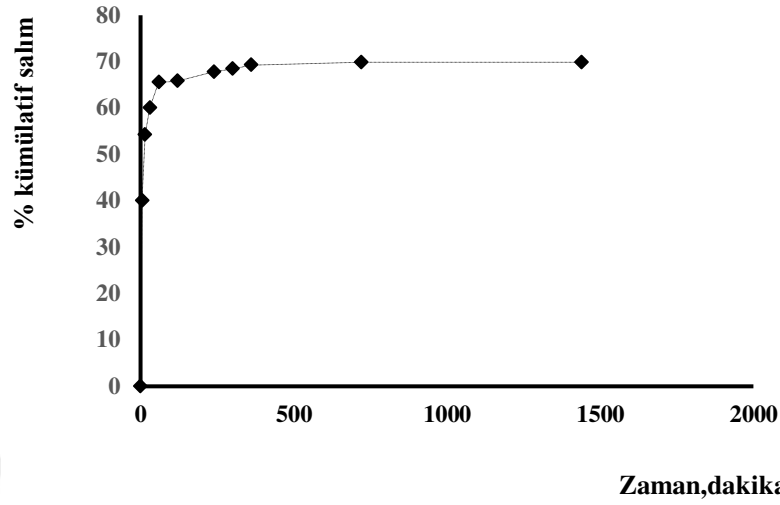
Doku iskelelerinin şişme testleri yapılmış ve MIP nanopartikülleri içeren iskelelerin su tutma kapasitesi denklem 2.3'e göre %1180, lidokain içeren iskelelerin ise %1050 olarak hesaplanmıştır. Karboksimetilselüloz yapısındaki karboksil gruplarının, kolajenin yapısında bulunan amino gruplarının fazlalığı ve böylece hidrojen bağlarının oluşması dolayısıyla su tutma kapasitesinin yüksek olması söz konusudur.

3.3.1.5. İlaç salım çalışmaları

İlaç salım çalışmaları, üretilen doku iskelelerinin içerisinde bulunduğu 7,35 pH'da hazırlanmış PBS tampon çözeltisinde, 37°C sıcaklıkta, sabit karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Farklı zaman dilimlerinde numuneler alınmış, bu numunelerin HPLC analizi sonucu, Şekil 3.17'deki kalibrasyon grafiğine göre hesaplamalar yapılarak salım profili oluşturulmuştur.

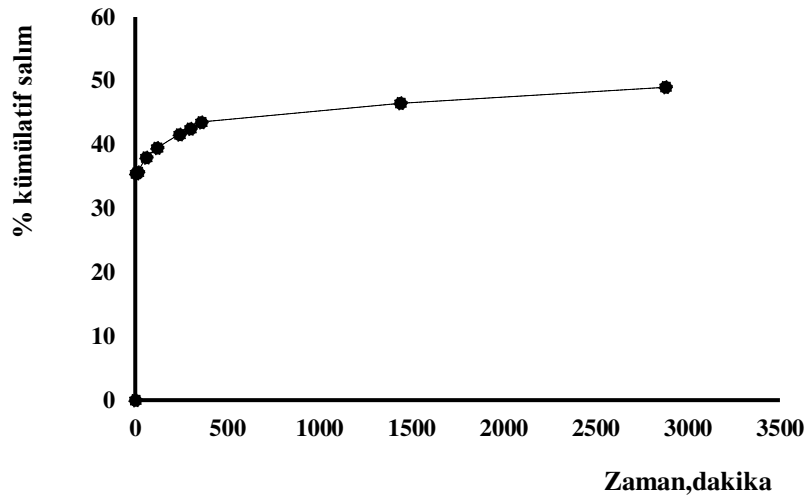


Şekil 3. 19. *Lidokain HPLC kalibrasyon grafiği*



Şekil 3. 20. %1 kolajen-%7 CMC-MIP doku iskelesinden lidokain salımı

%1 kolajen-%7 CMC-MIP nanopartikülleri içeren doku iskeleleri, 5. dakikada patlama yaparak, yapısında bulunan lidokain miktarının yaklaşık %40'ını MIP nanopartiküllerinden hızlı bir şekilde salmıştır. 1. günün sonunda iskeleler, yapıdaki lidokain moleküllerinin %70'ini serbest bırakmış ve ilaç salımı durmuştur (Şekil 3.18).



Şekil 3. 21. %1 kolajen-%7,5 CMC-Lidokain doku iskelesinden lidokain salımı

%1 kolajen-%7,5 CMC-lidokain içeren doku iskeleleri ise, 5. dakikada yapısındaki lidokainin yaklaşık %35,5'ini hızlı bir şekilde salmıştır. 2. günün sonunda lidokainin %48,99'unu serbest bırakmış ve ilaç salımı durmuştur (Şekil 3.19).

Kolajenin uzun zincirli yapısından dolayı, lidokain moleküllerinin ve MIP nanopartiküllerinin yapıda sıkışması muhtemeldir. İlaç yüklü MIP nanopartiküllerinin lidokain için daha fazla yüzey alanına sahip olmasından kaynaklı ilaç difüzyonu fazladır. Bu durum, lidokainin kontrollü salımı sonucunu doğurmaktadır. Ayrıca, MIP nanopartiküllerini içeren doku iskeleleri lidokain içeren iskelelere kıyasla daha fazla yapısal bozunurluk sergilediğinden lidokain salımının nanopartiküllerden hızlı olması beklenen bir durumdur.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında, cerrahi operasyonlar sonrasında peritoneal adezyonların önlenmesine yardımcı membran, yüksek biyoyumluluk ve biyobozunurluk sergileyen doğal polimer olan kolajen ve yarı sentetik polimer olan karboksimetilselülozdan üretilmiştir. Peritoneal adezyonların önlenmesi için, doğal polimerlerin direk kullanımları, in vivo enzimlere karşı yeterli mekanik mukavemete sahip olmadıklarından mümkün görünmemektedir. Sentetik veya yarı sentetik polimerlerin mekanik mukavemetleri yüksek olduğundan, doğal polimerlere 3B basılabilir özellik kazandırmakta, bu nedenle, doğal bir polimer ile sentetik veya yarı sentetik bir polimer karıştırılarak istenilen 3B basılabilir özellikler elde edilmektedir. Kolajen hücre tutunmasına sebep olan aminoasit dizilimi, yüksek biyoyumluluk, antioksidan aktivite ve uygun mekanik özellikler sergilemesi sebebiyle seçilmiştir. Karboksimetilselüloz ise, membran oluşturma özelliğini, mekanik mukavemeti ve 3B basılabilirliği arttırdığı için biyomürekkep bileşimine eklenmiştir.

Kolajen tip 1 koyun derisinden izole edilmiş, karakterizasyonu FT-IR, SDS-PAGE, UV ve CD analizleri ile yapılmıştır. Biyomürekkebe katılan lidokain moleküler bellekli nanopartiküller miniemülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiş, karakterizasyonu FT-IR, SEM, lidokaine seçicilik, desorbsiyon, pH etkisi, bağlanma, yapay vücut sıvısı iyonik bileşiminde bağlanma ve kinetik çalışmaları ile yapılmıştır. Geliştirilen biyomürekkebin optimum 3B basılabilirlik özellikleri, farklı sıcaklık, iğne ucu ve basınç değerleri ile belirlenmiştir. 3B biyobasımdan sonra doku iskeleleri, polimerlerin fiziksel özelliklerini iyileştirmek, enzimatik saldırılara karşı dayanıklılık yeteneğini artırmak için EDC/NHS ve sitrik asit ile çapraz bağlanmıştır.

Üretilen doku iskelelerinin çapraz bağlanma reaksiyonu sonrasında, hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerinde toksik etkisi olmadığı MTT testi ile ortaya konmuştur. Sitotoksitenin değerlendirilmesi biyomedikal uygulamalardaki malzemeler için çok önemlidir. MTT testi sonuçlarına göre, doku iskeleleri üzerine ekilen hücrelerin 7. gün sonunda sitotoksik etkiye maruz kalmadıkları ve canlılıklarını çoğalarak sürdürdükleri görülmektedir.

Membranın yüzey morfolojisi SEM ile incelenmiştir. Gözeneklilik ilaç taşıma mekanizmasına ve ilaç salım hızına önemli ölçüde etki etmektedir. MIP nanopartiküllerinin dahil olduğu doku iskelelerinde gözeneklilik daha yoğun gözlenmiştir. Bunun nanopartiküllerden kaynaklanan daha az çapraz bağlanmış iskele

yapısından kaynaklı olduğu söylenebilir. Nanopartiküllerin bu gözenekler aracılığıyla yapıya daha fazla difüze olması sağlanmış ve bunun sonucu olarak toplam ilaç tutma kapasitesi de artmıştır. Doku iskelelerinin morfolojik olarak doku mühendisliğinde kullanımının uygun olduğu görülmüştür.

Üretilen membranın yüksek su alım kapasitesi ile operasyon bölgesindeki kan ve opere edilen organdan sızabilen doku sıvıları emilebilecek ve bölgede nemli bir ortam sağlanacaktır. Ayrıca membranın, hücre göçü ve yapışması için gerekli olan protein adsorpsiyonuna izin veren fakat adezyon oluşumunu teşvik edeceğinden bu adsorpsiyonu azaltan hidrofilik yapıda olması oldukça önemlidir. Üretilen membranın su tutma kapasitesi %1180 olarak hesaplanmış ve yüksek hidrofilik özellikte olduğu görülmüştür. Adezyon önleyici membran, bitişik doku veya organ ekstrüzyonu, sürtünme ve bağırsak peristalsisi gibi uygulama sırasında çeşitli fiziksel streslerle karşı karşıya kalabilmektedir. Bu sebepten peritoneal yapışmanın önlenmesinde kullanılacak membranın operasyon bölgesinde hemen bozunmaması gerekmekte ve üretilen membran uzun süreli parçalanabilirliğe sahiptir. Özellikle adezyon oluşumunda kritik süre olan ilk 7 gün membran, yapısının kütleye yaklaşık %60'ını bozunmadan korumuştur. 21.günde ise yaklaşık %32'sini korumuştur.

Lidokain salım çalışmaları HPLC analizi ile yapılmış, kümülatif olarak hesaplanmıştır. Membranda bulunan MIP nanopartikülleri, ilk 5. dakikada toplam lidokain miktarının %40'ını, 1. günün sonunda ise %70'ini salmıştır. Lidokainin hızlı hareket etmesi, istenen verimli bir analjezi için gereklidir. Ayrıca nanopartiküllerden lidokain salımı, cerrahi operasyon bölgesinde olacağından, önemli sistemik dağılım beklenmemektedir. Postoperatif analjezi gereksinimi de özellikle ilk gün önemli ölçüde azalacak, bu durumda sistemik komplikasyonların oluşması engellenecektir.

Literatürde yapılan çalışmalarda; hyalüronik asit, CMC gibi yüksek viskoziteli bariyer solüsyonlarının, adezyon oluşumuna sebep olan yüzeylere enjeksiyonu sonucu adezyon oluşumunu azalttığı yönünde bulgular elde edilmiştir. PLGA, PLLA, CMC, kolajen, kitosan polimerleri yoğunlukla adezyon önleyici membran veya nanolifli yüzeyler üretilmesi için kullanılmışlardır. Poli-laktik asit (PLLA), poli (laktik-glikolik asit) (PLGA) ve polietersülfon (PES) polimerlerinden elde edilen nanolifli yüzeyler, fareler üzerinde adezyon bariyeri olarak uygulanmış, insan mezenkimal hücrelerinin nanolifli yüzeylere tutunmasının *in vivo* ortamda değerlendirilmesi yapılarak ticari adezyon önleyici ürün olan Interceed'e göre daha etkin olduğu vurgulanmıştır [80].

Başka bir çalışmada kitosan alginat ve kalsiyum alginat nanolifli yüzeyler *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda adezyon bariyeri olarak birbiriyle kıyaslanmış, kitosan alginatlı yüzeyin adezyon önlemede daha etkin olduğu tespiti yapılmıştır. 5. gün sonunda kalsiyum alginat ve kitosan alginat bariyerleri, *in vitro* ortamda yapılan bozunurluk çalışmaları kapsamında, yapısının sırasıyla yaklaşık %57 ve %37'si kaybettiği belirtilmiştir. Sitotoksitenin değerlendirilmesi için MTT testi sonucunda, L929 hücreleri kalsiyum alginat ve kitosan alginat üzerinde çoğalmış, fakat kitosan alginat üzerindeki çoğalma oranı kalsiyum alginat bariyeri yüzeyindeki hücre çoğalmasından daha yavaş olduğu gösterilmiştir [81].

Bir diğer çalışmada, karboksimetil kitosan/karboksimetil selüloz/kolajen polimerlerinden membran hazırlanmış ve *in vivo* çalışmalar sonrasında peritoneal adezyonu önlediği vurgulanmıştır. Hazırlanan membranın *in vitro* ortamda yapılan bozunurluk çalışmalarında, ağırlıklarının %80, %70 ve %50'sini, sırasıyla 5., 10. ve 15. günlerde koruduğu belirtilmiştir. MTT testine göre 3. gün sonunda hücre proliferasyonu gözlemlendiği belirtilmiştir [83].

FDA onaylı 2 ticari ürün ise, hyalüronik asit ve karboksimetil selülozdan üretilmiş, EDC/NHS ile çapraz bağlı Seprafilm membranıdır. Diğer bir ürün okside rejenere selülozdan üretilen Interceed hemostatik ajanıdır. Bu membranların adezyonların önlenmesine yardımcı etkinlikleri yüksek olup, hala adezyonların oluşumunu tamamen engelleyen bir uygulama veya membran ürünü bulunmamaktadır.

Tez çalışması kapsamında; 3B biyoyazıcı teknolojisi ile üretilen adezyonu önlemeye yardımcı membranın, lidokain yüklenmiş nanopartikülleri içermesi ile operasyon bölgesinde adezyonu önlemesinin yanı sıra analjezi sağlayacak olması, mevcut adezyon önleyici membran ve filmlere kıyasla yenilikçi hedefleri barındırmakta ve tez çalışmasına özgünlük katmaktadır. Üretilen membranın yapılan *in vitro* bozunurluk çalışmaları ile yapısını, literatürde yer alan adezyon önleyici membran çalışmalarıyla karşılaştırıldığında, adezyon oluşumunda kritik süre olan ilk 7 günde yüksek oranda korunduğu görülmektedir. Sitotoksite çalışmaları kapsamında yapılan MTT testi ile CCD-19Lu (ATCC®CCL-210TM) akciğer fibroblast hücrelerinin 7 gün boyunca çoğalarak canlılıklarını sürdürdükleri görülmüştür.

Halk sağlığını tehdit eden olgulardan birisi olan doku adezyonlarının, günümüzde gelişen tıbbi yöntemlerin etkisiyle abdominal operasyonların sürekli yapıyor olması ile daha sık gelişmesi sonucunu doğurmaktadır. Adezyonları önleyen kesin bir çözüm

bulunamamış, çalışmalar adezyon önleyici bariyer/membran üzerinde ağırlık kazanmıştır. 3B biyoyazıcı teknolojisi ile üretilen adezyon önleyici membran üzerinde yapılan çalışmalar, peritoneal dokularla uyum sağlayabileceği ve bariyer görevi üstlenebileceği sonucunu doğurmaktadır.



KAYNAKÇA

- [1] J. Landercasper, T.H. Cogbill, W.H. Merry, R.T. Stolee, P.J. Strutt, In 1947, (2015).
- [2] Nancy F , John W, LarsenG, Robert S. “Economic impact of hospitalizasyon for lower abdominal adhesiolysis in the USA in 1988.” Surg.Gynecol. obstet. 1993,176:2716.
- [3] F.J. O’Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, Mater. Today. 14 (2011) 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X).
- [4] R. NEREM, S25.1. Tissue engineering: From biology to biological substitutes, Biorheology. 32 (1995) 193–194. [https://doi.org/10.1016/0006-355x\(95\)92083-m](https://doi.org/10.1016/0006-355x(95)92083-m).
- [5] S. V. Murphy, A. Atala, 3D bioprinting of tissues and organs, Nat. Biotechnol. 32 (2014) 773–785. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>.
- [6] D.F. Williams, On the mechanisms of biocompatibility, Biomaterials. 29 (2008) 2941–2953. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>.
- [7] A. Atala, S.B. Bauer, S. Soker, J.J. Yoo, A.B. Retik, Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty, Lancet. 367 (2006) 1241–1246. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68438-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68438-9).
- [8] W. Zhu, X. Ma, M. Gou, D. Mei, K. Zhang, S. Chen, 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering, Curr. Opin. Biotechnol. 40 (2016) 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.03.014>.
- [9] B.W. Kim, Clinical regenerative medicine in urology, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2723-9>.
- [10] C.W. Hull, Arcadia, Calif, United States Patent (19), (1984) 16.
- [11] M. Nakamura, S. Iwanaga, C. Henmi, K. Arai, Y. Nishiyama, Biomaterials and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication, Biofabrication. 2 (2010). <https://doi.org/10.1088/1758-5082/2/1/014110>.
- [12] R. Bracci, E. Maccaroni, S. Cascinu, Transient sunitinib resistance in gastrointestinal stromal tumors, N. Engl. J. Med. 368 (2013) 2042–2043. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1301237>.
- [13] B. Duan, L.A. Hockaday, K.H. Kang, J.T. Butcher, 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels, J. Biomed. Mater. Res. - Part A. 101 A (2013) 1255–1264. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34420>.

- [14] K. Hölzl, S. Lin, L. Tytgat, S. Van Vlierberghe, L. Gu, A. Ovsianikov, Bioink properties before, during and after 3D bioprinting, *Biofabrication*. 8 (2016). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/032002>.
- [15] B. Zhang, L. Gao, L. Ma, Y. Luo, H. Yang, Z. Cui, 3D Bioprinting: A Novel Avenue for Manufacturing Tissues and Organs, *Engineering*. 5 (2019) 777–794. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2019.03.009>.
- [16] D. Hutmacher, T. Woodfield, P. Dalton, J. Lewis, Scaffold design and fabrication, *Tissue Eng.* (2008) 403–454. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370869-4.00014-8>.
- [17] J.M. Sandberg, A. Atala, Tissue Engineering of Organ Systems, *Tissue Eng. Second Ed.* (2014) 685–716. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420145-3.00019-5>.
- [18] M. Gomes, H. Azevedo, P. Malafaya, S. Silva, J. Oliveira, G. Silva, R. Sousa, J. Mano, R. Reis, Chapter 6 Natural Polymers in tissue engineering applications Chapter objectives :, *Tissue Eng.* (n.d.).
- [19] Z. Zhang, O. Ortiz, R. Goyal, J. Kohn, Biodegradable Polymers, Elsevier Inc., 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-22805-3.00013-X>.
- [20] F. Relations, F. Relations, F. Affairs, Military , Scientific , and Technological, 77 (2014) 15–16.
- [21] Y. Hayata, NII-Electronic Library Service, *Chem. Pharm. Bull.* (2002) 2091. <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>.
- [22] R. Langer, Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: One laboratory's experience, *Acc. Chem. Res.* 33 (2000) 94–101. <https://doi.org/10.1021/ar9800993>.
- [23] R. Fernández-Urrusuno, P. Calvo, C. Remuñán-López, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1576–1581. <https://doi.org/10.1023/A:1018908705446>.
- [24] P. Calvo, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers, *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 530–536. <https://doi.org/10.1021/js950474+>.
- [25] K.S. Silvipriya, K. Krishna Kumar, A.R. Bhat, B. Dinesh Kumar, A. John, P. Lakshmanan, Collagen: Animal sources and biomedical application, *J. Appl.*

- Pharm. Sci. 5 (2015) 123–127. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50322>.
- [26] C. Niyibizi, D.R. Eyre, Structural Characteristics of Cross-Linking Sites in type V Collagen of Bone, *Eur. J. Biochem.* 224 (1994) 943–950. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00943.x>.
- [27] K.I. Kivirikko, R. Myllylä, [10] Posttranslational Enzymes in the Biosynthesis of Collagen: Intracellular Enzymes, 1982. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)82067-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)82067-3).
- [28] K. Henriksen, M.A. Karsdal, Type I Collagen, Elsevier Inc., 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-9.00001-5>.
- [29] L. Gu, T. Shan, Y. xuan Ma, F.R. Tay, L. Niu, Novel Biomedical Applications of Crosslinked Collagen, *Trends Biotechnol.* 37 (2019) 464–491. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.007>.
- [30] L. Sang, X. Wang, Z. Chen, J. Lu, Z. Gu, X. Li, Assembly of collagen fibrillar networks in the presence of alginate, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 1264–1270. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.005>.
- [31] T. Gibson, Evolution of catgut ligatures: The endeavours and success of Joseph Lister and William MacEwen, *Br. J. Surg.* 77 (1990) 824–825. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800770736>.
- [32] S. Chattopadhyay, R.T. Raines, Review collagen-based biomaterials for wound healing, *Biopolymers.* 101 (2014) 821–833. <https://doi.org/10.1002/bip.22486>.
- [33] P.A. Smethurst, D.J. Onley, G.E. Jarvis, M.N. O'Connor, C. Graham Knight, A.B. Herr, W.H. Ouwehand, R.W. Farndale, Structural basis for the platelet-collagen interaction: The smallest motif within collagen that recognizes and activates platelet Glycoprotein VI contains two glycine-proline-hydroxyproline triplets, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 1296–1304. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606479200>.
- [34] L.R. Fiedler, E. Schönherr, R. Waddington, S. Niland, D.G. Seidler, D. Aeschlimann, J.A. Eble, Decorin regulates endothelial cell motility on collagen I through activation of insulin-like growth factor I receptor and modulation of $\alpha 2\beta 1$ integrin activity, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 17406–17415. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710025200>.
- [35] Y. Hu, L. Liu, W. Dan, N. Dan, Z. Gu, X. Yu, Synergistic effect of carbodiimide and dehydrothermal crosslinking on acellular dermal matrix, *Int. J. Biol. Macromol.* 55 (2013) 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.01.009>.

- [36] S. Javanbakht, A. Shaabani, Carboxymethyl cellulose-based oral delivery systems, *Int. J. Biol. Macromol.* 133 (2019) 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.079>.
- [37] M. Matinfar, A.S. Mesgar, Z. Mohammadi, Evaluation of physicochemical, mechanical and biological properties of chitosan/carboxymethyl cellulose reinforced with multiphasic calcium phosphate whisker-like fibers for bone tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C.* 100 (2019) 341–353. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.015>.
- [38] L. Whitmore, B.A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases, *Biopolymers*. 89 (2008) 392–400. <https://doi.org/10.1002/bip.20853>.
- [39] G.E. Tranter, Protein Structure Analysis by CD, FTIR, and Raman Spectroscopies, 3rd ed., Elsevier Ltd., 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12099-2>.
- [40] D. Hür, A. Ersöz, R. Say, S.E. Diltemiz, A. Denizli, S. Büyüktiryaki, Quantum dot nanocrystals having guanosine imprinted nanoshell for DNA recognition, *Talanta*. 75 (2008) 890–896. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.12.036>.
- [41] M. Odabaşı, R. Say, A. Denizli, Molecular imprinted particles for lysozyme purification, *Mater. Sci. Eng. C.* (2007). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.03.002>.
- [42] H. Yavuz, R. Say, A. Denizli, Iron removal from human plasma based on molecular recognition using imprinted beads, *Mater. Sci. Eng. C.* 25 (2005) 521–528. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.04.005>.
- [43] M. Andaç, S. Mirel, S. Şenel, R. Say, A. Ersöz, A. Denizli, Ion-imprinted beads for molecular recognition based mercury removal from human serum, *Int. J. Biol. Macromol.* 40 (2007) 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.07.002>.
- [44] İ. Dolak, R. Keçili, R. Onat, B. Ziyadanoğulları, A. Ersöz, R. Say, Molecularly imprinted affinity cryogels for the selective recognition of myoglobin in blood serum, *J. Mol. Struct.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.03.126>.
- [45] R. Say, R. Keçili, A. Denizli, A. Ersöz, Biomimetic Imprinted Polymers: Theory, Design Methods, and Catalytic Applications. *Theory, Design Methods, and Catalytic Applications, Mol. Imprinted Catal. Princ. Synth. Appl.* (2015) 103–120. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801301-4.00006-2>.

- [46] S. Kunath, M. Panagiotopoulou, J. Maximilien, N. Marchyk, J. Sanger, K. Haupt, Cell and Tissue Imaging with Molecularly Imprinted Polymers as Plastic Antibody Mimics, *Adv. Healthc. Mater.* 4 (2015) 1322–1326. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500145>.
- [47] H. Yavuz, V. Karako, D. Turkmen, R. Say, A. Denizli, Synthesis of cholesterol imprinted polymeric particles, *Int. J. Biol. Macromol.* (2007). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.11.011>.
- [48] A. Sarhan, G. Wulff, On the Use of Enzyme-Analogous Polymers for Racemate Separation, *Angew. Chem., Int. Ed.* 84 (1972) 364.
- [49] A. Reza, M. K., Synthesis of Substrate-selective Polymers by Host-Guest Polymerization, *Die Makromol. Chemie.* 692 (1981) 687–692. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/macp.1981.021820240/abstract>.
- [50] M.J. Whitcombe, M.E. Rodriguez, P. Villar, E.N. Vulfson, A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 7105–7111. <https://doi.org/10.1021/ja00132a010>.
- [51] S. Nafisi, N. Samadi, M. Houshiar, H.I. Maibach, Mesoporous silica nanoparticles for enhanced lidocaine skin delivery, *Int. J. Pharm.* 550 (2018) 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.004>.
- [52] J.P. Estebe, Intravenous lidocaine, *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 31 (2017) 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2017.05.005>.
- [53] G. Soto, M. Naranjo Gonzalez, F. Calero, Intravenous lidocaine infusion, *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.* 65 (2018) 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.redar.2018.01.004>.
- [54] W.A. Catterall, Molecular mechanisms of gating and drug block of sodium channels, *Novartis Found. Symp.* 241 (2002) 206–225. <https://doi.org/10.1002/0470846682.ch14>.
- [55] M.T. Chevalier, J. Gonzalez, V. Alvarez, Biodegradable polymeric microparticles as drug delivery devices, *IFMBE Proc.* 49 (2015) 187–190. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13117-7_49.
- [56] Z. Wang, T. Qiu, L. Guo, J. Ye, L. He, X. Li, The building of molecularly imprinted single hole hollow particles: A miniemulsion polymerization approach,

- Chem. Eng. J. 357 (2019) 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.09.128>.
- [57] J. Hu, M. Chen, L. Wu, Organic-inorganic nanocomposites synthesized via miniemulsion polymerization, *Polym. Chem.* 2 (2011) 760–762. <https://doi.org/10.1039/c0py00284d>.
- [58] H. Liu, J. Shi, Y. Pu, J.X. Wang, D. Wang, J.F. Chen, In situ visualization and real-time tracking of emulsion and miniemulsion polymerization at the microscale via fluorescence imaging, *Chem. Eng. Sci.* 211 (2019) 115288. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.115288>.
- [59] S. Sajjadi, F. Jahanzad, Nanoparticle formation by highly diffusion-controlled emulsion polymerisation, *Chem. Eng. Sci.* 61 (2006) 3001–3008. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.11.043>.
- [60] A. Gharieh, S. Khoei, A.R. Mahdavian, Emulsion and miniemulsion techniques in preparation of polymer nanoparticles with versatile characteristics, *Adv. Colloid Interface Sci.* 269 (2019) 152–186. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.04.010>.
- [61] S.E. Diltemiz, O. Uslu, A reflectometric interferometric nanosensor for sarcosine, *Biotechnol. Prog.* 31 (2015) 55–61. <https://doi.org/10.1002/btpr.1955>.
- [62] Claude F. Dixon, and Emmet L. Rixford, Cytologic Response to Peritoneal Irritation in Man, *American Journal of Surgery*, 1934.
- [63] Ç. Kotan, A. Gül, Karın İçi Adezyonların Oluşumu ve Önlenmesi, 1998.
- [64] L.P. Kihm, D. Wibisono, S. Müller-Krebs, F. Pfisterer, C. Morath, M.L. Gross, M. Morcos, Y. Seregin, A. Bierhaus, P.P. Nawroth, M. Zeier, V. Schwenger, RAGE expression in the human peritoneal membrane, *Nephrol. Dial. Transplant.* 23 (2008) 3302–3306. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn272>.
- [65] I. Shapiro, M. Shaft, *Gynecology*, (1982) 227–233.
- [66] P.A. Adhesions, T., and, (1960) 2–3.
- [67] D. Martínez, M. Vermeulen, A. Trevani, A. Ceballos, J. Sabatté, R. Gamberale, M.E. Álvarez, G. Salamone, T. Tanos, O.A. Coso, J. Geffner, Extracellular Acidosis Induces Neutrophil Activation by a Mechanism Dependent on Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and ERK Pathways, *J. Immunol.* 176 (2006) 1163–1171. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.2.1163>.
- [68] B. Kaleli, A. Özden, Z. Aybek, B. Bostanci, The effect of L-arginine and pentoxifylline on postoperative adhesion formation, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 77 (1998) 377–380. <https://doi.org/10.1080/j.1600-0412.1998.770403.x>.

- [69] G. Özcan, E.A. Şahin, E. Demirel Yilmaz, Effect of Nitric oxide on cardiac function: Review, *Turkiye Klin. Cardiovasc. Sci.* 28 (2016) 99–117. <https://doi.org/10.5336/cardiosci.2016-53254>.
- [70] L. Holmdahl, E. Eriksson, B.I. Eriksson, B. Risberg, Depression of peritoneal fibrinolysis during operation is a local response to trauma, *Surgery.* 123 (1998) 539–544. <https://doi.org/10.1067/msy.1998.86984>.
- [71] H. Ellis, The causes and prevention of intestinal adhesions, *Br. J. Surg.* 69 (1982) 241–243. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800690502>.
- [72] M.N. Vipond, S.A. Whawell, H.A.F. Dudley, J.N. Thompson, Peritoneal fibrinolytic activity and intra-abdominal adhesions, *Lancet.* 335 (1990) 1120–1122. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91125-T](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91125-T).
- [73] R. Montesano, L. Orci, Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (1988) 4894–4897. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.13.4894>.
- [74] G.E. Leber, J.L. Garb, A.I. Alexander, W.P. Reed, Long-term complications associated with prosthetic repair of incisional hernias, *Arch. Surg.* 133 (1998) 378–382. <https://doi.org/10.1001/archsurg.133.4.378>.
- [75] R.W. Luijendijk, D.C.D. De Lange, C.C.A.P. Wauters, W.C.J. Hop, J.J. Duron, J.L. Paillet, B.R. Camprodon, L. Holmdahl, H.J. Van Geldorp, J. Jeekel, Foreign material in postoperative adhesions, *Ann. Surg.* 223 (1996) 242–248. <https://doi.org/10.1097/00000658-199603000-00003>.
- [76] R. Kennedy, D.J. Costain, V.C. McAlister, T.D.G. Lee, Prevention of experimental postoperative peritoneal adhesions by N,O- carboxymethyl chitosan, *Surgery.* 120 (1996) 866–870. [https://doi.org/10.1016/S0039-6060\(96\)80096-1](https://doi.org/10.1016/S0039-6060(96)80096-1).
- [77] M. Wallwiener, S. Brucker, H. Hierlemann, C. Brochhausen, E. Solomayer, C. Wallwiener, Innovative barriers for peritoneal adhesion prevention: liquid or solid? A rat uterine horn model, *Fertil. Steril.* 86 (2006) 1266–1276. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.05.023>.
- [78] R. Folger, L. Weiss, D. Glaves, J.R. Subjeck, J.P. Harlos, Translational movements of macrophages through media of different viscosities., *J. Cell Sci.* 31 (1978) 245–257.
- [79] B. Schnriger, G. Barmparas, B.C. Branco, T. Lustenberger, K. Inaba, D.

- Demetriades, Prevention of postoperative peritoneal adhesions: A review of the literature, *Am. J. Surg.* 201 (2011) 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2010.02.008>.
- [80] P. Dinarvand, S.M. Hashemi, E. Seyedjafari, I. Shabani, A. Mohammadi-Sangcheshmeh, S. Farhadian, M. Soleimani, Function of poly (lactic-co-glycolic acid) nanofiber in reduction of adhesion bands, *J. Surg. Res.* 172 (2012) e1–e9. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.10.014>.
- [81] J.J. Chang, Y.H. Lee, M.H. Wu, M.C. Yang, C.T. Chien, Electrospun anti-adhesion barrier made of chitosan alginate for reducing peritoneal adhesions, *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) 1304–1312. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.011>.
- [82] Y.C. Shin, W.J. Yang, J.H. Lee, J.W. Oh, T.W. Kim, J.C. Park, S.H. Hyon, D.W. Han, PLGA nanofiber membranes loaded with epigallocatechin-3-O-gallate are beneficial to prevention of postsurgical adhesions, *Int. J. Nanomedicine.* 9 (2014) 4067–4078. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68197>.
- [83] X. Cai, S. Hu, B. Yu, Y. Cai, J. Yang, F. Li, Y. Zheng, X. Shi, Transglutaminase-catalyzed preparation of crosslinked carboxymethyl chitosan/carboxymethyl cellulose/collagen composite membrane for postsurgical peritoneal adhesion prevention, *Carbohydr. Polym.* 201 (2018) 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.065>.
- [84] S.M. Keira, L.M. Ferreira, A. Gragnani, I. Da Silva Duarte, J. Barbosa, Modelo experimental para avaliação do colágeno em cultura de células, *Acta Cir. Bras.* 19 (2004) 17–22. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502004000700005>.
- [85] J. Kozłowska, A. Sionkowska, Effects of different crosslinking methods on the properties of collagen-calcium phosphate composite materials, *Int. J. Biol. Macromol.* 74 (2015) 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.023>.

