

**YARA ÖRTÜLERİ İÇİN ALTERNATİF DOKU İSKELELERİ:
İN VİTRO ÇALIŞMALAR**

**ALTERNATIVE TISSUE SCAFFOLDS FOR WOUND
DRESSING: IN VITRO STUDIES**

NUR MERVE KAZAROĞLU

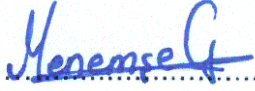
Başkent Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
BİYOMEDİKAL Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2009

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından **BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**
'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan (Danışman)

: 

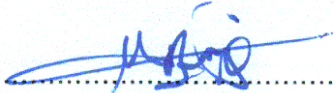
Prof.Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu

Üye

: 

Doç.Dr. Mustafa Kocakulak

Üye

: 

Yrd.Doç.Dr. Bora Maviş

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri
üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../...../.....

Prof.Dr. Emin AKATA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca, deneyimini, sevgisini ve ilgisini benden esirgemeyen, beni yetiştiren ve geliştiren çok sevgili ve değerli hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na, katkılarından ve desteğinden dolayı sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın her aşamasında engin bilgisi ve enerjisiyle beni destekleyen, çalışma şevki aşıl原因, ufkumu genişleten ve heyecanımı perçinleyen sevgili hocam, Yrd. Doç. Dr. Bora Maviş'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Lisans yıllarımda beni biyoteknoloji ve doku mühendisliğı ile tanıştıran, bu alanlardaki heyecanıma ortak olan ve desteğini benden esirgemeyen çok sevgili hocam Doç. Dr. Mustafa Kocakulak'a teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitimimden sonraki yol ayırımında doğruyu seçmem için beni cesaretlendiren ve yönlendiren, her zaman örnek alacağım sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Cengiz Koçum'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca deneyimi ve bilgisiyle her zaman yanımda olan, sevgili Seda Tığlı'ya desteğı ve katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Destek ve sevgileriyle beni ayakta tutan meslektaşlarım ve birbirinden değerli dostlarım Nesrin Paşaoğlu, Aysu Küçükturhan, Aykut Eken, İpek Mert ve Erbil Can Kılıç'a, bu çekilmez halimi anlayışla karşılayıp bana katlandıkları için teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca her an yanımda olan sevgili laboratuvar arkadaşlarım, Işıl Gerçek Beşkardeş, Sezin Aday, Berna Başbağ, Anıl Sera Kahraman, Soner Çakmak ve Tuğrul Tolga Demirtaş'a, sevgi ve desteklerinden dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın en zor anlarında yanımda olan, beni yetiştiren ve attığım her adımda bana güvenen, annem ve anneanneme, maddi ve manevi desteklerinden dolayı sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Varlığıyla hayatıma huzur ve anlam katan, her türlü zorluğa göğüs germemi sağlayan 'sevgili' Bolkan İnan'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

YARA ÖRTÜLERİ İÇİN ALTERNATİF DOKU İSKELELERİ: İN VİTRO ÇALIŞMALAR

Nur Merve Kazaroğlu

ÖZ

Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda, yara iyileşmesini destekleyecek ve hızlandıracak nanofibröz polikaprolakton (PCL) ve PCL/jelatin doku iskelelerinin hazırlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla üretilen doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve *in vitro* etkileşimleri hücre kültürü çalışmalarıyla gözlemlenmiştir.

Doku iskelelerinin fabrikasyonu için elektroeğirme yöntemi kullanılmıştır. Biyomalzeme olarak molekül ağırlığı 80000 Da olan PCL ve domuz derisi kökenli jelatin tip A kullanılmıştır. PCL için çözücü olarak N,N-dimetilformamid (DMF) ve diklorometan (DCM) karışımı (25:75), PCL/jelatin karışımı için çözücü olarak hekzafloroizopropanol (HFIP) kullanılmıştır. Elektroeğirme işlemini etkileyen parametreler optimize edilerek, nano ölçeğe fiber çaplarına sahip doku iskelelerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. SEM analizleri, fiber çaplarının PCL doku iskeleleri için 488 ± 114 nm, PCL/jelatin doku iskeleleri için ise 663 ± 107 nm olduğunu göstermiştir. Ayrıca yapılan gözeneklilik analizleri sonucu gözeneklilik değerleri, PCL doku iskeleleri için %79, PCL/jelatin doku iskeleleri için %68 olarak hesaplanmıştır.

PCL ve PCL/jelatin doku iskelelerinin Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisinde yapılan biyobozunurluk çalışmaları 14 gün süresince 37°C'de, CO₂ etüvünde gerçekleştirilmiştir. 3., 5., 7. ve 14. günlerde alınan örnekler SEM ve ATR-FTIR analizleriyle değerlendirilmiştir. Sonuçlar, 14 günlük inkübasyon boyunca PCL doku iskelelerinin kimyasal yapısının değişmediğini, bununla birlikte PCL/jelatin karışımı doku iskelelerinin bu süreç boyunca yüzey erozyonuna uğrayarak biyobozunmaya maruz kaldığını göstermiştir.

Yara iyileşme mekanizmalarını hızlandırmak ve doku iskelelerinin biyolojik aktivitesini arttırmak için, nanofibröz doku iskelelerine kovalent olarak EGF immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. EGF immobilizasyonu kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca hücre kültürü sırasında yapılan MTT analizleri ve alınan SEM görüntüleri, EGF immobilize edilen doku iskelelerinin hücre üremesi ve morfolojisini olumlu yönde etkilediğini göstermiştir.

Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ışığında, elektroeğirme ile üretilen ve yüzeyine EGF immobilize edilen nanofibröz doku iskelelerinin yara örtüsü uygulamaları için uygun nitelikte olduğu anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Elektroeğirme, nanofibröz doku iskeleleri, polikaprolakton, jelatin, epidermal büyüme faktörü (EGF), yara örtüsü, deri doku mühendisliği.

Danışman: Prof.Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği / Biyomühendislik Anabilim Dalı.

ALTERNATIVE TISSUE SCAFFOLDS FOR WOUND DRESSING: IN VITRO STUDIES

Nur Merve Kazaroğlu

ABSTRACT

In this study, nanofibrous polycaprolactone (PCL) and PCL/gelatin scaffolds were prepared in order to support and enhance the wound healing mechanism. Over the entire studies of this thesis; characterizations of produced tissue scaffolds were carried out and *in vitro* interactions were observed by cell culture studies.

Fabrication of tissue scaffolds achieved by electrospinning method. PCL which has molecular weight of 80000 Da and pig skin originated gelatin of type A were used as components of scaffolds. N,N-dimethylformamide (DMF) and dichloromethane (DCM) mixture (25:75), and hexafluoroisopropanol (HFIP) were used as solvents for PCL and PCL/gelatin mixture, respectively. The parameters that affect the electrospinning process were optimized and nanofiber-based tissue scaffolds were achieved. SEM analysis showed the fiber diameters are 488 ± 114 nm and 663 ± 107 nm for PCL and PCL/gelatin scaffolds, respectively. Furthermore, according to results of the porosity analysis; the values of the porosities were calculated as 79% for PCL and 68% for PCL/gelatin scaffolds.

Biodegradability studies for PCL and PCL/gelatin tissue scaffolds have been carried out in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) for 14 days under 37°C in CO₂ incubator. Samples that were taken after 3rd, 5th, 7th and 14th days of the experiment were examined by SEM and ATR-FTIR analysis. Results showed that chemical structure of PCL tissue scaffolds did not change during 14 days incubation, on the other hand, PCL/gelatin scaffolds degraded by means of surface erosion.

Immobilization of epidermal growth factor (EGF) to the nano-fibrous tissue scaffolds was realized by covalent bonding to enhance the wound healing mechanism by increasing the biological activities of the tissue scaffolds. EGF immobilization were evaluated qualitatively and quantitatively. Furthermore, the MTT analysis were held on during the cell culture and taken SEM images showed that, EGF immobilized tissue scaffolds affect the cellular proliferation and morphology positively.

In the light of these experimental studies, it has been understood that, nanofibrous tissue scaffolds that were produced by the electrospinning method and immobilized EGF to the surfaces, are found to have suitable attribution for the wound dressing applications.

Keywords: Electrospinning, nanofibrous tissue scaffolds, polycaprolactone, gelatin, epidermal growth factor (EGF), wound dressing, skin tissue engineering.

Advisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Hacettepe University, Chemical Engineering / Bioengineering Major Field of Study.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ ve ÇALIŞMANIN AMACI	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Doku Mühendisliği	4
2.2. Deri Doku Mühendisliği	7
2.2.1. Derinin İşlevi ve Yapısı	7
2.2.1.i. Subkütan yağ tabakası	8
2.2.1.ii. Dermis	8
2.2.1.iii. Epidermis	9
2.2.2. Yara İyileşme Mekanizmaları	11
2.2.3. Deri Doku Mühendisliği Yaklaşımı	13
2.2.4. Deri Doku Mühendisliğinin Ticari Ürünleri	16
2.2.5. Deri Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler	19
2.2.5.1. Jelatin	20

2.2.5.2. Poli(kaprolakton) (PCL).....	21
2.2.6. Deri Doku Mühendisliğinde Kullanılan Fabrikasyon Yöntemleri.....	22
2.2.6.1. Yöntemlerden örnekler.....	23
2.2.6.2. Elektroeğirme (Electrospinning) yöntemi.....	24
2.2.6.2.i. Polimer çözeltisi ile ilgili parametreler.....	26
2.2.6.2.ii. İşlem parametreleri.....	31
2.2.6.2.iii. Çevresel parametreler.....	37
2.2.6.3. Elektroeğirme ile yapılan deri doku mühendisliği çalışmaları.....	39
2.2.7. Deri Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler.....	43
2.2.8. Deri Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyosinyaller.....	45
2.2.8.1. Biyosinyal türleri.....	46
2.2.8.1.i. Epidermal büyüme faktörü (EGF).....	47
2.2.8.2. Biyosinyal immobilizasyon yöntemleri.....	51
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	54
3.1. Malzemeler.....	54
3.2. Nanofibröz Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Modifikasyonu.....	55
3.2.1. Nanofibröz Doku İskelelerinin Fabrikasyonu.....	56
3.2.2. Nanofibröz Doku İskelelerine EGF İmmobilizasyonu.....	57
3.3. Karakterizasyon Çalışmaları.....	58
3.3.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Analiz.....	58
3.3.2. Ninhidrin Yöntemi İle Bağlanan Amin Gruplarının Spektrofotometrik Tayini.....	58

3.3.3. Amin Grupları Bağlanan Nanofibröz Doku İskelelerine FITC (Floresan İzotiyosiyanat) Bağlanması ve Görüntülenmesi.....	58
3.3.4. FTIR Analizleri.....	59
3.3.5. Floresan Spektrofotometre ile EGF'in Kantitatif Tayini.....	59
3.3.6. Biyobozunurluk çalışmaları.....	61
3.3.7. Su Temas Açısı Ölçümleri.....	61
3.3.8. Gözeneklilik Ölçümleri.....	62
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	63
3.4.1. L929 Hücre Hattının Karakterizasyon Çalışmaları.....	63
3.4.2. Nanofibröz Doku İskeleleri Üzerinde L929 Hücre Hattı ile Yapılan Çalışmalar.....	64
3.4.2.1. MTT analizi.....	64
3.4.2.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analizi.....	64
3.4.2.3. İmmüno-floresan boyama.....	65
3.4.2.4. İstatistiksel analiz.....	65
4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞILMASI.....	66
4.1. Nanofibröz Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Modifikasyonu.....	66
4.1.1. Nanofibröz Doku İskelelerinin Fabrikasyonu.....	66
4.1.2. Nanofibröz Doku İskelelerine EGF İmmobilizasyonu.....	76
4.2. Karakterizasyon Çalışmaları.....	80
4.2.1. Ninhidrin Yöntemi ile Bağlanan Nanofibröz Doku İskelelerine Floresan İzotiyosiyanat (FITC) Bağlanması ve Görüntülenmesi.....	80
4.2.2. Amin Grupları Bağlanan Nanofibröz Doku İskelelerine Floresan İzotiyosiyanat (FITC) Bağlanması ve Görüntülenmesi.....	81

4.2.3. Nanofibröz Doku İskelelerinin FTIR Analizi.....	82
4.2.4. Floresan Spektrofotometre ile EGF'in Kantitatif Tayini.....	84
4.2.5. Biyobozunurluk Çalışmaları	85
4.2.6. Su Temas Açısı Ölçümleri.....	90
4.2.7. Gözeneklilik Ölçümleri.....	91
4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	92
4.3.1. L929 Hücre Hattının Karakterizasyon Çalışmaları	92
4.3.2. Nanofibröz Doku İskeleleri Üzerinde L929 Hücre Hattı ile Yapılan Çalışmalar.....	94
4.3.2.1. MTT analizi.....	94
4.3.2.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz.....	96
4.3.2.3. İmüno-floresan boyama.....	99
5. GENEL SONUÇLAR.....	105
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	107

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Doku mühendisliğinin temel yaklaşımı.....	5
Şekil 2.2. Doku mühendisliği bileşenleri	6
Şekil 2.3. Derinin yapısı.....	7
Şekil 2.4. Hücre bazlı deri doku mühendisliği yaklaşımının şematik gösterimi	13
Şekil 2.5. Epidermiste meydana gelen defektin yapı bütünlüğü bozulmadan giderilmesi.	14
Şekil 2.6. Dermisde oluşan herhangi bir defektin yerini yara dokusuna bırakması (S).	15
Şekil 2.7. Jelatinin kimyasal yapısı.	21
Şekil 2.8. ϵ -kaprolaktonun halka açılma polimerizasyonuna uğraması ile PCL sentezi.	22
Şekil 2.9. Elektroeğirme işleminin şematik gösterimi.....	24
Şekil 2.10. Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerden elde edilen PCL nanofiberlerin SEM görüntüleri. PCL konsantrasyonları; (a) %8, (b) %10, (c) %12, (d) %16	27
Şekil 2.11. (a) Normal elektro-eğirme işlemi ve oluşan kararsız jet, (b) T-5 yardımcı elektroduyla oluşan kararlı jet, (c) Farklı elektrod tiplerine göre çeşitlilik gösteren Taylor konisi.	28
Şekil 2.12 (a) Yüksek viskozitede, çözücü moleküllerinin dolaşık polimer molekülleri üzerine dağılması, (b) Düşük viskozitede, çözücü moleküllerinin yüzey gerilimi etkisi altında bir araya toplanma eğilimi göstermesi.	29
Şekil 2.13. Yalıtkan toplayıcı üzerinde fiberlerin bal peteği şeklinde toplanması (a), yalıtkan hale gelen fiberlerin çukur yapılar oluşturmaları (b).	34
Şekil 2.14. Nylon 6,6'nın (a) 2 cm toplanma uzaklığı ve (b) 0.5 cm toplanma uzaklığındaki SEM görüntüleri.....	36
Şekil 2.15. %2.5'luk PLDLA çözeltisinin nem oranının fiber morfolojisi üzerindeki etkisi (akış hızı= 0.005mL/min, voltaj= 20kV): (a) %30 nem oranı, (b) %50 nem oranı, (c) %70 nem oranı.....	38
Şekil 2.16. Nanofibröz doku iskeleleri üzerinde 6. gün sonunda insan dermal fibroblastı (HDF) kültürü SEM görüntüleri, (a) PCL-kollajen karışımı nanofibröz doku iskeleleri, (b) PCL nanofiberleri üzerinde HDF hücreleri, (c) PCL-kollajen karışımı nanofiberleri üzerinde HDF hücreleri, (d) Kollajen nanofiberleri üzerinde HDF hücreleri.	41
Şekil 2.17. Otolog tabakalı dermal yenilenme yaklaşımının şematik gösterimi. ...	42

Şekil 2.18. EGF'in yapısı.	47
Şekil 2.19. Büyüme faktörlerinin reseptörler üzerinden sinyalizasyon mekanizması.	50
Şekil 2.20. Kovalent immobilizasyon ile down regulation'ın önlenmesi.	52
Şekil 3.1. (a) Nanofiber matrislerin üretildiği elektroğirme düzeneği, (b) Elektroğirme düzeneğini oluşturan elemanlar.....	55
Şekil 3.2. Yardımcı elektrod yerleşimi (a), elektroğirme sırasında yardımcı elektrod yardımıyla Taylor konisinden çıkan kararlı PCL/jelatin karışımı polimer jetinin görüntüsü (b).....	56
Şekil 3.3. EGF'e ait uyarılma ve ışıma dalga boyları.	60
Şekil 3.4. EGF molekülüne ait kalibrasyon grafiği.	60
Şekil 4.1 Başlangıç konisi (a) ve ideal Taylor konisi görünüşleri.	71
Şekil 4.2. %8 (w/v) konsantrasyondaki PCL/jelatin matrisler için ideal elektroğirme bölgesi.	72
Şekil 4.3. PCL/jelatin matrislerde voltaj değerinin artmasıyla artan boncuk oluşumu; (a) 17.5 kV, (b) 15 kV, (c) 13 kV, (d) 10.5 kV.	73
Şekil 4.4. Çözücü değişikliğinin fiber çapı üzerine etkisi; (a) TFE içerisinde (1104 ± 129 nm), (b) HFIP içerisinde (663 ± 107 nm) deri doku iskelesi olarak kullanılmak amacıyla hazırlanan PCL/jelatin çözeltilerinden elde edilen fiberlerin SEM görüntüleri.....	74
Şekil 4.5. Elektroğirme yöntemiyle elde edilen; (a) PCL, (b) PCL/jelatin karışımı doku iskelelerinin SEM görüntüleri.	75
Şekil 4.6. PCL üzerinden EGF immobilizasyonunun şematik gösterimi; (a) PCL yüzeyinin aminlenmesi, (b) PCL yüzeyindeki amin gruplarının NHS ile aktive edilmesi, (c) Aktive edilmiş PCL üzerinden EGF immobilize edilmesi.	79
Şekil 4.7. Amin grubu bağlanan ve bağlanmayan doku iskelelerinin ninhidrin yöntemi sonucu elde edilen absorbans değerlerinin karşılaştırılması.....	80
Şekil 4.8. FITC bağlanan (a) PCL ve (b) PCL/jelatin doku iskeleleri.....	81
Şekil 4.9. PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerine ait ATR-FTIR analizleri.	82
Şekil 4.10. Amin grupları bağlanmış ve bağlanmamış PCL nanofibröz doku iskelelerinin ATR-FTIR analizleri.	83
Şekil 4.11. Amin grupları bağlanmış ve bağlanmamış PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerinin ATR-FTIR analizleri.	84
Şekil 4.12. PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerinin 14 günlük süredeki % ağırlık kaybı.	86

Şekil 4.13. PCL/jelatin doku iskelelerinin bozunma öncesi ve 3., 5., 7., 14. günlerdeki bozunmalarına ait FT-IR spektrumları.....	86
Şekil 4.14. Bozunma öncesi ve 14 gün süresince bozunmaya uğratılmış PCL doku iskelelerine ait FT-IR spektrumları.....	87
Şekil 4.15. 14 günlük bozunma periyodu içerisinde, PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerine ait SEM görüntüleri ((a) bozunma öncesi (X10000), (b) 3.gün, (c) 5.gün, (d) 7.gün, (e) 14.gün (X8780)).	89
Şekil 4.16. L929 hücrelerine ait MTT sonuçları.	92
Şekil 4.17. L929 hücrelerine ait hemositometrik sayım sonuçları.....	92
Şekil 4.18. Kültür kabındaki L929 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri (x20); (a) 1. gün, (b) 3. gün, (c) 5. gün, (d) 9.gün.	93
Şekil 4.19. MTT analizi ile hücre canlılığı ve üremesinin takibi (istatistiksel önem farklılığı n=3, * için $p<0.05$, ** için $p<0.01$, *** için $p<0.001$ olup PCL ve PCL/jelatin kendi aralarında kontrol grubudur. ... için $p<0.001$ olup TCPS kontrol grubudur..	94
Şekil 4.20. PCL (a, c, e, g, i) ve PCL-EGF (b, d, f, h, j) doku iskeleleri üzerindeki L929 hücrelerinin morfoloji ve yoğunluklarına ait SEM görüntüleri (X500).	97
Şekil 4.21. PCL/jelatin (a, c, e, g, i) ve PCL/jelatin-EGF (b, d, f, h, j) doku iskeleleri üzerindeki L929 hücrelerinin morfoloji ve yoğunluklarına ait SEM görüntüleri (X1000, X2500, X5000).	98
Şekil 4.22. İmmüno-floresan boyama ile elde edilmiş 1. gün görüntüleri; (X20, X40) (a) PCL, (b) PCL-EGF, (c) PCL/jelatin, (d) PCL/jelatin-EGF, (e) TCPS.....	100
Şekil 4.23. İmmüno-floresan boyama ile elde edilmiş 2. gün görüntüleri; (X20, X40) (a) PCL, (b) PCL-EGF, (c) PCL/jelatin, (d) PCL/jelatin-EGF, (e) TCPS.....	101
Şekil 4.24. İmmüno-floresan boyama ile elde edilmiş 3. gün görüntüleri; (X20, X40) (a) PCL, (b) PCL-EGF, (c) PCL/jelatin, (d) PCL/jelatin-EGF, (e) TCPS.....	102
Şekil 4.25. İmmüno-floresan boyama ile elde edilmiş 5. gün görüntüleri; (X20, X40) (a) PCL, (b) PCL-EGF, (c) PCL/jelatin, (d) PCL/jelatin-EGF, (e) TCPS.....	103

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 4.1. Elektroeğirme işleminde kullanılan bazı çözücülerin dielektrik sabitleri.	69
Çizelge 4.2. TFE içerisindeki %8 (w/v)'lik PCL/jelatin çözeltisi ile yapılan elektroeğirme işlemlerinde, başlangıç konisi ve Taylor konisi'nin gözlemlendiği koşul değerleri.	71
Çizelge 4.3. Deri doku iskelesi olarak kullanılmak amacıyla hazırlanan PCL ve PCL/Jelatin nanofiber matrislerin hazırlanmasında kullanılan elektroeğirme işlem koşulları ve elde edilen nanofiber çapları.	75
Çizelge 4.4. Nanofibröz doku iskelelerine immobilize olan EGF miktarları ve % immobilizasyon verimliliği değerleri.	85
Çizelge 4.5. Nanofibröz doku iskelelerine ait su temas açısı değerleri.	90

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ϵ	Epsilon
ANOVA	Varyans Analizi
ATR-FTIR	Toplam Yansıması Zayıflatılmış-Fourier Transform Kızılötesi
bFGF	Bazik Fibroblastik Büyüme Faktörü
DC	Doğru Akım
DCM	Diklorometan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	N,N-dimetilformamid
ECM	Hücre Dışı Matris
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FBS	Fetal Sığır Serum
FITC	Floresan 5(6) İzotiyosiyanat
HFIP	Hekzafloroizopropanol
kV	Kilo Volt
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-Yl]-Difeniltetrazolyum Bromür
NHS	N-hidroksisüksinimid
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PCL	Polikaprolakton
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGA	Poliglikolik Asit
PLA	Polilaktik Asit

PLGA	Poli-Laktik-Ko-Glikolik-Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
T _g	Camsı Geçiş Sıcaklığı
TCPS	Polistiren Hücre Kültür Kapları
TFE	2,2,2-Trifloroetanol
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü
UV	Ultraviyole
w/v	Ağırlık/Hacim Oranı

1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Deri; epidermis, dermis ve subkütan yağ tabakası olmak üzere üç katmandan oluşan, eksojen madde, kimyasal, nem kaybı ve patojenlere karşı bariyer görevi gören vücudumuzun en geniş yüzey alanına sahip organıdır. Özellikle epidermis dış çevreye karşı koruma görevini üstlenirken, dermis, vücudu travmaya karşı korumaktadır. Primer bağ dokusundan oluşan dermisin başlıca yapısal bileşeni fibriller halinde bulunan kollajendir. İnsan derisinde 9 farklı tip bağ doku kollajeni tespit edilmiştir. Tip I kollajen toplam kollajen miktarının %80'ini oluşturur ve dermis boyunca bulunmaktadır. Bu tabakada ana hücresel bileşen, kollajen sentezleyen fibroblastlardır [1].

Deri aynı zamanda vücutta en çok hasar gören organdır. Bu hasarlar travma, yanık gibi kazalar, cerrahi operasyon yada hastalık sonucu ortaya çıkabilmektedir. Epidermiste meydana gelen hasarlar dışarıdan bir müdahaleye gerek kalmaksızın iyileşirken dermisi kapsayan hasarlar yara izi oluşumu ile sonuçlanmaktadır [2]. Klasik tedavi yöntemlerinden rekonstrüktif cerrahi ile gerçekleştirilen otogreftleme sonucu ise sağlıklı deri dokusunda kayıp meydana gelmekte, beklenmeyen kozmetik sonuçlar ortaya çıkmakta ve iyileşme haftalar sürebilmektedir [3].

Doku ve organ kayıplarının artmasıyla beraber 1990'lı yılların başından itibaren yeni doku geliştirmeye yönelik mühendislik yaklaşımları yaygınlaşmaya başlamıştır. Söz konusu mühendislik yaklaşımlarıyla geliştirilen malzemelere “doku iskelesi” adı verilmiştir. Doku iskeleleri yeni doku üretimine izin verecek gerekli fiziksel özelliklere sahip destek malzemeleridir. İskeleler, yüksek gözeneklilik, uygun mekanik dayanım ve hücre üremesini destekleyip yönlendirecek biyoaktiviteye sahip yapılardır. İdeal bir doku iskelesi, üzerine ekilen hücreleri ya da implante edildiği bölgedeki konakçı hücreleri uyarak doğal ekstraselüler matris yapısının salgılanmasını sağlar ve hasarlı bölgeyi onarır [4]. Bilindiği gibi ekstraselüler matris (ECM) yapısı nano ölçekte proteoglikan,

polisakkarit, kollajen ve elastin fibröz yapılardan oluşmuştur. Doku iskeleleri, bu yapıyı taklit edecek nitelikte olmalıdır.

Nano ölçekteki fabrikasyon teknikleriyle elde edilen doku iskeleleri, uygun hücresel davranış ve doku organizasyonu gibi nano boyuttaki özellikleri bünyesinde barındırmaktadır. Nanofabrikasyon teknikleriyle ECM'yi en iyi biçimde taklit edebilecek doku iskeleleri geliştirilirken doğal ECM'nin en temel yapıtaşı olan kollajen ve kollajen bazlı iplikçikler temel alınmaktadır [5]. Bu noktadan yola çıkılarak nanoboyuttaki iplikçiklerden doku iskeleleri hazırlanmaktadır. Elektroeğirme ve peptidlerin kendiliğinden düzenlenmesi (self-assembly), kullanılan temel yöntemlerdir [6].

Elektroeğirme teknolojisi, son yıllarda doku iskelesi fabrikasyonuna yönelik çalışmalarda oldukça popüler hale gelmiştir. Doku iskeleleri elektroeğirme ile ihtiyaç duyulan yapısal ve mekanik özelliklere göre üretilebilmektedir. Ayrıca elektroeğirme sisteminin kurulumu ve çalışma koşullarına göre adapte edilmesi kolaydır. Elektroeğirme ile üretilen nanofibröz doku iskeleleri sahip oldukları birbiriyle bağlantılı gözenek yapıları, mekanik ve yapısal dayanımları bakımından faz ayırımı ve kendiliğinden düzenlenme ile üretilen doku iskelelerine göre üstünlük sağlamaktadır [4].

Nanofibröz doku iskeleleri, ECM yapısındaki hücre yapışma proteinlerinin adsorpsiyonunu ve dolayısıyla hücre yapışmasını arttırmaktadırlar. Yüksek yüzey alanı/hacim oranından dolayı, bu iskelelerin üzerine vitronektin ve fibronektin moleküllerinin, diğer yöntemlerle üretilmiş iskelelere oranla çok daha fazla adsorbe oldukları görülmüştür [7].

Hücreler tarafından spesifik olarak algılanabilen kollajen, fibronektin, vitronektin gibi adeziv proteinler ya da bazik fibroblastik büyüme faktörü (bFGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi biyosinyal moleküllerin nanofibröz doku iskelelerinin yüzeylerine immobilizasyonu ile yüzey biyouyumluluğu arttırılmaktadır. Bu

moleküller, nanofibröz yapıların yüzeylerine kovalent bağlama, elektrostatik etkileşim veya adsorpsiyon yöntemleri ile bağlanabilmektedir [8].

Elektroeğirme ile üretilen nanofibröz doku iskelelerinin sahip oldukları birbirine bağlı gözeneklilik ve bariyer özellikleri bakımından yara örtüsü uygulamalarında kullanımları yaygındır [5, 9-11]. Söz konusu doku iskeleleri, su buharlaşmasını kontrol eder, yüksek oksijen geçirgenliği sağlar, yara eksudasını ortamdaki uzaklaştırır ve yarayı eksojen mikroorganizmalardan korur [12].

Yukarıda sunulan bilgiler doğrultusunda, tez kapsamında yapılan çalışmalarda, polikaprolakton (PCL) ve PCL/jelatin karışımı nanofibröz doku iskelelerinin, deri doku mühendisliğine yönelik uygulamalarda kullanılmak üzere üretimi amaçlanmıştır. Üretilen nanofibröz doku iskelelerinin biyoaktivitelerinin artırılması için yüzeylerine EGF'in kovalent olarak immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanofibröz doku iskelelerinin, yara iyileşme mekanizmaları üzerine etkisi çeşitli karakterizasyon çalışmalarıyla ve in vitro hücre kültürü analizleriyle belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

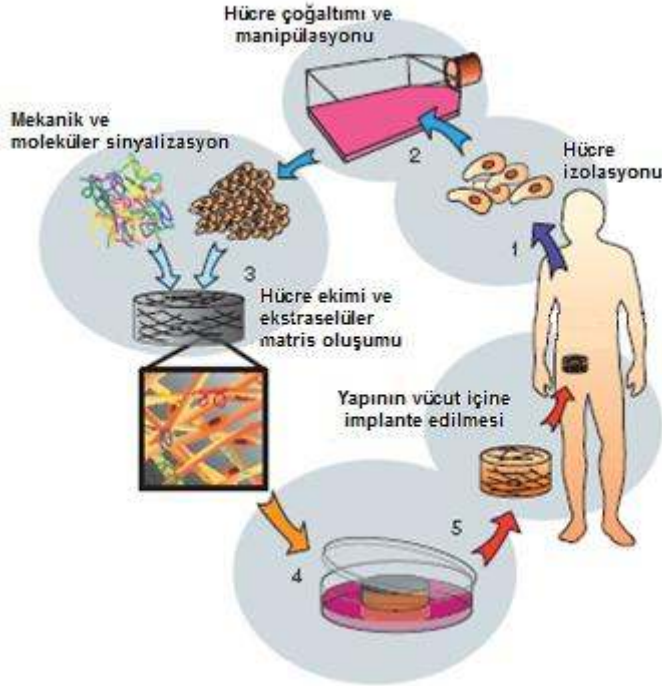
Bu bölümde yapılan tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili literatür bilgisi verilmiştir. İlk olarak, doku mühendisliği tanımlanmış, ayrıca doku mühendisliği stratejilerinin amaçları ve bileşenleri açıklanmıştır. Doku mühendisliğinin alt başlığı olarak, deri dokusu ve yara iyileşme mekanizmaları hakkında kısa bir bilgi verilmiş ve deri doku mühendisliği yaklaşımındaki önemli noktalara değinilmiştir. Ardından deri doku mühendisliği yaklaşımı ile geliştirilen ticari ürünlere değinilmiştir. Deri doku iskelelerinin üretiminde kullanılan malzemeler ve fabrikasyon yöntemleri, örnekler ile açıklanmıştır. Daha sonra, deri doku mühendisliği çalışmalarında yer alan hücreler anlatılmıştır. Son olarak ise deri dokusunun oluşumunda ve onarımında yer alan biyosinyaller ve bu biyosinyallerin immobilizasyon yöntemlerine yer verilmiştir.

2.1. Doku Mühendisliği

Travmaya veya çeşitli hastalıklara bağlı organ yetmezlikleri ve kayıpları insan ölümlerinin başlıca nedenleri arasındadır. Klasik tedavi yöntemleri olarak adlandırılan transplantasyon, ameliyatla tedavi ve implantasyon yöntemleri öncesinde yaşanan eksiklikler ve sonrasında oluşan komplikasyonlar nedeniyle, bu yöntemler başarılı çözümler olmaktan uzak hale gelmektedir. ABD’de yapılan bir araştırmaya göre, 2007 yılı Aralık ayı itibari ile organ yetmezliğinin son evresinde olduğu için organ nakli listesinde bekleyen 92000 Amerikalının sadece 14500’üne organ nakli yapılabilmektedir [13]. Türkiye’deki rakamlara bakıldığında ise daha vahim bir tablo ile karşılaşmaktadır; 2007 yılında organ nakli listesinde 44000 kişi olmasına karşın sadece 143 nakil yapılabilmektedir. 2006 yılında ise 7 bin kişi organ beklerken hayatını kaybetmiştir [14]. İç karartıcı bu durum, doku mühendisliği biliminin başlıca motivasyon kaynağıdır.

Doku mühendisliği terimi ilk olarak 1987’de Dr. Y. C. Fung (California Üniversitesi) tarafından National Science Foundation’nın (NSF) bir toplantısında dile getirilmiştir. Bilimsel çevrelerin doku mühendisliği konusuna odaklanmasında ise

iki çalışmanın etkisi büyüktür. Bunlardan biri Nerem tarafından 1991’de “hücre mühendisliği” konusunda, diğeri ise Langer ve Vacanti tarafından 1993’te “doku mühendisliği” başlığı altında yayınlanan çalışmalardır [15, 16]. Temel bilimciler, malzeme bilimcileri, mühendisler, hücre biyologları ve klinisyenlerin ortak çabalarıyla günümüzde doku mühendisliği bütünüyle disiplinler arası bir alan haline gelmiştir [6]. Doku mühendisliğinde temel prensip, hastanın kendisinden veya başka bir vericiden alınan hücrelerin biyoyumlu ve biyobozunur polimerik bir yapı iskelesi (doku iskelesi=scaffold) üzerinde geliştirilip üç boyutlu dokuların üretilmesi ve üretilen bu dokuların da hasarlı dokuları onarmak için kullanılmasıdır (Şekil 2.1.). Doku mühendisliği başta malzeme mühendisliği, hücre biyolojisi ve tıbbi bilimler olmak üzere birçok alanın kesiştiği disiplinlerarası bir alandır.



Şekil 2.1 Doku mühendisliğinin temel yaklaşımı.

Doku mühendisliği için en çok kabul gören tanım : “Biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerini tek başlarına veya birlikte kullanarak canlı dokuların tamiri veya yeniden yapılanması için biyoloji, kimya ve mühendislik ilkelerinin uygulanması”dır. Bu tanıma göre doku mühendisliği için 4 yaklaşım mevcuttur [6].

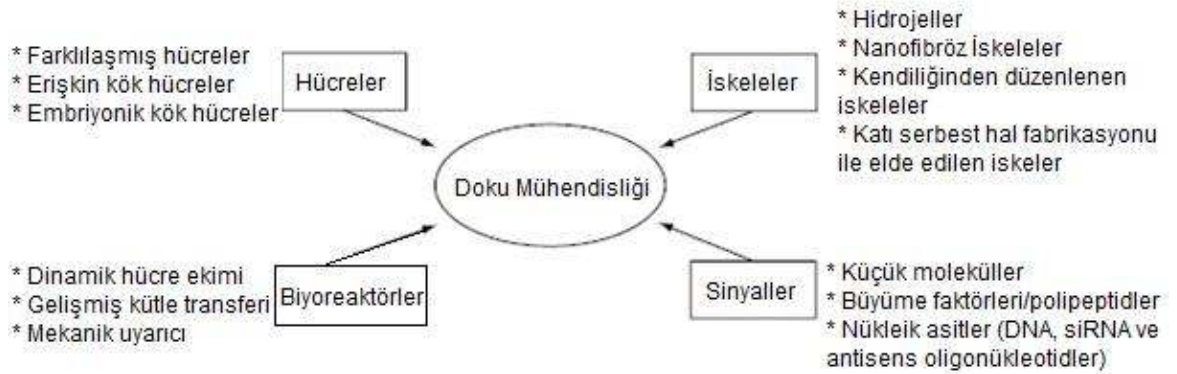
Birinci yaklaşım: Yeni dokunun oluşumu için yalnızca biyomalzeme kullanımı,

İkinci yaklaşım: İzole (canlı dokulardan elde edilen kök hücreler) veya manipüle (genetik işlem görmüş hücreler, “gen tedavisi”) edilmiş hücrelerin kullanımı,

Üçüncü yaklaşım: Hücre olmaksızın, biyomalzeme ile biyosinyal moleküllerinin kullanımı,

Dördüncü yaklaşım: Biyosinyal molekül varlığında veya olmadan biyomalzeme ve hücreleri bir arada kullanarak yapılan tedavi yaklaşımıdır. Bu yaklaşım, üzerinde en çok çalışılan ve en çok kabul görmüş yaklaşımdır (Şekil 2.1).

Hücre üremesini, yeni doku veya organları oluşturacak şekilde yönlendirmek ve gerekli mekanik desteği sağlamak için biyobozunur özellikteki malzemelerden (polimerler, seramikler veya bunların kompozitleri) 3-boyutlu doku iskeleleri üretilmektedir. Ayrıca, orjinal doku mikro-çevresindeki mekanik kuvvetlere benzer etkilerin sağlanabilmesi için çeşitli biyoreaktörler kullanılmaktadır (Şekil 2.2).



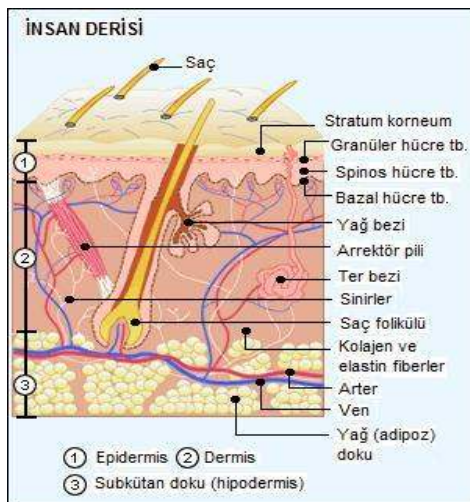
Şekil 2.2. Doku Mühendisliği bileşenleri

2.2. Deri Doku Mühendisliği

Deri doku mühendisliğinin amacı, zarar görmüş deri dokusunun normal anatomi ve fizyolojisinin geri kazanılmasına yönelik uygulamalar gerçekleştirmektir. Günümüze kadar geçen zamanda kültüre suni deriler sadece kısmi olarak anatomik veya fonksiyonel yapıyı restore etmekte kullanılmıştır. Oysa, deri doku mühendisliği uygulamaları derinin belirli bir katmanına yönelik değil, özellikle hasar sonrasında kendi kendini onaramayan katmanların onarılmasına yönelik uygulamalar olarak gelişmeye devam etmektedir. Deri doku mühendisliği yaklaşımlarını analiz edebilmek ve geliştirebilmek için öncelikle, derinin işlevi, yapısı ve meydana gelebilecek hasarlar karşısında harekete geçirdiği iyileşme mekanizmalarının anlaşılması gerekmektedir.

2.2.1. Derinin İşlevi ve Yapısı

İki boyutlu geometriye sahip deri, vücudu kaplayan en geniş organ olup, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal dış etkenlere, ultraviyole (UV) radyasyona ve serbest radikallerin tahrip edici etkilerine karşı koruyuculuk sağlamakta ve vücut ısısını muhafaza etmektedir. Deri başlıca üç tabakadan oluşmuştur, bu tabakalar en alttan üste doğru; hipodermis, dermis ve epidermis olarak sıralanmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Derinin yapısı

2.2.1.i Subkütan Yağ Tabakası (Hipodermis)

Hipodermis, dermis ile vücut bileşenleri arasında bir köprü görevi görmektedir. Vücudun birçok bölgesinde 1-2 mm kalınlığında olan bu doku, göz kapaklarında bulunmamaktadır. Özellikle fiziksel şoka karşı mekanik koruma sağlayan subkütan yağ tabakası, kan damarları ve sinirler açısından zengindir. Yağların depolandığı kısımdır, termal yalıtım sağlar ve derinin dayanıklılığında katkısı bulunmaktadır [17].

2.2.1.ii Dermis (Koryum)

Dermis, insan derisinin ana bileşenidir ve genellikle 3-5 mm kalınlığındadır. Deriye kesme kuvvetleri veya darbelere karşı mekanik destek sağlayacak yığın halindeki materyali, mukopolisakkarit yapısında bir jele gömülü halde içermektedir. Dermiste lif demetleri şeklinde bulunan beyaz renkli kollajen ve sarı renkli elastin fiberler, kan ve lenf kılcal damarlarını fiziksel olarak destekler ve korurlar. İçerisinde kan ve lenf damarları, sinir uçları, kıl folikülleri, yağ ve ter bezleri gibi birçok yapı bulunmaktadır.

Dermisin yoğun damar yapısı vücut sıcaklığının korunması bakımından çok önemlidir. Ayrıca dokuya, oksijen ve besin maddelerinin taşınması, toksinlerin ve atık ürünlerin uzaklaştırılması açısından yaşamsal öneme sahiptir. Dermis kaynaklı olan ve insan derisinin yüzeyinde bulunan üç ana uzantı; kıl folikülleri, yağ bezleri (sebaköz bezler) ve ter bezleridir. Yağ bezleri, kıl folikülünün sonlandığı yerde bulunur ve sebum salgılar. Sebum, bileşiminde serbest yağ asitleri, mumlar ve trigliseritlerin yer aldığı, deri yüzeyini kayganlaştıran ve yüzey pH'ının 5 civarında olmasını sağlayan salgıdır [17].

2.2.1.iii Epidermis

Derinin üst katmanı epidermis, keratinosit tabakalarından oluşur ve dehidrasyon, bakteriler, UV ışınlarına karşı koruma sağlar. Vücutta 0.06 mm-0.8 mm arasında değişen kalınlıklarda, düzenli olarak kendini yenileyebilen ve kan damarları içermeyen bir tabakadır. İnsanlarda epidermis 4 ana tabakaya ayrılmakta ve bu tabakalar en üstten aşağıya doğru şu şekilde sıralanmaktadır.

- Stratum bazal
- Stratum spinosum
- Stratum granulosum
- Stratum korneum

Stratum bazal: Stratum bazal (bazal tabaka) epiderminin en altında yer alır. Bazal tabakanın hücreleri, vücudun diğer kısımlarındaki hücrelere benzer şekilde mitokondri ve ribozomlar gibi organelleri taşıyan, metabolik açıdan aktif hücrelerdir. Keratinosit adı verilen bu hücreler, bir tek bazal tabaka sınırları içinde mitoz yolu ile bölünmektedir. Bölünmenin ardından, bir keratinosit bazal tabakada kalırken, diğeri üst tabakalara göç etmeye başlar. Keratinositler, desmozom olarak adlandırılan, protein yapıda çok özel hücresel köprüler ile birbirlerine bağlıdırlar. Bazal tabakada keratinositlerin yanı sıra melanositler, Langerhans hücreleri, Merkel hücreleri gibi bazı özel hücre tipleri de bulunmaktadır. Melanositler, melanin pigmenti sentezler, UV radyasyonu absorplar ve serbest radikal yakalama özelliğine sahiptirler. Langerhans hücreleri, kemik iliğinde oluşmakta ve bağışıklık cevabında rol oynamaktadır. Merkel hücreleri (mekanoreseptörler) sinir uçları ile birleşiktir, parmak uçları ve dudaklar gibi özellikle dokunma duyusuna hassas kısımlarda yoğun olarak bulunmaktadır.

Stratum spinosum: Stratum spinosum, bazal tabakanın üstünde yer alır ve bu iki tabaka bir arada **“Malpighian Tabakası”** olarak da adlandırılır. 2-6 arası sayıda keratinosit sırasından oluşan tabakanın yapısal kararlılığı, keratin ipliklerine tutunarak keratinositleri birbirine bağlayan, aynı zamanda hücrelerin arasında 20 nm’lik mesafenin korunmasını sağlayan desmozomlar tarafından sağlanır.

Keratinositler bu tabakanın üst kısımlarına ulaştıklarında yapısal olarak farklılaşmaya ve keratin sentezlemeye başlamaktadır. Lipit içeriği bakımından zengin, tabakalı cisimcikler (Odland cisimcikleri) ilk olarak bu tabakada ortaya çıkmaktadır.

Stratum granulosum: Keratinositler, stratum spinosum'dan stratum granulosum'a (granüler tabaka) geçerken değişmeye, keratin sentezlemeye ve yassılaşmaya devam ederler. Az sayıda keratinosit katmanından oluşan granüler tabaka, çekirdek ve organeller gibi canlı hücre bileşenlerini parçalayan enzimleri içermektedir. Keratinle dolmaya başlayan keratinositler, granüler tabakanın daha üst kısımlarına ulaştıklarında, içlerinde bulunan ve ileriki evrelerde oluşacak hücrelerarası epidermal lipitlerin öncüleri olan yapıları hücreler arası boşluklara boşaltmaya başlarlar. Keratinositlerin içinde yer alan organellerin parçalanması stratum korneum ile olan ara yüzeyde tamamlanmaktadır.

Stratum korneum: Yaklaşık 10 µm kalınlığındaki stratum korneum, boynuzsu tabaka anlamına gelmektedir ve epidermin canlı olmayan en dış tabakasıdır. Hücreler arası lipit tabaka içine gömülü, yassı ve keratinle dolu ölü hücreler olan, 10-15 tabaka halindeki korneositlerden oluşur. Bu hücreler bol miktarda keratin içermektedir ve keratinositlerin farklılaşmış, başka bir deyişle ölmüş halidir. Hücreler arası lipitler çeşitli maddelerin deriden geçişinde önemli bir engel oluştururlar. Stratum korneum, korneositlerin birarada bulunduğu alt kısım olan "stratum kompaktum" ve korneositlerin daha seyrek olduğu üst kısım olan "stratum disjunktum" olarak iki ayrı tabakada incelenebilmektedir. Her ne kadar canlı bir doku olarak tanımlanamasa da, stratum korneum, birçok enzimatik reaksiyonun düzenli olarak gerçekleştiği, dinamik bir yapıdır [17].

2.2.2. Yara İyileşme Mekanizmaları

Yara, herhangi bir dış etkenin veya hastalığın fiziksel bir hasar yaratması ile vücutta normal deri bütünlüğünün bozulmasıdır. Yara deyiminin karşılığı olarak **erozyon**, **ülser** ve **fissür** deyimleri de kullanılır. Erozyon, dermise geçmeyen fokal epidermis kayıplarını ifade eder, iz bırakmaz, kronik değildir. Fissür, çatlak şeklindeki dikey yaraları ifade eden doku kayıplarındır. Epidermis, dermis veya her ikisini birden etkisi altına alabilmektedir. Ülser ise dermis ve epidermiste doku kayıpları ile seyreden fokal yaralardır. Ülserler kronikleşerek klinisyenler açısından zaman zaman tedavisi zor durumlar yaratabilmektedirler. Yara iyileşmesi için kesin bir süre olmamakla birlikte, makul sürede iyileşemeyen, yavaş veya az ilerleme gösteren yaralar için **kronik** deyimini kullanılır [18, 19].

Yara iyileşmesi, sadece yara bölgesiyle sınırlı değildir, tüm sistemleri barındıran hücresel, fizyolojik ve biyokimyasal olaylar bütünüdür. Bütün yaralar aynı temel prensiplerle iyileşirler. Yara iyileşmesi temel olarak 3 aşamada gerçekleşir [18].

1. İnflamasyon
2. Proliferasyon
3. Matürasyon

2.2.2.1. İnflamasyon safhası (1-5 gün): Doku zedelenmesi birçok kimyasal mediyatör ve hücreler arası bilgi aktarımını sağlayan sitokinlerin salımına neden olur. Bu maddeler aktivasyon ve inhibisyon yaparak birçok kompleks olayı başlatıp, hemostaz ve iyileşmeyi sağlarlar. Damar duvarı zedelendiğinde trombositler açılan damar duvarındaki kollajenle temas ederek aktive olurlar. Böylece hem damar duvarına hem de birbirlerine yapışırlar. Tromboksan A2'nin aktivasyonu ile bu trombositler geçici pıhtı oluşturarak başlangıçta kanamayı azaltırlar. Daha sonraki aşamada trombositlerden salınan serotonin ve diğer vazokonstriktör ajanlarla damar duvarı daralarak kanamayı azaltır [19]. Başlangıçta gelişen bu vazokonstriksiyon, prostaglandin ve kompleman sisteminin aktivasyonu ile yerini yaygın vazodilatasyon ve inflamasyona bırakır.

Vazodilatasyonla birlikte vasküler geçirgenlik artar ve hücreler arasında inflamatuvar eksuda, yani iltihap toplanır. Birçok kemotaktik faktörün etkisiyle nötrofil ve monositler sahaya toplanırlar. Bu hücreler sahaya geldiğinde lokal çevresel faktörlerin etkisiyle aktive olurlar. Lökositler yaradaki bakterilerle savaşıırken, monositler de makrofaja dönüşerek, çeşitli büyüme faktörlerini ve sitokinleri salgırlar. Makrofajlar bakterileri öldürüp fagosite ederken, ölü doku ve lökositleri de temizlerler. Yaralanmadan 72 saat sonra hakim olan hücreler makrofajlardır. Bu arada anjiogenik büyüme faktörü salınımıyla yeni damar oluşumları başlar. Yeni damarlar oluştukça, oksijenli kan yara bölgesine ulaşır, saha daha az hipoksik olur ve beslenmesi düzelir. Fibroblastlar yeni damarların etrafında kollajen sentezlerken, ürettikleri proteoglikanlarla kollajenlerin birbirine bağlanmasını ve daha esnek olmalarını sağlarlar. Ayrıca ürettikleri fibronektinle kollajen ve diğer hücreleri bir arada tutarlar. Granülasyon dokusu oluşumu yaklaşık 5. günde başlar. Bu aşamanın başlaması için iyi bir oksijenlenme ve beslenme şarttır. Bu aşamada vitamin C, prolinin hidroksiproline dönüşümü için şarttır [19, 20].

2.2.2.2. Proliferasyon ve yara izi gelişimi safhası (5-14 günler): Fibroblastlar kollajen liflerini üretirler. Kollajen de yaranın kontraksiyonunu ve gerilme kuvvetini oluşturur. Bu safhada epitelizasyon ve kontraksiyon gelişir. Doku hasarı çok büyük doku kaybı ile beraberse yenilenme yara kenarlarından başlar, epitel granülasyon dokusunun üzerinden ilerler. Hücre göçü, epitellerin karşılıklı bir araya gelmesine kadar devam eder. Daha sonraki aşama kontraksiyondur. Yara kontraksiyonu ile yara büyüklüğü azalır. Bu olay çoğunlukla miyofibroblastlarca gerçekleşir. Granülasyon dokusu oluşup epitelizasyon tamamlanınca proliferasyon aşaması sona erer [19, 20].

2.2.2.3. Maturasyon safhası (14. günden sonra): Proliferasyon safhasından sonra başlar ve yıllarca sürer. Bu kollajen liflerinin yeniden şekillenmesidir (remodeling). Bu aşamada yumuşak ve jelatinöz yapıdaki tip III kollajen zamanla daha sıkı olan tip I kollajene dönüşür. Kontraksiyonun bir kısmı bu aşamada gelişir. Yara yaklaşık 6 hafta sonra % 95 oranında iyileşme gösterir [19, 20].

2.2.3. Deri Doku Mühendisliği Yaklaşımı

Deri hasarları sonucu oluşan kayıplar, vücudun sağlıklı dokularından alınan deri parçalarıyla telafi edilebilir. Doku hasarının çok geniş olduğu durumlarda ise vücuttan alınan deri parçaları yeterli olmamaktadır. İşte bu noktada devreye doku mühendisliği girmektedir.

Başka vericilerden, örneğin kadavradan alınan deri parçaları, bağışıklık sisteminin reaksiyonuna bağlı olarak birkaç hafta içinde reddedilebilmektedir. Sentetik malzemeler ise vücut tarafından yabancı olarak algılanarak bağışıklık sistemini harekete geçirmektedir. Bu nedenlerden dolayı, vücudun rahatlıkla kabul edeceği ve her an temin edilebilecek deri parçalarına ihtiyaç duyulur. Bu ihtiyaç da doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen deri eşdeğerlikleriyle karşılanır (Şekil 2.4).

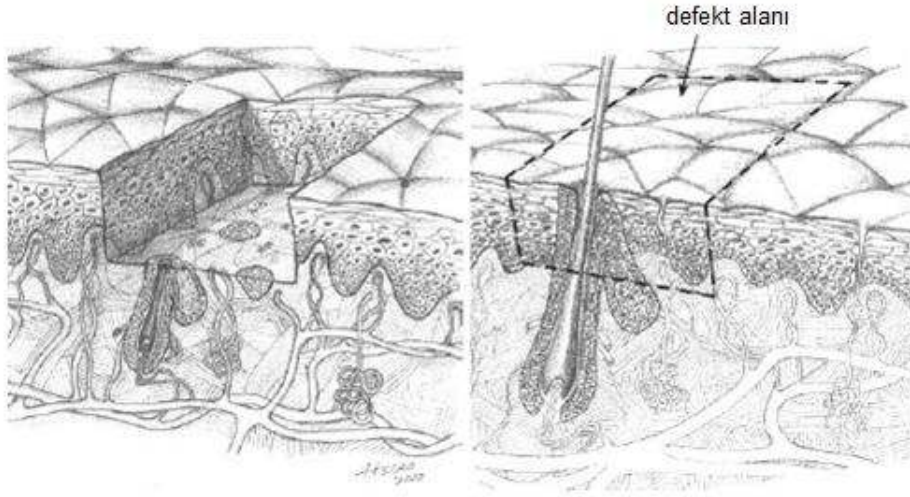


Şekil 2.4. Hücre bazlı deri doku mühendisliği yaklaşımının şematik gösterimi [21].

Doku mühendisliğinde kullanılan deri eşdeğerlikleri genellikle epidermis ve dermis tabakalarında oluşan defektleri tedavi etmeye yönelik yaklaşımlar içermektedir.

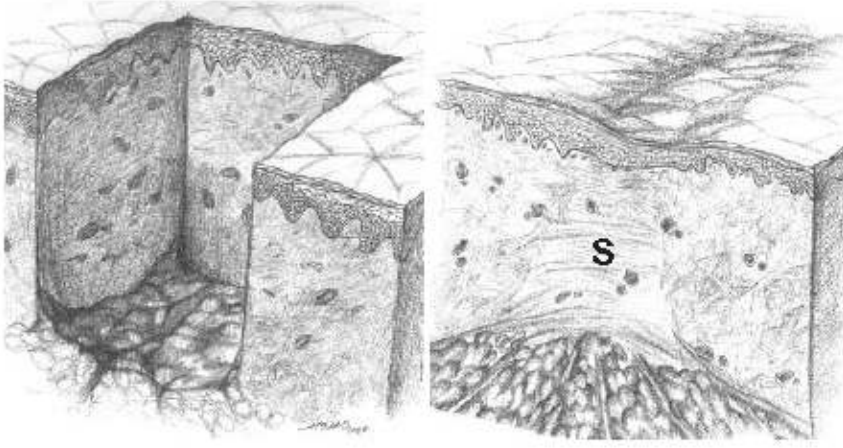
Epidermal tabakanın rejeneratif, dermal tabakanın non-rejeneratif olmasından dolayı, dermal tabaka olmadan yapılan tedavilerin kullanım alanı sınırlıdır. Dermis içerisinde, kollajen ve elastin yapıları, kapiler kan damarları, sinirler, kıl kökleri gibi bileşenler barındırdığından, yapısal ve işlevsel olarak orjinaline yakın bir dermis tabakası oluşturmamanın birçok zorluğu mevcuttur. Bu nedenle orjinaline yakın deri tabakaları oluşturmaktan ziyade, yara iyileşme mekanizmalarını harekete geçirici yapıların sentezlenmesine çalışılmaktadır.

Epidermis, derinin yenilenebilen tek tabakasıdır ve oluşacak defekt sonucunda herhangi bir müdahaleye gerek kalmaksızın kendi kendini onarabilmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Epidermiste meydana gelen defektin yapı bütünlüğü bozulmadan giderilmesi.

Epidermisin altında bulunan dermiste meydana gelen bir defekt ise iyileşme süreci sonucunda yerini yara dokusuna bırakmaktadır (Şekil 2.6). Epidermisin yüksek iyileşme kapasitesine rağmen, geniş alanlardaki kayıplar normal yenilenmeyi yetersiz kılmaktadır. Oluşan yara, gerekli olan epidermal yenilenmeyi engelleyerek veya azaltarak, büzülme şeklinde bir iyileşme ile sonuçlanır. Oluşan yara dokusu elastikiyet ve fonksiyon kaybına, hareket kısıtlamasına, acıya ve istenmeyen estetik görünüme neden olmaktadır [2].



Şekil 2.6. Dermiste oluşan herhangi bir defektin yerini yara dokusuna bırakması (S).

İdeal bir deri eşdeğeri veya yara örtüsünün hasar görmüş deri dokusunu onarabilmesi için sahip olması gereken özellikleri şöyle sıralanabilir:

- Yara yüzeyinden sızıntıları ve toksik maddeleri absorbe edebilmeli,
- Yara/örtü arayüzündeki yüksek nemliliği devam ettirebilmeli,
- Gaz değişimine izin vermeli,
- Termal yalıtım ve mekanik koruma sağlamalı,
- Yarayı bakteri ve mikroorganizma girişinden korumalı,
- Nontoksik ve nonalerjenik olmalı,
- Yara kokusunu kontrol edebilmeli,
- Kozmetik açıdan kabul edilebilir olmalı,
- Travma yaratmadan yaradan rahatça çıkarılabilmeli, değiştirilmeyecekse yara iyileşme süreci içerisinde biyobozunabilen yapıya sahip olmalıdır.
- Maliyeti uygun olmalıdır [22].

Doku mühendisliği eşdeğerlikleri özellikle yanıklarda, ayak, bacak ile diyabetik ülser ve epidermolisis bullosa hastalıklarının tedavisinde geleneksel tedavi yöntemlerine göre üstünlük sağlamaktadır. Doku mühendisliği yaklaşımıyla hazırlanan dokular sadece yarayı kapatmakla kalmamakta, aynı zamanda dermis yenilenmesini uyararak yara iyileşmesi sürecine katkıda bulunmaktadır.

Deri doku mühendisliği yaklaşımıyla hazırlanan deri eşlenikleri vücutta yeni doku oluşturarak bozunurken, yara örtüleri hem biyobozunur hem de belli bir süre sonra değiştirilebilen malzemelerden elde edilebilmektedir. Yara örtüleri, aynı deri eşlenikleri gibi hücre ve biyosinyal moleküller içerebilirler. Günümüzde deri defektlerinde kullanılmak üzere piyasaya sunulan birçok implante edilebilir ürün mevcuttur.

2.2.4. Deri Doku Mühendisliğinin Ticari Ürünleri

1975 yılında insan keratinositlerinin laboratuvar ortamında deri grefti uygulaması için tabaka halinde üretilmesiyle, deri doku mühendisliği uygulanabilir hale gelmiştir. Donörden alınan keratinositler çoğaltılmış, tabaka halinde fibroblast besleyici tabakası üzerine ekilmiştir [23]. Bu teknik sürekli güncellenmiş ve klinik uygulamalarda geniş yer bulmuştur. 1988 yılında bu yöntemle üretilmiş Epicel™, ticari ürün olarak piyasaya sunulmuştur, ve özellikle vücutlarının %30'undan fazlası yanan hastalarda kullanılmaktadır [24].

İlk biyobozunur malzemeden üretilen ticari ürün, kollajen-glikozaminoglikan bazlı sünger yapı İntegra™' dır. İki tabakadan oluşmaktadır; alttaki tabaka olan dermal eşdeğerlik, sığır kollajeni ve kondroitin-6-sülfat glikozaminoglikan'dan oluşmaktadır. Üstteki tabaka olan epidermal eşdeğerlik, sentetik silikon polimerinden yapılmıştır. Silikon tabakası su buharı kaybını kontrol eder, ayrıca yapıya esneklik ve dayanıklılık kazandırır. Geniş yanık yaralarının kaplanması yaygın olarak kullanılmaktadır. İntegra, herhangi bir vericiye ihtiyaç duymadan yanık bölgelerin erken tedavisi için uygundur. Silikon tabaka bozunarak uzaklaşır

ve ince epidermal otogreft uygulanır. Enfeksiyon oranını arttırması dezavantajdır [24, 25].

Alloderm™, doğal hücresiz matris örneğidir. Integra'ya benzer ve dermal doku modellemesi için gerekli olan matrisi sağlar. Tek tabakalıdır ve saklanabilen insan allogreft derisinden oluşur. Söz konusu allogreft, epidermal bileşenleri ve bütün dermal hücreleri uzaklaştırılmış aselüler bir yapıdır. Yapı transplante edilmeden önce patentli bir dondurarak kurutma işlemine tabi tutulur. Bu yapı aselüler olduğundan bağışıklık sistemi tarafından reddedilmez ve dermal otogreft gibi ince bir tabaka halinde nakledilebilmektedir. Bu yapı, kollajenler, proteoglikanlar ve elastinleri sentezlemek ve damarlaşmayı sağlamak için gerekli yapısal ve biyokimyasal özellikleri içermektedir. Yanık tedavileri ve yumuşak doku hasarlarında tercih edilmektedir [24, 25].

Biobrane™, silikon, naylon ağ ve kollajen olmak üzere 3 tabakadan oluşmaktadır. Kollajenden türemiş peptidler, naylon/silikon matrisi üzerine kaplanır ve yara yatağı içerisine yapışarak fibrovasküler gelişime yardımcı olur. Silikon yüzey, yarı geçirgendir ve yaradan su buharı kaybını kontrol eder. Geçici yara örtüsü olarak kullanımı hedeflenmiştir. Yara iyileştiği zaman veya otogreft deri kullanımı uygun olduğu zaman vücuttan uzaklaştırılır. Klinik çalışmalar, Biobrane'in epidermis ve dermisi içeren yanıkların geçici kaplamaları için, donmuş insan allogreftine benzer bir etkiye sahip olduğunu kanıtlamıştır. İyileşmenin geliştiği ve ikinci derece yanıklara sahip hastaların hastanedeki tedavi sürelerinin azaldığı gözlenmiştir. Uzun bir raf ömrüne sahiptir. Fakat antimikrobiyal özelliği yoktur [26, 27].

1987'den beri ülser, yanık ve dermal değişim için kullanılan Dermagraft™, poligliaktin ağ üzerine ekilmiş insan neonatal fibroblastlarından oluşmaktadır. 3-4 hafta kültürasyondan sonra biyobozunur malzeme ortadan kalkar. Bu zaman boyunca hücreler, dermal yedek olarak kullanılabilecek 3 boyutlu matrisi oluşturmak için, insan dermal kollajenlerini ve çözünür faktörleri içeren matris proteinlerini salgılar. Hücrelerin canlılığını korumak için "cryopreservation" (dondurarak saklama) işlemi yapılır [24, 25].

TransCyte™, silikon tabaka içerisine gömülmüş naylon ağ üzerine ekilmiş neonatal allojenik fibroblastlardan oluşmaktadır. Silikon tabaka epidermis görevi görmektedir. Ekim işleminden 4 ila 6 hafta sonra, yapı içerisinde yüksek oranda matris proteinleri ve büyüme faktörleri birikir. Dondurma işleminden sonra fibroblastlar etkisiz hale gelmekte ve sentezlenen ürünler bu yöntemle korunmaktadır. TransCyte™, otogreft için uygun hale gelene kadar, geçici yara örtüsü olarak kullanılır. Hastaya naklinden önce, ürün içindeki hücreler, immün cevap riskini azaltmak için yok edilir [24, 28].

Çift tabakalı selüler deri eşleniği olan Apligraf™, Graftskin olarak da bilinmektedir ve 1998’ de FDA onayı almıştır. Üst tabakada insan keratinositlerinin oluşturduğu epidermis yapısı gözlenir. Alt tabakada ise insan neonatal fibroblastlarının ekildiği tip I sığır kollajeni yer almaktadır. Apligraf, damarlı bacak ülseri ve diyabetik ayak ülserinin tedavisi için uygundur. Yara iyileşme oranını artırır ve yara kapanması için gerekli olan süreyi kısaltır. Kısa raf ömrüne sahiptir ve hastalık bulaştırma potansiyeli vardır [24, 29-33].

Orcel™, sığır kollajen tip I yapı içerisine çift taraflı ekilen allojenik fibroblastlar ve keratinositlerden oluşmuştur. Bu ürün kompozit kültür derisi (CSS) olarak da adlandırılmaktadır. Kollajen matris, çapraz bağlı kollajen sünger üzerine pepsin aracılığıyla kaplanmış çözünmeyen kollajen tabakadan oluşmaktadır. Keratinositler poröz olmayan kollajen jel üzerine, fibroblastlar ise poröz sünger tabakaya ekilmektedirler. Ürün, 10-15 gün arası kültüre edildikten sonra kullanılmalıdır. Orcel, yanığı olan ve cerrahi yaralara sahip hastalarda kullanılmaktadır. Bu ürünün naklinden sonra başka deri nakli gerekmez. Orcel’in iyileşmeye olan katkısı, yaşayan allojenik hücreler tarafından üretilen sitokin ve büyüme faktörleri ile kombine edilmiş kollajen sünger yapıya dayandırılmaktadır [24].

Epidex™, anajen evredeki saç foliküllerinin dış kökünden izole edilmiş otolog keratinositlerin silikon bir membran üzerine ekilmesiyle oluşan hücresel bir yapıdır. Saç kökünde bulunan keratinositlerin proliferasyon kapasitesi yüksek olduğundan

buradaki hücreler tercih edilmiştir. Bu ürün küçük çaplı kronik bacak ülserinin iyileştirilmesinde kullanılmaktadır ve tedavi sırasında ek yama gereksinimi vardır. Epidex'in hazırlanması ve 5 ila 6 haftada süreyle uygulanabilmesi için gerekli hücre popülasyonu yaklaşık 100 saç teli kadar hücreden karşılanmaktadır. Avrupada ticari ürün olarak mevcuttur [24].

Orijinal kültür epidermal otogrefti (CEA) olan Epicel™, sadece Amerika' da ticari ürün olarak satılır. Vücuttaki deri yüzey alanının %30' undan daha büyük yanıklara sahip hastalar için gereklidir. Küçük deri biyopsisi ile geniş alanlı kaplamalar yapılabilir. Kalıcı bir deri yamasıdır ve kozmetik olarak uygundur. Destekleyici parafin yağlı sargı bezine eklenmiş yapı, nakledildikten yaklaşık 1 hafta sonra uzaklaştırılmaktadır. Dermal-epidermal bağlantı yerlerinde görülen mekanik gevşeklik, episel CEA'nın en büyük dezavantajıdır. CEA'nın diğer bir dezavantajı ise, ağ yapılı genişleyen deri otogreftleri ile karşılaştırıldığında yara izi ve kasılma içermesidir. Epicel için yüksek fiyat ve aşırı laboratuvar işlemleri gereklidir, ayrıca kırılğan bir yapısı vardır [34, 27].

Bahsedilen tüm bu ticari ürünlerin yanı sıra, yara örtüleri ile ilgili çok sayıda araştırma literatüre geçmiştir. Özellikle ekstraselüler matris yapısını taklit etmeye yönelik çalışmalar, hem yara iyileşme mekanizmalarını tetiklemekte, hem de sonrasında oluşan yara dokusunu en aza indirmektedir.

2.2.5. Deri Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler

Biyolojik sistemlerle etkileştiğinde uyum sağlayabilen biyomalzemeler, insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek veya desteklemek amacıyla kullanılan doğal yada sentetik malzemelerden oluşmaktadırlar. Söz konusu bu malzemeler sürekli olarak veya belli aralıklarla kan gibi vücut akışkanlarıyla temas etmektedirler [35]. Bu nedenle tipik bir biyomalzeme; yaşayan sistemlerle ya da hücrelerle in vivo ve in vitro uyumluluk göstermeli, biyobozunur ise biyobozunma ürünleri toksik etkiler göstermemeli ve mekanik dayanım, ıslatılabilirlik, yoğunluk gibi gerekli fiziksel özelliklere sahip olmalıdır. Biyomalzemeler metalik, seramik,

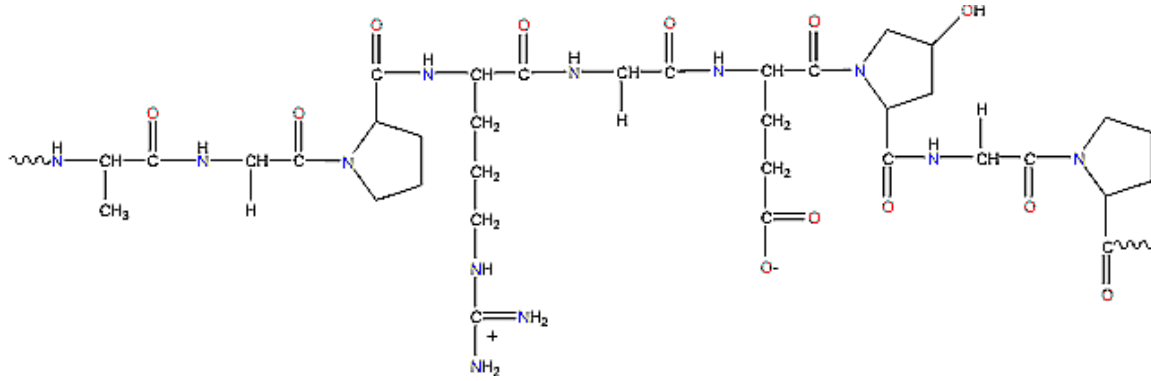
polimerik ve kompozit malzemeler olmak üzere 4 başlık altında gruplandırılmaktadırlar.

Doku mühendisliğinde sıklıkla biyobozunur polimer malzemeler kullanılmaktadır. Polimerik malzemeler, doğal ve sentetik olmak üzere iki çeşittir. Özellikle deri doku mühendisliğinde kullanılan doğal biyobozunur polimerler; kitin/kitosan, aljinat, hiyalüronik asit, ipek fibroin, kollajen, elastin ve jelatin olarak sıralanabilir [36]. Sentetik biyobozunur polimerler ise, kontrollü koşullarda üretilen ve bu nedenle genel olarak sergileyeceği davranışlar tahmin edilebilen; bozunma hızı, gerilme dayanımı, elastik modül vb. gibi fiziksel ve mekanik özellikleri tekrarlanabilen malzemelerdir. Sentetik polimerlerde malzeme safsızlığı da kontrol edilebilir. Deri doku mühendisliğinde tercih edilen sentetik polimerler silikon, poliüretan (PU), poli(glikolik asit) (PGA), poli(l-laktik asit) (PLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polikaprolakton (PCL) ve kompozitleri olarak sıralanabilir. Doku iskelesi üretiminde genellikle sentetik biyobozunur polimerler tercih edilmektedir [37].

Sunulan çalışmada kullanılan biyomalzemeler olmaları nedeniyle aşağıda jelatin ve PCL ile ilgili bilgi verilmiştir.

2.2.5.1. Jelatin

Kollajen tip I'in bozunmuş formu olan jelatin, doğal protein bazlı bir polimer olup biyomedikal ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Jelatin kollajenin geri dönüşsüz olarak hidrolize edilmesiyle elde edilir. Türetildiği üçlü sarmal yapıya sahip kollajenin aksine jelatinin denatüre protein zincirleri oda sıcaklığında su içerisinde kolayca çözünebilir hale gelmektedir. Doku mühendisliği yaklaşımıyla hazırlanmış jelatin doku iskeleleri, fizyolojik ortamda yapısal bütünlüklerini koruyabilmeleri için fizyolojik çözeltilerdeki çözünme hızına bağlı olarak, genellikle çapraz bağlayıcı bir ajan ile muamele edilirler. Ayrıca yaygın olarak greftleme veya başka polimerlerle karışım şeklinde doku mühendisliği iskelesi olarak hazırlanabilmektedir [38, 39, 5]. Şekil 2.7'de jelatinin kimyasal yapısı şematik olarak gösterilmiştir.



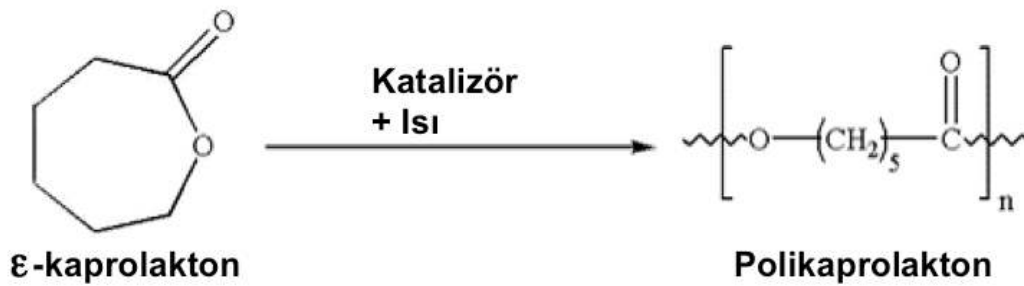
Şekil 2.7. Jelatinin kimyasal yapısı.

Jelatin için en temel sınıflandırma, jel gücü ya da jel sıkılığını tanımlayan ve **Bloom** adı verilen sınıflandırmadır. Diğer sınıflandırmalar ise, jelleşme noktası ve erime noktasına göre yapılan sınıflandırmalardır. Jelatinlerin gücü genel olarak 50-300 Bloom arasında değişmektedir. Sınıflandırma; düşük Bloom (<120), orta Bloom (120-220) ve yüksek Bloom (>220) olarak yapılmaktadır. 125-250 Bloom arasındaki jelatin gıda endüstrisinde kullanılırken, 300 Bloom gibi yüksek jel gücüne sahip jelatin, doku iskelesi gibi mekanik dayanıma ihtiyaç olan durumlarda kullanılmaktadır [40].

2.2.5.2. Poli(kaprolakton) (PCL)

Poli(α -hidroksi ester) ailesinin bir üyesi olan PCL, yarı kristalin yapısal özelliğe sahip biyobozunur bir sentetik polimerdir. Poliester ailesine mensup PLA, PGA ve PLGA ile karşılaştırıldığında PCL, düşük degradasyon hızına sahip olması nedeniyle doku iskelesi üretiminde daha az kullanılmaktadır [41]. Fakat, hidroliz atağına karşı sahip olduğu gelişmiş dirence rağmen diğer biyobozunur polimerlerden daha düşük fiyata sahip olduğundan, elektro-eğirme ile nanofiber üretimi için cazip bir polimerdir [38, 42-54].

PCL, ϵ -kaprolaktonun, 170°C'de, azot atmosferinde, dibütil kalay oksit (Bu_2SnO) katalizörünün varlığında gerçekleşen, halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenmektedir [55] (Şekil 2.8). ϵ -kaprolakton, çok sayıda farklı monomerle de (etilen oksit, stiren, metil metakrilat, vinil asetat vb.) kopolimerleştirilebilmektedir. Ayrıca, PCL birçok farklı polimerle uyumlu karışım oluşturma eğilimindedir. Bu özellikleri sayesinde PCL, doku mühendisliği çalışmalarında hem tek başına, hem de diğer polimerlerle birlikte görev alabilmektedir [56].



Şekil 2.8. ϵ -kaprolaktonun halka açılma polimerizasyonuna uğraması ile PCL sentezi.

2.2.6. Deri Doku Mühendisliğinde Kullanılan Fabrikasyon Yöntemleri

Deri doku mühendisliğinde tercih edilen doku iskelesi formu genellikle membranlardır. Membran tercih edilmesinin nedeni derinin ince yapısını taklit edebilmek ve hücre proliferasyonuna izin verecek bozunmaya uğramalarına olanak sağlayabilmektir. Membran fabrikasyonunda, çözücü uzaklaştırma (solvent casting), dondurarak kurutma (freeze drying), elektro-eğirme (electrospinning), katı serbest form fabrikasyon teknolojileri (SFF) ya da çözücü uzaklaştırmayı takiben, eksenel germe (biaxially stretching) veya dondurarak kurutma (freeze drying) yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır.

2.2.6.1. Yöntemlerden örnekler

Khor ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan keratinosit hücreleri, iki aşamada üretilen çözücüsü uzaklaştırılmış (solvent-cast) ve iki eksenli gerilmiş (biaxially stretched) PCL filmler üzerinde kültüre edilmiştir. Çözücüsü uzaklaştırılmış örtüler iki eksenli gerilmiş şekilde 5-15µm kalınlıkta üretilmektedirler. İki eksenli gerilmiş filmler esneklik, mekanik dayanım ve kütle oranına bağlı olarak, sadece çözücüsü uzaklaştırılmış örtülere göre daha iyi bir epidermal destektir. PCL filmler üzerinde hücreler tutunur, hızla çoğalırlar ve kültür periyodu süresince canlılıklarını yüksek oranda korurlar [57].

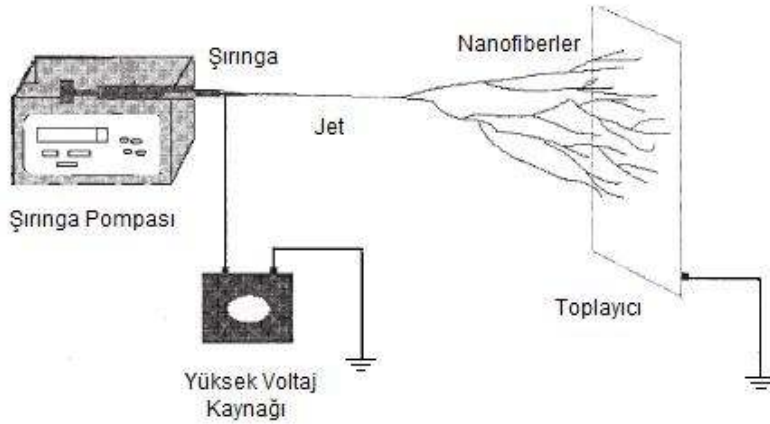
Yapılan bir başka çalışmada ise gözenekli ve dondurularak kurutulmuş jelatin hidrojenleri hazırlanmıştır [58]. Önce çapraz bağlanarak hidrojel haline getirilen jelatinin, distile su içerisinde şişmesi sağlanır. Ardından dondurularak kurutma yöntemiyle gözenekli doku iskeleleri oluşturulmaktadır.

Katı serbest form (SFF) fabrikasyon teknolojileri, katı veya sıvı haldeki malzemenin tabakalar halinde katılaştırılmasına dayanır. Her bir tabaka bilgisayar tabanlı bir dosya tarafından tanımlanarak oluşturulur. Her bir tabaka tamamlandığında yapı platformu bir tabaka kalınlığı kadar aşağı kaydırılarak işlem tamamlanır. Özellikle üç boyutlu defektlerin kapatılmasında başarılı sonuçlar alınmaktadır [59].

Günümüzde deri doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan teknolojilerden biri de elektroegirme. Elektroegirme, elektrostatik kuvvetleri kullanarak nano ölçeekte fiber üretimi yapan tek yaklaşımdır. Elektroegirme ile hazırlanmış fiberler, küçük fiber çapına ve yüksek yüzey alanına sahiptir. Elektroegirme yöntemi ile 15 nm'den 10 µm'ye kadar değişen çaplarda lifler hazırlanabilmektedir. Elde edilen nanofibröz doku iskeleleri, doğal ekstraselüler matris yapısını taklit ettiğinden, elektroegirme yöntemi, başarılı doku iskelesi fabrikasyonu yöntemleri arasında gösterilmektedir [60].

2.2.6.2 Elektroeğirme (Electrospinning) yöntemi

Elektrostatik kuvvet kullanarak fiber üretimi olarak özetlenen deneysel düzenek Formhals tarafından patentlenmiştir [61]. Fiberler bu yöntemle eğirildiğinde, işlem **elektroeğirme** olarak adlandırılmaktadır. Diğer bir deyişle, elektroeğirme, polimer çözeltisi veya eriyiğinin elektriksel olarak yüklenmiş jeti aracılığıyla nanofiber oluşturma işlemidir. Elektroeğirme işlemi basitçe, polimer çözeltisinin koyulduğu pipet veya şırınga, iki elektrod ve kV mertebesinde DC voltaj kaynağından oluşmaktadır. Şırınga ucundaki polimer damlası yüksek voltajın etkisiyle fibere dönüşür. Polimer jeti elektriksel olarak yüklenir ve bu yük polimer fiberlerinin kıvrılarak belli bir yol izlemesine neden olur. Bu yol boyunca fiberlerin çapı azalır. Fiberler ağ halinde topraklanmış hedefin (toplayıcı) yüzeyinde toplanır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Elektroeğirme işleminin şematik gösterimi.

Elektroeğirme ile ilgili önemli özellikler şöyle sıralanabilir:

- Polimer için uygun çözücü seçilmelidir.
- Çözücü fiber bütünlüğünü bozmayacak derecede hızlı buharlaşabilen ama toplayıcı hedefe giderken fiberlerin nanometre mertebesine ulaşabileceği süre geçene kadar da buharlaşmayan, yani uygun buhar basıncına sahip bir çözücü olmalıdır.
- Çözücünün viskozitesi ve yüzey gerilimi ne polimer jetinin oluşumunu engelleyecek kadar yüksek, ne de polimerin şırınga ucundan rahatça akabileceği kadar düşük olmalıdır.
- Kullanılan yüksek voltaj, polimer çözeltisinin viskozitesi ve yüzey gerilimini yenerek, şırınga ucundan polimer jeti formunu oluşturacak yeterliliğe sahip olmalıdır.
- Şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe, elektrodlar arasında akım atlama yapmayacak kadar ve zamanında buharlaşmayı sağlayıp fiber formu oluşmasına yardımcı olacak yeterlilikte geniş olmalıdır.

Elektroeğirme işleminde, polimer çözeltisine yüksek voltaj uygulanarak yüklerin sıvı içerisinde uyarılmaları sağlanır. Polimer çözeltisi içerisindeki uyarılan yükler kritik bir değere ulaştığında, iğne ucundaki damla koni şekline gelir ve sıvı jeti fışkırmaya başlar. Bu koni biçimine **Taylor konisi** adı verilmiştir [62]. Elektroeğirme jeti daha düşük potansiyelin olduğu alana doğru hareket etmeye başlar ve genellikle bu alan toplayıcıdır. Boncuklu fiberlerden, yüzeyinde gözenekler olan fiberlere kadar, elektroeğirmeyle elde edilmiş fiberlerin morfolojilerini etkileyen birçok parametre vardır. Elektroeğirme, eriyik halindeki polimer üzerinden gerçekleştirilebildiği gibi [63-66] çoğu elektroeğirme işlemi polimer çözeltileri kullanılarak yapılmaktadır. Elektroeğirmeyi etkileyen parametreler, polimer çözelti parametreleri, uygulanan voltaj, sıcaklık ve toplayıcı etkisini içeren işlem parametreleri ve çevresel parametreler olarak geniş bir biçimde sınıflandırılabilir. Bu parametrelerin anlaşılmasında, değişik tip ve yerleşime sahip fibröz yapıların elde edildiği elektroeğirme düzeneklerinin incelenmesi önemlidir. Bu parametrelerin değiştirilmesiyle değişik morfolojide nanofiberler hazırlamak mümkündür.

2.2.6.2.i. Polimer çözeltisi ile ilgili parametreler

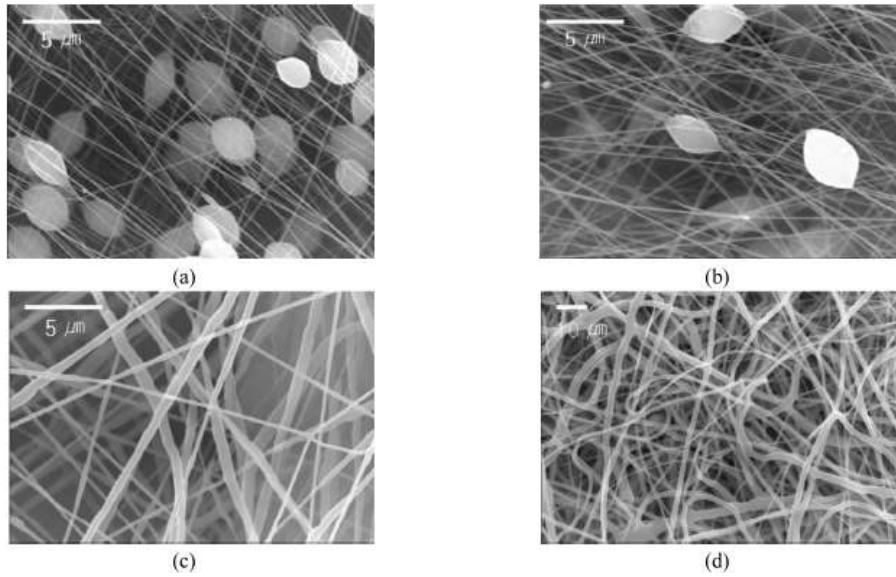
Polimer çözeltisi özellikleri, elektroëirme işlemini ve oluşan fiber morfolojisini önemli ölçüde etkilemektedir. Yüzey gerilimi, fiber uzunluğunun yanısıra boncuk oluşumunda da önemli rol oynamaktadır. Çözelti viskozitesi ve çözeltinin elektriksel özellikleri çözeltinin elektrik alan etkisinde uzama derecesini tanımlar. Tüm bu parametreler, fiber çapını doğrudan etkilemektedir.

Moleküler ağırlık ve çözelti viskozitesi: Elektroëirme yöntemi için gerekli koşullardan biri polimer çözeltisinin uygun moleküler ağırlık ve viskoziteye sahip olmasıdır. Elektroëirme işlemi sırasında polimer jeti iğneyi terkederken, polimer çözeltisi gerilerek toplayıcıya doğru hareket eder. Polimer çözeltisinin gerilmesi süresince, molekül zincirlerinin dolaşıklığı sayesinde elektriksel olarak yüklenmiş jetin kırılması engellenir ve polimer çözeltisine ait jetin sürekli oluşması sağlanır. Sonuç olarak, monomerik polimer çözeltileri elektroëirme işlemine tabi tutuldukları zaman fiber formunda elde edilemezler [67].

Polimerin moleküler ağırlığı, polimer zincirinin uzunluğunu belirtir. Polimer uzunluğu çözücü içerisindeki polimer zincirlerinin dolaşıklığının oranını tanımlar ve bu durum da çözelti viskozitesini artırır. Çözelti viskozitesini arttırmanın bir diğer yolu ise, çözeltideki polimer konsantrasyonunu arttırmaktır. Benzer şekilde moleküler ağırlığı arttırmak, çözelti içerisindeki konsantrasyonu arttırmaktadır. Bu durum çözelti içerisinde yüksek polimer zinciri dolaşıklığına neden olmakta ve bu da elektro-ëirme sırasında oluşan jetin sürekliliğini sağlamak açısından gereklilik arz etmektedir.

Polimer zincir dolaşıklığı, elektroëirme sırasında polimer jeti küçük damlalara ayrıldığında yada üretilen fiberlerde boncuk oluştuğu durumlarda önemli bir etkiye sahiptir [68]. Minimum polimer zinciri dolaşıklığı gerekliliğinin yanı sıra, polimer çözeltisinin şırınga ucundan pompalanmasını bir miktar zorlaştırması açısından viskoziteye de ihtiyaç vardır [69]. Viskozite çok yüksek olduğunda, elektroëirme işlemi başlamadan önce şırınga ucundaki çözelti kuruyabilir [70]. Birçok deneysel

Çalışma, boncuk oluşmadan fiber üretiminin gerçekleştirilebilmesi için her polimer çözeltisinin minimum viskoziteye ihtiyaı olduğunu göstermektedir [71, 72]. Düşük viskozitede benzer durum fiberler boyunca boncuk oluşumudur. şekil 2.10.'da gösterildiği gibi, viskozite arttığında, oluşan boncuklar, fiber formuna gelene kadar, kademeli olarak küresel formdan iğ formuna geçmeye başlarlar [72, 73]. Düşük viskozite değerlerinde, çözücü moleküllerinin fazlalığı ve daha az zincir dolaşıklığının varlığı, elektroğirme jeti üzerindeki yüzey geriliminin baskın etki kazanmasına ve bunun sonucu olarak da fiberler boyunca boncuk oluşumu görülmesine neden olmaktadır.

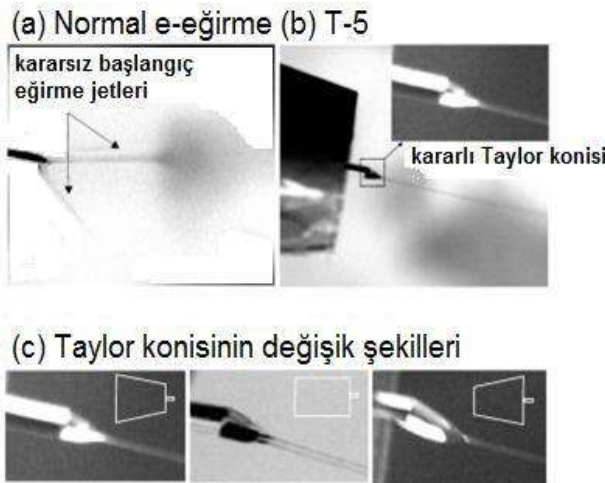


şekil 2.10.Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan zeltilerden elde edilen PCL nanofiberlerin SEM görüntüleri. PCL konsantrasyonları; (a) %8, (b) %10, (c) %12, (d) %16 [74].

Viskozitenin yükselmesi, polimer zincir dolaşıklığının artmasını ve böylece elektroğirme jeti üzerindeki yüklerin, polimer zincirleri arasında dağılmış çözücü molekülleriyle beraber tamamen esneyebilmesini sağlamaktadır. Viskozitenin artmasıyla beraber fiber çapı da artmaktadır [71, 75-78]. zeltinin yüksek direncine bağlı olarak jet üzerindeki yüklerin zeltiyi esneterek kararlı bir jet oluşumunu sağladıkları düşünülmektedir [76].

Polimer jeti içerisindeki çözelti ve yükler arasındaki etkileşim fiber çapı dağılımını belirlemektedir. Elektro-eğirme işlemi sırasında, ana elektro-eğirme jetinden ikincil bir elektro-eğirme jeti ortaya çıkabilir. Bu jet belirlenmiş viskozite değerinde daha küçük çaplı fiberlerin oluşmasına neden olmaktadır [79]. Bazı durumlardaki farklı fiber çapı dağılımları bu sayede açıklanmaktadır [77, 78, 80]. Fakat, viskozite yeterli derecede yüksek olduğunda ana jetten ikincil jet oluşumu engellenerek, daha yüksek çaplarda ve dağılımları birbirine yakın fiberler elde edilebilmektedir [81].

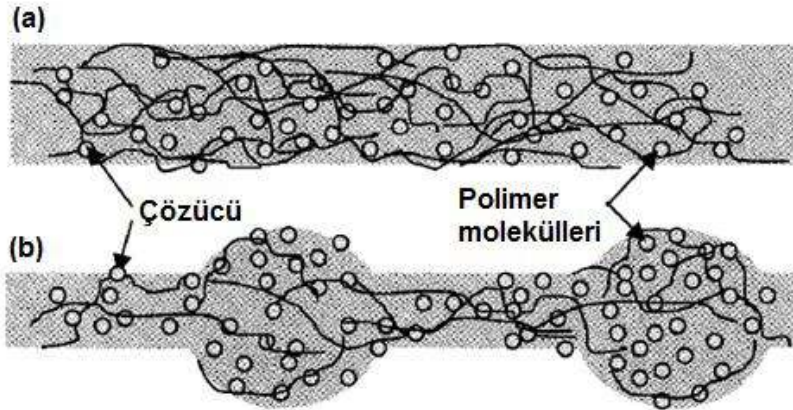
Yüksek konsantrasyonun bir başka etkisi de daha küçük toplanma alanı olarak gözlemlenir. Konsantrasyonu arttırmak demek, iğne ucu ile toplayıcı arasındaki uzaklığı arttırarak, çözelti viskozitesini elektro-eğirme işlemi sırasında meydana gelen bükülme kararsızlığını engelleyecek yeterliliğe getirmek demektir. Sonuç olarak, jetin katedeceği yol artacak ve bükülme kararsızlığı daha dar bir alana yayılacaktır [73]. Jetin alacağı yolun artması demek, çözeltinin daha az esnemesi ve sonuç olarak oluşan fiberlerin çapının artması demektir. Viskozite, düzgün fiber üretiminde önemli rol oynamasına rağmen, fiber çapı belirlemede konsantrasyon kadar etkisi bulunmamaktadır [82].



Şekil 2.11.(a) Normal elektro-eğirme işlemi ve oluşan kararsız jet, (b) T-5 yardımcı elektroduyla oluşan kararlı jet, (c) Farklı elektrod tiplerine göre çeşitlilik gösteren Taylor konisi.

Kararlı bir polimer jetinden benzer dağılıma sahip ve daha dar bir alanda toplanan fiberler oluşturabilmek için yardımcı elektrodlar kullanılmaktadır [83]. Bu elektrodlar sayesinde şırınganın iğnesi üzerindeki elektrik alanı iğne ucuna yoğunlaştırıp düzgün bir Taylor konisi elde ederek, daha düşük voltajlarda ve yüksek akış hızı değerlerinde fiberler elde edilebilmektedir (Şekil 2.11).

Yüzey gerilimi: Elektroeğirme işleminin başlangıcında yüklenen çözeltinin kendi yüzey gerilimini yenmesi gerekmektedir. Fakat, jet toplayıcıya doğru hareket ederken, yüzey gerilimi jet boyunca boncuk oluşumuna neden olabilir. Yüzey gerilimi sıvının birim hacim başına düşen yüzey alanını düşürücü bir etki yapmaktadır. Serbest haldeki çözücü molekülleri yüksek konsantrasyona sahip olduğunda, çözücü moleküllerinde yüzey gerilimine bağlı olarak küresel şekilde toplanma eğilimi görülmektedir. Yüksek viskozite, çözücü ve polimer molekülleri arasında yüksek etkileşim demektir ki polimer çözeltisi yüklerin etkisi altında gerildiğinde, çözücü molekülleri, dolaşık polimer molekülleri üzerine yayılma eğilimi gösterir, böylece yüzey gerilimi etkisinde çözücü moleküllerinin bir araya gelme eğilimi azalmaktadır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 (a) Yüksek viskozitede, çözücü moleküllerinin dolaşık polimer molekülleri üzerine dağılması, (b) Düşük viskozitede, çözücü moleküllerinin yüzey gerilimi etkisi altında bir araya toplanma eğilimi göstermesi.

Etanol gibi yüzey gerilimi düşük çözücülerle düzgün fiber eldesi sağlanabilmektedir [72]. Yüzey gerilimini düşürmenin bir başka yolu çözeltiye surfaktan eklemektir. Surfaktan eklenmesiyle birbirine benzer fiberler elde edilebilmektedir. Hatta çözelti içerisinde toz halinde dağıtılan çözünmeyen surfaktanın, fiber morfolojisinde iyileşmeye neden olduğu görülmüştür [84].

Çözelti iletkenliği: Elektroğirme işlemi çözelti içerisindeki yüklerin birbirini itmesine neden olarak bir gerilme yaratır. Çözeltinin iletkenliği arttığında, daha fazla yük elektroğirme jeti tarafından taşınabilmektedir. Çözeltinin iletkenliği iyon eklenmesiyle artırılabilir. Ayrıca, iyon formunda birçok ilaç ve protein suda çözünebilmektedir. Daha önce, polimer çözeltisi elektrik alan etkisinde tam olarak gerilmediğinde boncuk oluşumu olduğundan bahsedilmiştir. Çözeltiye az miktarda tuz veya polielektrolit eklenmesiyle, çözelti tarafından taşınan yük miktarı artacağından çözeltinin gerilmesi artacaktır. Böylelikle boncuksuz düz fiberlerin üretimi sağlanmaktadır. Yüksek iletkenlikte çözücülerle hazırlanan polimer çözeltileri boncuksuz fiber üretimine olanak sağlarken, sıfır iletkenliğe sahip çözeltiyle yapılan elektroğirme işlemi sonucu fiber oluşmadığı görülmüştür [76]. Çözelti gerilmesi aynı zamanda daha düşük çapta fiber üretimine olanak sağlamaktadır [70]. Çözeltide gerilme oluştuğunda yüklerin kulombik kuvvetlerine karşı yüksek viskoelastik kuvvetler oluşmaktadır [85]. Bu durum da fiber çapındaki düşüşü sınırlandırmaktadır.

Çözelti iletkenliğini yükselten iyonların varlığı, elektroğirme için oluşan kritik voltaj değerini azaltmaktadır [84]. Yük artışının diğer bir etkisi ise yüksek bükülme kararsızlığına (bending instability) neden olmasıdır. Daha kararsız bir hareket olduğundan toplayıcıda biriken fiberler daha geniş bir alana yayılmaktadır [85]. Bu durum jetin alacağı yolu arttırarak daha ince fiber oluşumuna yardım etmektedir.

Kullanılan iyonların büyüklüğünün fiber morfolojisi üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır. Fiber üretilen polimer çözeltisine NaCl eklenirse daha küçük çaplı, KH_2PO_4 eklenirse daha büyük çaplı fiberler, NaH_2PO_4 eklenirse orta büyüklükte

fiberler elde edilir. Sodyum ve klor iyonları, potasyum ve fosfat iyonlarına göre daha küçük atomik çaplara sahip olduklarından, harici elektrik alan etkisi altında daha büyük hareket kabiliyetine sahiptirler. Sonuç olarak, daha küçük iyonlar daha fazla hareket kabiliyetine sahip olduklarından, elektroğirme jeti üzerindeki daha büyük uzatıcı kuvvete neden olarak, düşük çaplarda fiber üretimine olanak sağlamaktadırlar [70].

Çözücünün dielektrik etkisi: Çözücünün dielektrik sabiti elektroğirme işleminde önemli bir etkiye sahiptir. Genel olarak yüksek dielektrik özelliğe sahip olan bir çözelti, boncuk oluşumunu ve fiber çapını azaltıcı etki göstermektedir [87]. DMF gibi çözücülerin eklenmesiyle, çözeltinin dielektrik özellikleri arttırılmakta, bu sayede fiber morfolojisi düzeltilmektedir [88]. Elektroğirme jetinin bükülme kararsızlığı yüksek dielektrik sabiti ile artmaktadır. Bu durum toplayıcı üzerindeki toplanma alanının arttığını göstermektedir. Bu aynı zamanda, jetin aldığı yolun artmasına bağlı olarak fiber çapını düşürmeye yardımcı olmaktadır [89]. Fakat, yüksek dielektrik sabitine sahip bir çözücü, çözeltinin elektroğirilebilirliğini arttırmak için eklendiğinde, polimerin çözünürlüğü gibi karışımlar arasındaki etkileşimin, üretilen fiber morfolojisi üzerinde önemli etkisi vardır. DMF, polistiren (PS) çözeltisine eklendiğinde, DMF'in yüksek dielektrik sabitine rağmen, boncuk oluşumu gözlenmiştir. Bu durum muhtemelen PS ve çözücü molekülleri arasındaki zayıf etkileşimden kaynaklanmaktadır [90].

2.2.6.2.ii. İşlem parametreleri

Elektro-ğirme jeti üzerinde uygulanan çeşitli harici faktörler, elektroğirme işlemini etkileyen diğer önemli parametrelerdir. Bunlar; uygulanan voltaj, akış veya besleme hızı, çözelti sıcaklığı, toplayıcı tipi, iğne çapı ve toplayıcı ile iğne ucu arasındaki mesafe olarak adlandırılmaktadır. Bu parametreler, çözelti parametrelerinden daha az öneme sahip olmalarına rağmen, fiber morfolojisi üzerinde kesin etkiye sahiptirler.

Voltaj: Elektroeğirmede çok önemli bir faktör, çözeltiye uygulanan yüksek voltajdır. Çözeltiye uygulanan yüksek voltaj, çözeltideki uyarılmış yükler ve harici elektrik alan ile beraber çözelti içerisindeki elektrostatik kuvvetlerin yüzey gerilimini yenmesiyle elektroeğirme işlemini başlatır. Genel olarak, pozitif veya negatif 6 kV'un üzerindeki voltaj değerlerinde, iğne ucundaki damla, Taylor konisi biçimini almaktadır [91]. Çözeltinin akış hızına bağlı olarak, Taylor konisinin kararlı olabilmesi için yüksek voltaj gerekmektedir. Elektroeğirme jetindeki kulombik itici kuvvet, viskoelastik çözeltiyi esnetmektedir. Eğer uygulanan voltaj yüksekse, oluşan yoğun yük, iğne ucundan daha fazla hacimde çözelti çıkmasına ve oluşan jetin hız kazanmasına neden olmaktadır. Bu durum daha küçük ve daha az kararlı Taylor konisi oluşumuna neden olabilmektedir [70]. Uygulanan voltaj yeterli akış hızından fazlaysa, oluşan Taylor konisi iğne içerisine geri çekilebilmektedir [78].

Uygulanan voltaj ve oluşan elektrik alan, jetin esnemesi ve hızlanmasında ve oluşan fiber morfolojisi üzerinde etkilidir. Pek çok durumda, yüksek voltaj, güçlü elektrik alan kadar jet üzerindeki yüksek kulombik etkilere bağlı olarak, çözeltide büyük esnemeye neden olur. Bu durum fiber çaplarında azaltıcı etki yaratır [67, 71, 92] ve bunun yanısıra çözücü buharlaşmasını hızlandırarak daha kuru fiber üretimine olanak sağlar [93]. Düşük viskoziteli çözeltiler için yüksek voltaj, elektroeğirme sırasında ikincil jet oluşumuna neden olabilir. Bu durum fiber çapının azalmasında etkilidir [77]. Bir diğer faktör olan elektro-eğirme jetinin uçuş zamanı da fiber çapını etkileyebilmektedir. Daha yüksek uçuş zamanı, fiberler toplayıcıda toplanmaya başlamadan önce onlara esnemek ve uzamak için fazladan süre tanır. Böylece, düşük voltajda, zayıf elektrik alan nedeniyle yavaşlayan jetten, elektroeğirme uçuş zamanının yükseltilmesiyle daha ince fiber üretimi gerçekleştirilebilir. Bu durumda, elektro-eğirme kritik voltajına yakın voltaj kullanılarak daha ince fiber üretimi mümkün hale gelebilir [81].

Yüksek voltaj değerlerinde, boncuk oluşumuna daha yüksek eğilim görülmektedir [70, 77, 78]. Ayrıca voltajın yükselmesine bağlı olarak boncuk şeklinin iğ benzeri şekilden küresel hale dönüştüğü belirlenmiştir [70]. Yüksek voltaja bağlı olarak jet üzerinde artan esneme, daha az boncuk oluşumuna neden olabilmektedir. [76]. Yüksek voltaja bağlı olarak, Taylor konisinin yetersizliği nedeniyle jet

kararsızlığının artması sonucu boncuk yoğunluğunun artmasına neden olabilir [70, 78]. Bir diğ er ilginç gözlem, voltaj arttıkça boncuk yoğunluğunun artması ve hatta boncuk yapılarının fiber yapılarına katılarak daha kalın fiberler oluşturmalarıdır [94].

Yüksek voltaj sadece fiberlerin fiziksel görünümünü değıil, aynı zamanda polimer fiberlerinin kristalinitesini de etkiler. Elektroeğıirme sırasında oluşan elektrostatik alan polimer moleküllerini daha sıralı hale getirerek, fiberlerde yüksek kristaliniteye neden olur. Fakat, belli bir voltaj değıerinin üzerinde, fiber kristalinitesi artar. Voltaj arttıkça aynı zamanda fiberlerin hızlanması da artar, bu durum da elektroeğıirme jetinin uçuş süresini kısaltır. Polimer molekülleri uygun şekilde hizalanabilmek için belli bir s reye ihtiyaç duymaktadırlar. Bu nedenle fiberlere tanınan uygun uçuş süresi, yüksek voltajla birlikte fiber kristalinitesini arttıracaktır [81].

Elektroeğıirme jeti üzerinde voltaja bağıli olarak yükler oluştuğıunda, bu yükler jetin alacağı yolu değıiştirecek şekilde bir harici elektrik alandan etkilenebilirler. Elektroeğıirme jetinin kaynağı ile toplayıcı arasındaki elektrik alan profilini değıiştirerek, elektroeğıirme jeti kontrol edilebilir.

Bu harici etkilenme, yardımcı elektrod kullanılarak toplayıcının yönelim veya şeklinin değıiştirilmesiyle aşılabilir. Hizalanmış hatta desen kazandırılmış nanofiberler elektrik alanın amaca uygun değıiştirilmesiyle elde edilebilmektedir.

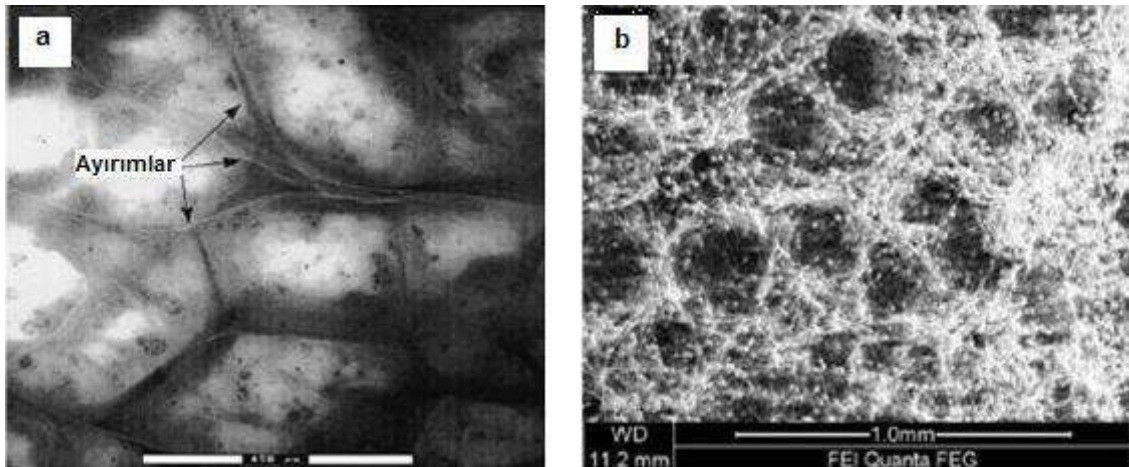
Akış hızı: Akış hızı, elektroeğıirme işlemi için uygun polimer  z ltisi miktarını tanımlar. Kararlı bir Taylor konisi oluşumu sağılandığı noktada, verilen voltaj değıeri için uygun bir akış hızı vardır. Akış hızı yükseltildiğinde bu yükselişe bağıli olarak fiber çapında yada boncuk büyüklüğünde orantılı bir artış meydana gelmekte ve şıringa ucundan yüksek hacimli  z lti çıkışı görünür hale gelmektedir [70, 95].

İğne ucundan yüksek hacimli  z lti çıkışına bağıli olarak, jetin kuruma süresi artacaktır. Sonuç olarak, fiberlere tanınan uçuş süresi, üzerlerindeki  z c n n buharlaşması için yeterli olmayacaktır. Geriye kalan üzücü fiberleri eriterek

birbiriyle bağlantılı bir ağ formuna gelmelerini sağlamaktadır. Düşük akış hızı, çözücü buharlaşmasına daha fazla zaman tanınması bakımından daha çok istenilen bir durumdur [96].

Toplayıcı etkisi: Elektroeğirme işlemi sırasında şırınga ucu veya kaynak ile toplayıcı arasında bir elektrik alan oluşmaktadır. Birçok elektroeğirme düzeneğinde alüminyum folyo gibi iletken bir malzemeden yapılan toplayıcı plaka, kaynak ile toplayıcı arasında kararlı bir potansiyel farkı oluşturacak şekilde elektriksel olarak topraklanmıştır. Toplayıcı olarak yalıtkan bir malzeme kullanıldığında, elektroeğirme jeti üzerindeki yükler hızla yığılmakta ve sonuç olarak daha az fiber birikimi olmaktadır [97, 98]. Fiberlerin iletken malzeme üzerinde birikme yoğunluğu yalıtkan malzemeye göre daha fazladır. Buna bağlı olarak, toplayıcı üzerinde yığılan yüklere ait itici kuvvetlerin daha fazla fiber toplanmasına neden olduğu görülmüştür. İletken toplayıcıda, fiber üzerindeki yükler daha fazla fiberin toplayıcı tarafından çekilmesini sağlamak üzere dağılmıştır. Sonuç olarak, fiberler birbirilerine yakın toplanmaktadır [98].

Yalıtkan toplayıcıda, benzer yüklerin sahip olduğu itici kuvvetler, 3 boyutlu fiber yapısı oluşumuna neden olmaktadır. Yüklerin uygun yoğunlukla toplandığı başlangıç ağ yapısında, ortaya çıkan itme kuvveti bal peteği şeklinde bir toplanmaya neden olabilir [78] (Şekil 2.13-a).



Şekil 2.13. Yalıtkan toplayıcı üzerinde fiberlerin bal peteği şeklinde toplanması (a), yalıtkan hale gelen fiberlerin çukur yapılar oluşturması (b).

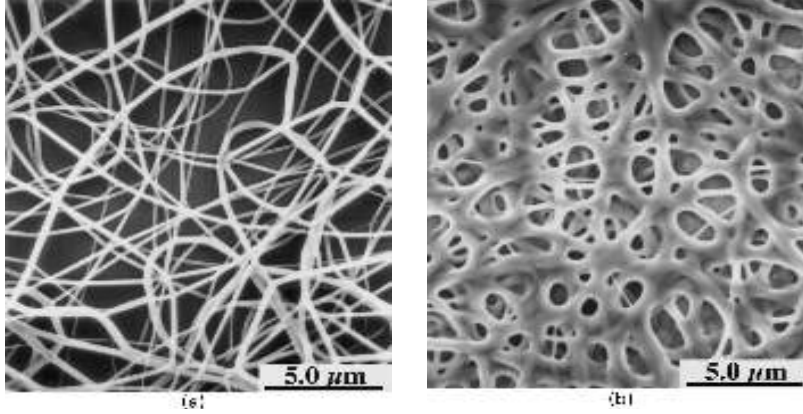
Fakat, toplayıcı iletken olsa bile, fiberler yüksek toplanma oranına ve yeterli ağ kalınlığına ulaştığında, geride kalan yüklerin birikiminden dolayı polimer fiberleri yalıtkan hale gelir. Bu durum fiber ağları üzerinde çukur yapılar oluşmasına neden olabilir [99] (Şekil 2.13-b).

Toplayıcının durağan veya hareketli olması elektroegirme işlemini etkilemektedir. Döner toplayıcı, fiberleri hizalanmış olarak toplamak için kullanılır, ayrıca üretilen fiberlerin kurummasına yardım ettiği görülmüştür. Bu toplayıcılar özellikle, DMF gibi kaynama noktası yüksek çözücüler için kullanışlıdır, böylece fiberler toplayıcı üzerinde ıslak kalmamaktadır. Döner toplayıcılar buharlaşma için çözücüye fazladan zaman tanımakta [90] ve ayrıca fiberlerin üzerindeki çözücünün buharlaşma oranını arttırmaktadır. Bu nedenle, bu tip toplayıcıların fiber morfolojisi üzerinde olumlu etkileri olmaktadır.

Pipet kılcalı veya iğne çapı etkisi: İğne veya pipet kılcalının iç çapının elektroegirme işlemi üzerinde mutlak bir etkisi vardır. Küçük çaplı iğnenin tıkanmaya bağlı olarak boncuk oluşumuna neden olduğu bulunmuştur [100]. İğne çapının azalması, oluşan fiber çapında azalmaya neden olmaktadır. İğne ucundaki damlanın hacmi azaldığında, damlanın yüzey gerilimi artmaktadır. Aynı voltaj değerinde, jet oluşumunun sağlanabilmesi için daha yüksek kulombik kuvvetlere ihtiyaç bulunmaktadır. Sonuç olarak, elektroegirme jetinin hızı düşmekte, bu da çözeltiye, toplayıcıya gitmeden önce, gerilmesi ve uzaması için daha fazla zaman tanımaktadır. İğne çapının çok küçük olduğu durumlarda, iğne ucundan çözelti damlasının çıkışı mümkün olmayabilmektedir [81].

İğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe: Fiber jetinin uçuş süresi yani aldığı yol, elektrik alanın gücü kadar elektroegirme işlemi ve sonucunda oluşan fiberler üzerinde etkili olmaktadır. İğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafenin değişmesi, uçuş süresi ve elektrik alan gücünü doğrudan etkilemektedir. Birbirinden bağımsız fiberlerin oluşabilmesi için, elektroegirme jetinin üzerindeki çözücünün buharlaşabileceği yeterlilikte süre geçmelidir. İğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe kısaldığında, jet toplayıcıya ulaşana kadar daha kısa bir mesafe

taramaktadır. Ayrıca, elektrik alan gücü arttığında aynı zamanda jetin toplayıcıya doğru giderken sahip olduğu hız da artmaktadır. Sonuç olarak, çözücünün buharlaşmasına fırsat kalmadan fiberler toplayıcıda birikmektedir. Mesafe çok düşük olduğunda, aşırı çözücü, fiberlerin kaynaşmasına neden olmaktadır. Şekil 2.14’de fiberler arası bağlantılar görülmektedir [67]. Birbiriyle bağlantılı bu fiberler, oluşan iskeleye fazladan mekanik dayanım kazandırabilmektedir.



Şekil 2.14. Nylon 6,6’nın (a) 2 cm toplanma uzaklığı ve (b) 0.5 cm toplanma uzaklığındaki SEM görüntüleri [67].

Polimer çözeltisinin özelliğine bağlı olarak, mesafenin değişmesinin fiber morfolojisi üzerinde önemli bir etkisi olmayabilir. Bazı durumlarda, mesafenin değişmesi fiber çapını etkilememektedir. Fakat mesafe çok kısa olduğunda boncuk oluşumu gözlemlenmektedir [71]. İğne ucu ile toplayıcı arasındaki elektrik alan şiddetinin artmasının sonucu boncuk oluşumu görülebilmektedir. Elektrik alan şiddetini arttırmada, mesafeyi azaltmak, voltajı arttırmakla aynı etkiyi yapmaktadır. Daha önceki çalışmalarda, elektrik alan şiddeti çok fazla olduğunda, elektroeğirme jetinin kararsızlığının arttığı ve bu durumun da boncuk oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir [70, 78]. Fakat mesafe, elektrik alan şiddeti gibi optimum bir değerde olursa, elektrostatik alanın polimer jetine sağladığı uygun esneme kuvveti sayesinde daha az boncuk oluşumu gözlenmektedir [76]. Diğer koşullarda, mesafeyi arttırmak, ortalama fiber çapında düşüşe neden olmaktadır [101]. Daha uzun mesafe, polimer jetinin toplayıcıya ulaşmadan önce yeterli miktarda

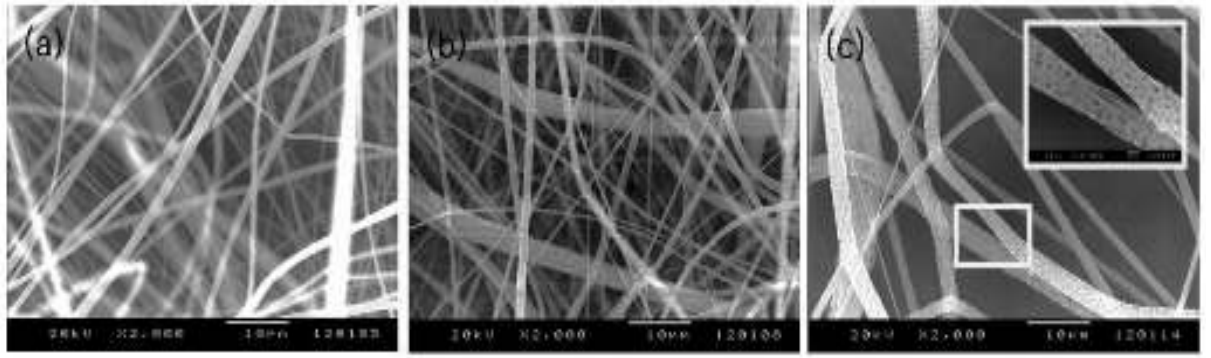
esneyebilmesi için gereken daha uzun uçuş süresini ifade etmektedir [79, 81]. Fakat, uzun mesafenin olduğu durumlarda fiber çapı da artmaktadır. Bunun nedeni elektrik alan şiddetinin düşmesiyle birlikte, fiberlerin elektrik alanın etkisi altında daha az esnemesinden kaynaklanmaktadır [92]. Mesafe çok geniş olduğunda, toplayıcıda fiber toplanmamaktadır [81]. Bu nedenle fiber çapını azaltacak miktarda polimer çözeltisinin esnemesini arttıran optimum bir elektrik alan şiddetine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2.6.2.iii. Çevresel parametreler

Elektroeğirme jeti üzerinde çevresel şartların etkisi konusunda çok az araştırma yapılmıştır. Ortam ile polimer çözeltisi arasındaki herhangi bir etkileşim, fiber morfolojisi üzerinde etkili olabilmektedir. Örneğin, yüksek nem oranı fiberlerin yüzeyinde gözenek oluşumuna neden olabilmektedir. Elektroeğirme bir harici elektrik alandan etkilendiği sürece, elektroeğirme ortamında oluşabilecek herhangi bir değişim, aynı zamanda elektro-eğirme işlemini etkileyecektir.

Sıcaklık: Çözeltinin sıcaklığı, çözücünün buharlaşma oranının yükselmesine böylelikle polimer çözeltisinin viskozitesinin artmasına etki etmektedir. Poliüretan yüksek sıcaklıklarda elektroeğirildiğinde, daha fazla oranda birbirine yakın çaplara sahip (uniform) fiberler elde edilmektedir [77]. Bu durum, çözeltinin düşük viskozitesine ve polimerin çözücü içerisinde çözünürlüğünün büyük oranda artmasına bağlı olarak, polimer jetinin elektrik alan içerisinde daha esnek hale gelmesi olarak açıklanabilmektedir. Düşük viskozitede, kulombik kuvvetler çözelti üzerinde yüksek esneme kuvveti yaratarak daha küçük çaplı fiberlerin eldesini mümkün kılmaktadır [73]. Polimer moleküllerinin hareketliliğinin artmasına bağlı olarak sıcaklık artışı, kulombik yüklerin çözeltiyi daha fazla esnetmesine yardımcı olmaktadır. Fakat enzim ve protein gibi biyolojik moleküllerin elektroeğirme çözeltisine eklendiği durumlarda, yüksek sıcaklık bu moleküllerin fonksiyonelliklerini kaybetmelerine neden olabilmektedir.

Nem: Elektroeğirme ortamının nemliliği, elektroeğirme sırasında polimer çözeltisini etkileyebilmektedir. Elektroeğirme işlemi, yüksek nem oranında, normal atmosfer basıncı altında fiber yüzeyi üzerinden suyun yoğunlaşmasına benzer şekilde gerçekleşmektedir. Özellikle polimer çözeltisi için uçucu bir çözücü kullanıldığı durumlarda, buharlaşma fiber morfolojisi üzerinde etkili olabilmektedir [71, 102]. Polisülfonun (PS) tetrahidrofuran (THF) içerisindeki çözeltisi kullanılarak yapılan deneylerde, nem oranı %50'nin altında olduğunda fiber yüzeylerinin düz olduğu gözlemlenmiştir. Fakat, elektroeğirme sırasında artan nem oranı, fiber yüzeyleri üzerinde dairesel gözeneklere neden olmaktadır [103] (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. %2.5'luk PLDLA çözeltisinin nem oranının fiber morfolojisi üzerindeki etkisi (akış hızı= 0.005mL/min, voltaj= 20kV): (a) %30 nem oranı, (b) %50 nem oranı, (c) %70 nem oranı.

Çevrenin nem oranı çözelti içerisindeki çözücünün buharlaşma hızıyla ters orantılı olarak ifade edilmektedir. Düşük nem oranında, uçucu çözücü çok hızlı buharlaşmaktadır. Çözücünün buharlaşması, iğne ucundaki çözücünün uzaklaşmasından daha hızlı olmaktadır. Sonuç olarak, elektroeğirme işlemi, iğne ucu tıkanmadan önce birkaç dakika içerisinde gerçekleşmektedir [71].

Nem oranının yalıtkan yüzeyler üzerindeki elektrostatik yüklere etkisi yaygın olarak araştırılmaktadır. Bakır boru üzerine toplanan cam partiküllerle yapılan çalışmalarda, yüksek bağıl nemde (>%76) partiküller üzerinde yüke rastlanmamıştır. Nemin azalmasıyla, partiküller üzerinde yüksek yük artışı görülmüştür [104].

Yüksek nem oranının fiberlerin deşarj olmasına yardım ettiği öne sürülmektedir [105, 106]. Fakat, nem oranının, toplanan fiberler üzerindeki yük birikimi ve elektroëirme süresince oluşan elektriksel deşarj üzerine etkisini tanımlayabilmek için daha fazla test yapmak gerekmektedir.

Atmosfer Tipi: Elektroëirme ortamındaki hava bileşiminin elektroëirme işlemi üzerine etkisi bulunmaktadır. Farklı gazlar, yüksek elektrostatik alan içerisinde farklı davranış göstermektedirler. Örneğin, helyum yüksek elektrostatik alan altında parçalanarak, elektroëirme işlemi imkansız hale getirmektedir. Fakat, Freon®-12 gibi yüksek parçalanma voltajına sahip bir gaz ortamında, hava ortamıyla aynı koşullar sağlandığında iki farklı çapa sahip fiberler elde edilmektedir [75].

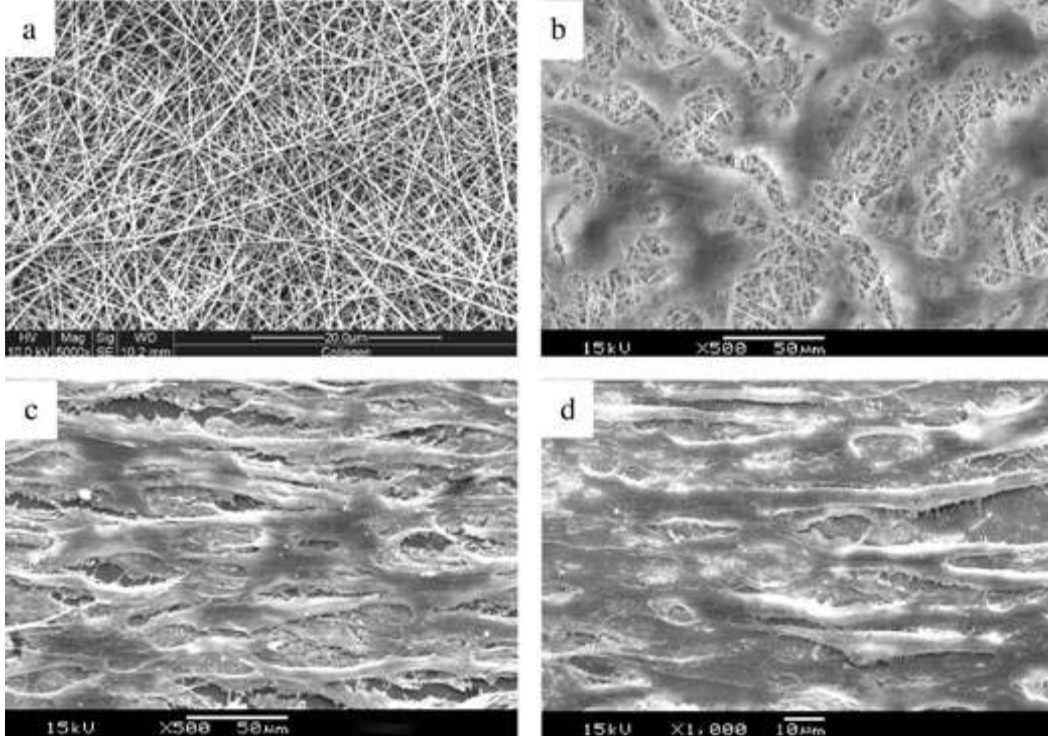
Basınç: Kontrollü ortam koşullarında, basıncın elektroëirme jeti üzerine olan etkisini incelemek mümkündür. Genel olarak, elektroëirme jeti etrafındaki basıncın düşmesi elektroëirme işlemi olumsuz yönde etkilemektedir. Söz konusu basınç, atmosferik basıncın altına düştüğünde, şırınga içerisindeki polimer çözeltisi iğne ucundan dışarıya akma eğilimi gösterir ve bunun sonucunda kararsız jet oluşumu meydana gelmektedir. Basınç azaldığında iğne ucundaki çözeltide hızlı baloncuk oluşumu gözlenmektedir. Çok düşük basınç altında, elektriksel yüklerin boşalmasına bağlı olarak elektroëirme işleminin gerçekleşmesi mümkün olmamaktadır.

2.2.6.3. Elektroëirme yöntemi ile yapılan deri doku mühendisliği çalışmaları

Elektroëirme işlemi, sentetik ve doğal biyomalzemelerden derinin doku matrisine daha yakın doku iskelesi üretimi için kullanılmaktadır. Elektroëirme ile üretilmiş nanofibröz membranlar, yara örtüsü alanında potansiyel malzeme olarak gösterilmektedir. Nanofibröz membran, ıslak yara yüzeyine herhangi bir sıvı birikimi olmadan homojen bir şekilde yapışmaktadır [107]. Elektroëirme ile üretilmiş nanofibröz membran şeklindeki yara örtüsü, yüksek gaz geçirgenliğine sahiptir, bununla birlikte yarayı enfeksiyondan ve dehidrasyondan korur.

İdeal yara örtüsü üretiminin en önemli hedefi, yüksek gözenekliliğe ve iyi bir bariyer olma özelliğine sahip bir membran elde etmektir. Bu hedefe ulaşmak için, yara örtüsü malzemeleri dikkatle seçilmelidir ve yapının iyi bir bariyer özelliğine sahip olduğundan ve oksijen geçirgenliğinden yapılan kontroller sonucunda emin olunmalıdır. Nanofibröz membranlar yara örtüsü olarak kullanıldığında, yara iyileşmesinin son safhası olan epitelizasyon hızı artmakta ve dermis iyi bir şekilde organize olmaktadır [49]. Poliüretanın doğasında var olan özellikler ve nanofiber gözenekliliğine bağlı olarak su kaybı kontrol edilebilmekte, mükemmel oksijen geçirgenliği sağlanmakta ve sıvı boşaltımı düzenlenmektedir.

Sentetik ve doğal polimerlerin fiziksel birleşmesi, fibroblastlar için uygun bir malzeme niteliği taşımaktadır [108]. PCL, kollajen tip I ve kollajen tip I kaplanmış PCL nanofiberler doku yenilenmesi için elektroeğirme yöntemi ile üretilmiştir. Biyobozunur polikaprolakton (PCL) kollajen ile kaplandığında elde edilen doku iskelesinin mekanik bütünlüğü artmaktadır. Bu çalışmada, normal insan derisinden alınan fibroblastlar, üç farklı nanofiber doku iskelesine de bağlanıp yayılmıştır, fakat hücreler ile nanofiber matrisler arasındaki etkileşim iskelenin malzemesi ile değişiklik göstermektedir. Örneğin, kollajen nanofiber doku iskeleleri kontrol kültüre göre oldukça yüksek oranda fibroblast çoğalması göstermektedir. Aksine, PCL fiberler kontrol kültürden oldukça düşük hücre çoğalması göstermektedir. Hücrelerin normal morfoloji ve yoğunluk gösterdiği gruplar, kontrol kültür ve kollajen nanofiberlerdir. PCL nanofiberlerin hücre üremesini desteklediği, fakat kollajen kaplı PCL nanofiberlerle karşılaştırıldığında yeterli hücre yoğunluğuna ulaşamadığı görülmüştür. Sonuç olarak, PCL nanofiberlerin deri fibroblastlarının üremesini kısmen desteklediği, iskele üzerindeki kollajenin ise hücrelerle nanofiberler arasındaki etkileşimi yüksek oranda arttırdığı görülmüştür. Kollajen kaplı PCL kompozit nanofibröz iskele kullanmanın amacı, kollajen tip I'ın deri fibroblastları için sağladığı uygun biyolojik ortam ile PCL'in doku iskelesi için sağladığı mekanik bütünlüğü birleştirmektir. Bu nedenle, elektroeğirme ile üretilmiş nanometre boyutlu fiberler deri yenilenmesi için gerekli potansiyel doku iskelesi görevi görmektedirler.



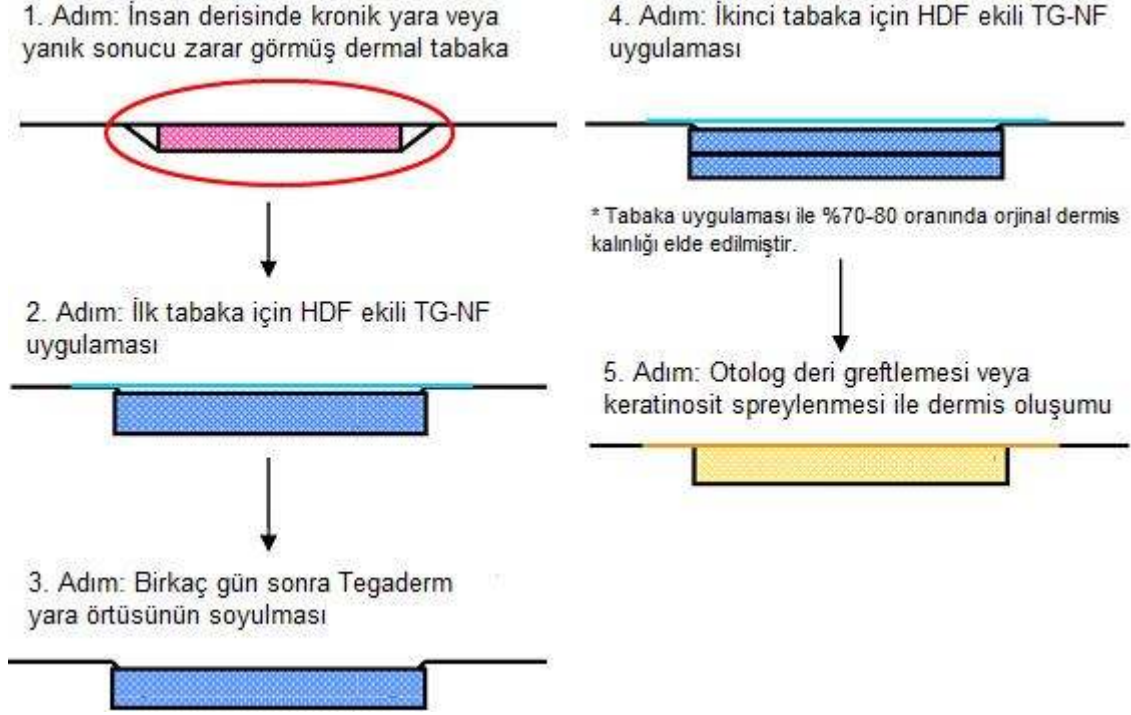
Şekil 2.16. Nanofibröz doku iskeleleri üzerinde 6. gün sonunda insan dermal fibroblastı (HDF) kültürü SEM görüntüleri, (a) PCL-kollajen karışımı nanofibröz doku iskeleleri, (b) PCL nanofiberleri üzerinde HDF hücreleri, (c) PCL-kollajen karışımı nanofiberleri üzerinde HDF hücreleri, (d) Kollajen nanofiberleri üzerinde HDF hücreleri.

Doku mühendisliği iskeleleri, yara bölgesi üzerinde yeni doku oluşana kadar geçen sürede bozunma eğilimi göstermelidir. Hücre etkileşimi çalışmalarında fibroblastlar kollajen nanofibröz doku iskelelerinin içerisine göç etmişler ve dermal yapıya yakın bir morfoloji göstermişlerdir (Şekil 2.16).

Chong ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise, PCL-jelatin karışımı nanofibröz doku iskeleleri kullanılmıştır [5]. Poliüretan bir membran olan Tegaderm™ epidermal tabaka olarak kullanılmış, dermal tabaka olarak kullanılan nanofibröz doku iskelelerine ise çift taraflı HDF hücre ekimi gerçekleştirilmiştir.

Şekil 2.17.'de görülen otolog tabakalı dermal oluşum yaklaşımında ise HDF ile kültüre edilmiş Tegaderm-nanofibröz yapılar kronik yara veya yanık olan bölgeye yerleştirilir, birkaç gün sonra Tegaderm çıkarılarak, HDF ile kültüre edilmiş yeni bir

Tegaderm-nanofibröz yapı defekt üzerine konulur, üzerine de fibrin yapıştırıcı ile beraber otolog deri grefti konulur veya otolog keratinosit kültürü spreyleneir.



Şekil 2.17. Otolog tabakalı dermal yenilenme yaklaşımının şematik gösterimi.

Sonuç olarak elde edilen yapı çift taraflı fibroblast kültürü ve tek tabaka keratinosit kültürü içerdiğinden ve deri kalınlığına yakın olduğundan derinin yeniden düzenlenmesini ve ideale yakın yara iyileşmesini sağlamaktadır.

2.2.7. Deri Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler

Doku mühendisliğinin en önemli bileşenlerinden biri olan hücreler, kullanılacağı dokuya uygun morfolojide ve gen ekspresyonunda seçilmeli, orjinal dokunun fonksiyonlarını destekleyebilmelidir. Doku mühendisliği için birçok farklı hücre kaynağı bulunmaktadır. Her bir hücre kaynağının kendine göre avantajları ve dezavantajları mevcuttur. En çok kullanılan yöntem hastadan hücre izole edip bu hücreleri in vitro koşullarda çoğaltmaktır [16]. Hastanın kendisinden alınan bu hücrelere **otolog hücreler** adı verilmektedir. Bu hücrelerin transplantasyonu sonrasında immün cevaba neden olmadığı için, işlem sonrasında immün supresif ilaç kullanımına gerek kalmamaktadır. Fakat az sayıda hücrenin izole edilebilmesi ancak belli bir bölgenin tedavisine olanak sağlamaktadır. Sağlam dokudan alınan hücrelerin oluşturduğu alanda ikinci bir hasar meydana gelmektedir. Ayrıca, ileri yaşta olan hastalardan alınan otolog hücreler yavaş bölündüklerinden transplantasyon için uygun olmamaktadırlar.

Bir diğer alternatif, insan veya farklı cins hayvan donörlerden alınan hücrelerdir. Birçok doku için insan verici bulmak mümkün değildir, bu nedenle genellikle kontrolleri yapılmış kadavra hücreleri veya dokuları kullanılmaktadır [109]. **Allojenik hücre** olarak adlandırılan ve farklı bireylerden elde edilen bu hücreler immün cevaba ve hastalık geçişine neden olabilmektedir. Bu nedenle, **zenojenik hücre** kullanımı yaygınlaşmıştır. Zenojenik hücrelerin kaynağı farklı türdeki canlılardır. Bu hücrelerin kullanımındaki en önemli dezavantajlar, immün cevap oluşturmaması, hayvansal kaynaklı hastalık ve virüs geçişine yol açması, etik açıdan uygun bulunmaması olarak gösterilebilir [110].

Bir başka hücre kaynağı olan öncü ve/veya kök hücrelerin kullanımı, doku mühendisliğindeki gelişmelere ışık tutacak niteliktedir. Farklılaşmış olan öncü hücreler belli bir dokuya ait fenotipe sahiptir. **Kök hücreler** ise sınırsız bölünebilme, kendini yenileyebilme ve birçok farklı fenotipe dönüşebilme özelliğine sahip hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler, kemik iliği ve kordon kanından elde edilen kök hücreler, günümüzde bilinen üç temel kök hücre kaynağıdır.

Embriyonik kök hücreler, implantasyon öncesi erken gelişim döneminde blastosist aşamasına ulaşmış embriyolardan elde edilirler [111]. Totipotent özellikte olan bu hücreler, tüm yetişkin hücre tiplerine farklılaşma özelliğine sahiptir. **Yetişkin kök hücreler** olarak adlandırılan kemik iliği ve kordon kanından elde edilen kök hücreler, pluripotent özellikte olup sınırlı sayıda hücre tipine farklılaşabilmektedirler [112]. Embriyonik kök hücrelerin sınırlı sayıda elde edilebilmesi ve bu hücrelerin kullanımındaki etik sınırlamalar, yetişkin kök hücrelerin kullanım alanını arttırmaktadır. Kök hücrelerin istenen vücut hücresine dönüşmesini sağlayan farklılaşma faktörleri her hücre tipi için henüz belirlenmemiş olduğundan bu konudaki çalışmalar hızla devam etmektedir [113] .

Doku mühendisliğinde en sık kullanılan hücre kaynaklarından biri de **hücre hattı** olarak adlandırılan insan veya hayvan hücrelerinden izole edildikten sonra uygun kültür koşullarında istenilen fenotipe erişene kadar pasajlanan hücrelerdir [114]. Hücre hatları, **sınırlı ömürlü hücre hatları** ve **devamlı hücre hatları** olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Sınırlı ömürlü hücre hatları, adından da anlaşılacağı gibi sınırlı replikasyon yeteneğine sahiptir. Devamlı hücre hatları ise sonsuz replikasyon yeteneğine sahip olup tümör kökenli olduklarından güvenli olup olmadıkları halen sorgulanmaktadır. Hücre hatları da farklı kaynaklardan elde edildikleri için immün cevaba neden olmaktadır. Dünyada hücre hatlarını üreten ve saklayan birçok hücre bankası bulunmaktadır ve bu hücre bankalarından birçok farklı tipte hücrenin temini mümkündür. Bu nedenle hücre hatları doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

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

Epidermis onarımı için, epidermis yapısında da yer alan keratinosit ve deriye melanin pigmenti sağlayan melanosit hücreleri kullanılmaktadır. Epidermis onarımı

için daha çok allojenik veya zenojenik keratinositler, dermis onarımı için allojenik veya zenojenik fibroblastlar kullanılmaktadır.

Keratinosit, pigment üreten melanosit ve fibroblastların normal vücut hücrelerinden veya kanserli deri dokularından elde edilen hücre hatları da amaca göre kolay temin edilebilir olduklarından deri doku mühendisliği ve yara örtüsü uygulamalarında sıkça kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda kullanılan hücre hatlarından bazıları; normal vücut hücrelerinden elde edilen 3T3 (fare fibroblastı), L929 (fare fibroblastı), insan dermal fibroblastı (HDF) olarak sıralanabilir [5, 108, 115, 116]. Bu hücre hatları, hücre-polimerik matris etkileşimlerini gözlemleyebilmek için deri doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar.

2.2.8. Deri Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyosinyaller

Biyosinyaller, hücre bölünme ve çoğalmasını uyaran ve organizmada önemli işlevleri bulunan çeşitli proteinlerin sentezine yol açabilen polipeptidlerdir. Normalde durgun olan hücrelerde mitoz bölünmeyi başlatma yetenekleri vardır. Bu maddeler genel olarak, trombositler, makrofajlar, epitel hücreleri, fibroblastlar ve endotel hücreleri tarafından sentezlenip, salgılanmaktadır. Hedef organlarda etkilerini özel reseptörleri aracılığı ile başlatmaktadırlar. Son yıllarda büyüme faktörleri yara iyileşmesini hızlandırıcı etkilerinden yararlanabilmek için yoğun olarak araştırılmaktadır. Bu amaçla incelenen başlıca büyüme faktörleri; transforme büyüme faktörü beta (TGF- β), platelet türevli büyüme faktörü (PDGF), bazik fibroblastik büyüme faktörü (bFGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF)'dir [117].

2.2.8.1. Biyosinyal türleri

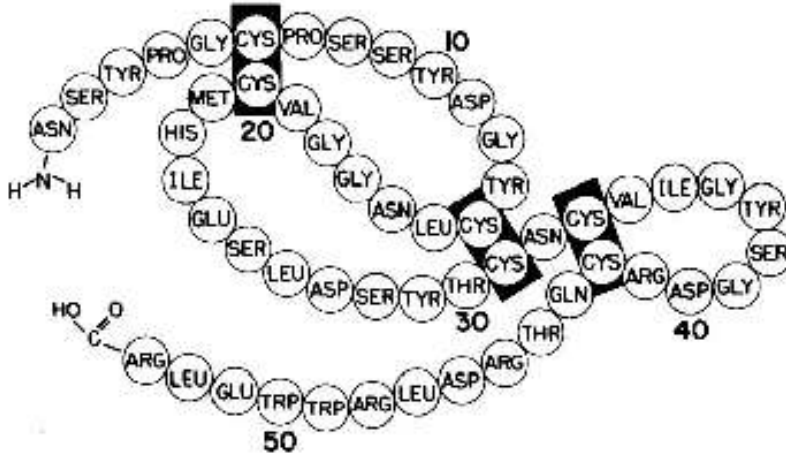
TGF- β (Transforme büyüme faktörü- β): Hücre gelişimi ve farklılaşmasını başlatan yada durduran bir polipeptittir. Çok sayıda değişik hücre tarafından sentezlenebilmektedir. Makrofajlar, fibroblastlar, keratinosit ve lenfositler TGF üreten başlıca hücrelerdir. Hemen hemen bütün hücreler TGF- β reseptörlerine sahiptir ve bu nedenle bu maddenin etkisine cevap verirler. TGF- β , fibroblast uyarımı dışında, inflamatuvar hücreler için güçlü kemotaktik etki gösterir. Ayrıca, ekstraselüler matris yapımını da uyarmaktadır [117].

PDGF (Platelet türevli büyüme faktörü): Trombosit, makrofaj, vasküler endotelyum ve fibroblastlar tarafından üretilir. Isıya, pH değişikliklerine ve proteazlara karşı oldukça dayanıklıdır. Fibroblastlar, düz kas hücreleri ve inflamatuvar hücrelere oldukça güçlü bir kemotaktik ve mitojenik etki gösterir. Diğer önemli etkisi ise hiyaluronik asit ve fibronektin sentezini arttırmasıdır. Bu iki protein ekstraselüler matrisin önemli bileşenleridir. PDGF, kollajenaz yapımını da arttırmaktadır. Bilindiği gibi kollajenaz yara iyileşmesi için oldukça önemli bir enzimdir. PDGF rekombinant DNA teknolojisi ile in vitro olarak üretilerek kullanılmaktadır [117].

bFGF (Bazik fibroblast büyüme faktörü): FGF fibroblastlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve kondrositler tarafından üretilmektedir. Mezodermal ve nöro-ektodermal kökenli hücreler için mitojenik etkiye sahiptir. Endotel hücrelerinde bölünmeyi uyarıcı etkisi ile anjiyogeneizde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, fibroblastlar, keratinosit, kondrosit ve miyoblastları uyarıcı etkiye sahiptir. Bu etkileri ile yara iyileşmesinde önemli roller üstlendiği açıktır [117].

Tez çalışması kapsamında kullanılan epidermal büyüme faktörü, konunun devamında ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

EGF (Epidermal Büyüme Faktörü): Epidermal Büyüme Faktörü ilk kez 1962 yılında Dr. Stanley Cohen tarafından erkek fare submandibuler tükürük bezinden izole edilmiştir. Cohen, erkek fare submandibuler tükürük bezinde sinir büyüme faktörü (NGF) izole etmeye çalışırken, bu bezlerden elde ettiği ekstrenin yeni doğan farelere enjekte edildiğinde erken göz kapağı açılışına ve erken diş sürmesine neden olduğunu gözleyerek etken maddeyi izole etmiş ve epidermis gelişimini hızlandırıcı etkisi nedeni ile bu maddeye Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü, EGF) adını vermiştir [118, 119].



Şekil 2.18. EGF'in yapısı.

EGF birçok memeli türünün değişik doku ve vücut sıvılarında bulunan, 6.2 kDa moleküler ağırlığa sahip, 3 intramoleküler disülfid bağı içeren, 53 aminoasitten oluşmuş mitojenik bir polipeptittir [120] (Şekil 2.18). Subkütan yolla enjekte edildiğinde 48 aminoasitli şekle dönüşmekte ve etken hale gelmektedir. EGF, fare submandibuler tükürük bezinde sentezlenerek tübüler kanal hücrelerinde depo edilmektedir. Ancak farelerde submandibuler tükürük bezinin çıkarılması sonrasında plazma EGF düzeyinde herhangi bir değişikliğin olmaması EGF'nin organizmada başka bir yerde de sentezlendiğini düşündürmektedir [121].

EGF'nin Özellikleri: EGF, embriyogenezis, anjiyogenezis, doku ve vasküler sistemlerin onarımında büyük rol oynamaktadır [122]. Trombositler tarafından sentezlenen bu molekül yara iyileşmesinin erken evrelerinde yüksek miktarlarda bulunmaktadır. EGF'nin domuz yara modelinde ve tavşan korneasında epitelizasyonu hızlandırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, hayvan modellerinde yara gerilim kuvvetini de arttırdığı bildirilmiştir. EGF'nin bu etkisini, fibronektin gibi epitelial hücre göçünü uyaran maddelerin yapımını arttırarak sağladığı düşünülmektedir. Doğrudan kollajen sentezini arttırmamasına karşın, fibroblast sayısını arttırarak kollajen miktarını göreceli olarak yükseltmektedir [123].

EGF reseptörleri insan vücudunda idrar ve tükürüğe ek olarak mide, pankreas sıvısı, serebrospinal sıvı, seminal sıvı, göz yaşı, prostat sıvısı, süt ve kanda bulunmaktadır. EGF ayrıca birçok dokuda, özellikle karaciğer ve plasenta hücrelerinde bulunmakta ve epitelial ve mezotelial kökenli hücrelerde mitojenik özelliğe sahiptir [120, 124]. Pek çok hücre kültürü ortamında tanımlanan EGF reseptörleri nonepidermal orijinli olabilmektedir. EGF hücreye etkisini, reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirmektedir. Reseptörler fibroblastlarda, kornea ve lenste, ince bağırsak epitelinde, glia hücrelerinde, epitelial karsinoma hücrelerinde gösterilmiştir [120]. Reseptörleri ile birleşmesini takiben kuanizintrifosfat bağlanarak adenyilat siklaz ve tirozin kinazlar aktif hale gelir ve bu olay sonrasında hücre çoğalması hızlanır [119].

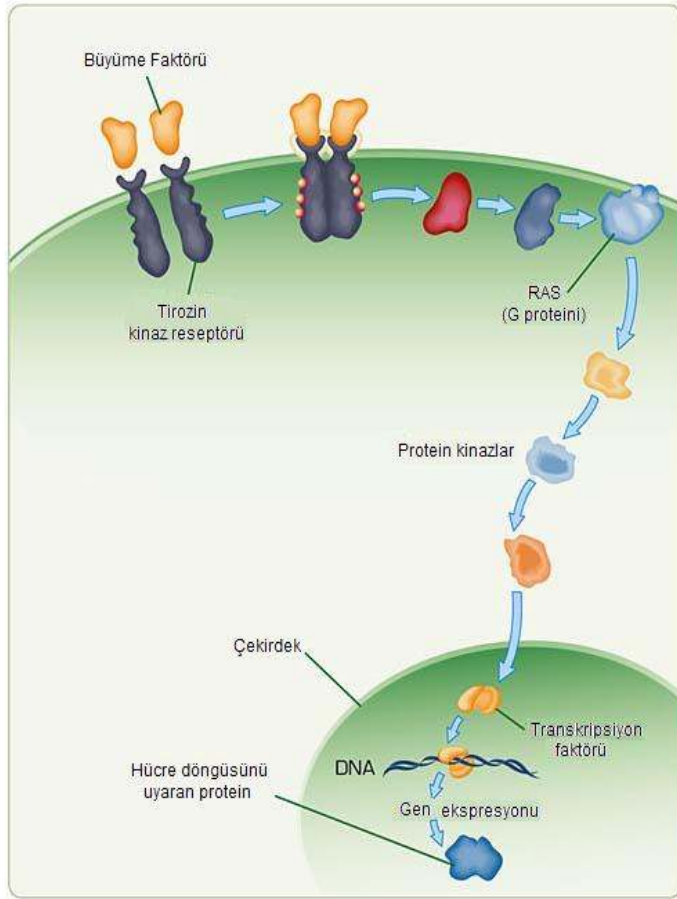
EGF endojen olarak insan submandibuler tükürük bezinden salgılanmaktadır. EGF birçok mezodermal ve ektodermal kökenli hücre için mitojenik özelliktedir. Etkili olduğu hücrelerde iyon alımını, glikolizi, DNA ve RNA ile protein yapımını arttırıcı özellik gösterir. EGF mide asit sekresyonunu da azaltmaktadır. EGF endojen olarak submandibular tükürük bezinden sentezlenerek tübüler kanal hücrelerinde depo edilir. Bu bezin çıkarılması ile plazma EGF düzeylerinde herhangi bir değişiklik olmaz. Bu durum EGF'nin organizmada ikinci bir sentez yerinin bulunduğunu düşündürmektedir [121]. EGF trombositlerde de bulunmaktadır. EGF, hücre kültürlerinde normal ve transforme hücrelerde hücre çoğalmasını arttırıcı etki göstermektedir. Korneal endotelial hücreler, fibroblastlar ve sinir

sistemi destek dokusu hücreleri üzerinde mitojenik aktiviteye sahip olan EGF en fazla mezodermal hücreler tarafından salgılanır [125].

EGF Sinyalizasyon Mekanizması: Büyüme faktörleri hücre bölünmesini ve büyümesini sağlarlar ve bunlar ilgili reseptörlerine bağlanarak bir takım hücre içi olayları başlatırlar. Bu etkilerini endokrin, otokrin ve parakrin mekanizmalarla yerine getirirler. Sonuçta hücre bölünmesini sağlarlar.

EGF, hücre çoğalmasını 170.000 daltonluk transmembran bir glikoprotein olan EGF reseptörüne bağlanarak yapmaktadır [126]. Glikoprotein yapısında olan bu reseptör hücre dışında kalan bölge, zar ve hücre içinde kalan bölgeler olmak üzere başlıca 3 bölgeden oluşmuştur. 621 amino asitli hücre yüzeyi bölgesi EGF bağlama bölgesidir. 542 amino asit içeren sitoplazmik bölge ise karboksil uç olup fosforile olabilme özelliğine sahiptir. Tirozin kinaz bölgesi 694. amino asitten başlayarak 250 amino asitlik bir bölgeyi kapsar. Diğer bir bölge ATP bağlama bölgesidir. Bu bölge tripsin ile muamele edildiğinde iki parçaya ayrılır. Hücre membranı dışında kalan ekstraselüler bölgede sistince zengin EGF bağlama bölgeleri bulunur, sitoplazma içerisinde plazma membranına yakın bölge treonin içerir ve protein kinaz ile fosforile olur, o bölgeyi ATP bağlama bölgesi takip eder. EGFR'nin aktivite bölgesinde ise diğer protein kinazlar ile benzer yapıdaki substrat bağlama bölgesi ve otofosforilasyon bölgesi bulunur [127].

Bir büyüme faktörü, hücre dışından, bir tirozin kinaz reseptörüne bağlanır. Bu da, fosfat gruplarının katılımıyla, membran proteinini aktive eder. Membran proteini de, kinazlar gibi sitoplazmik proteinleri uyarır. Etkileşim zincirinde çok sayıda başka protein de olabilir. Sonuç olarak, transkripsiyon faktörü çekirdeğe girerek, söz konusu faktör tarafında kontrol edilen genlerin ekspresyonunu uyarır. Bu örnekte RAS yolu gösterilmiştir ve hücre bölünmesiyle sonuçlanır (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. Büyüme faktörlerinin reseptörler üzerinden sinyalizasyon mekanizması.

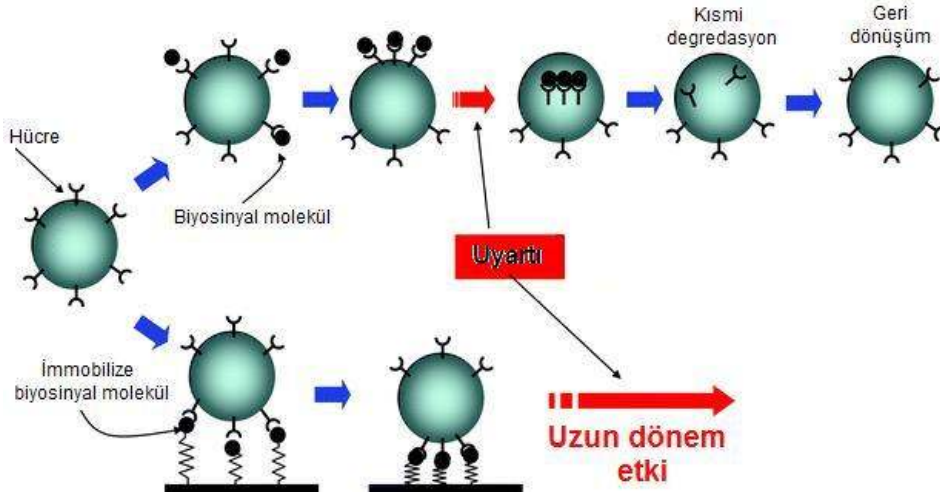
EGF reseptörleri hücrelerdeki normal gelişmeden sorumludurlar. EGF reseptörünün hem yapısal hem de fonksiyonel yönlerden transforme edici proteinlerle ilişkisi bulunmaktadır. Protein kinaz özelliği olan pek çok protein ve EGF reseptörü, proteinleri tirozin amino asitlerinden fosforile edebilme yeteneğine sahiptir. Bunlara örnek olarak src, erbB, fgr, ros, fms proteinleri verilebilir [127].

2.2.8.2. Biyosinyal immobilizasyon yöntemleri

Doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen doku iskelelerinin yüzeyi, hücreyle spesifik etkileşime girerek ekstraselüler matris (ECM) fonksiyonlarını yerine getirebilecek biyomimetik motifler içermelidir. Seçilen konakçı etkileşimlerini uyarabilmek ve biyolojik fonksiyonları veya spesifik hücre cevaplarını arttırmak amacıyla fonksiyonel moleküller, uygun immobilizasyon yöntemleriyle doku iskeleleriyle birleştirilmektedir [128]. Polimerik malzeme üzerine immobilize edilecek bu fonksiyonel moleküller protein yada proteinin hücre etkileşimini gerçekleştirecek olan birkaç amino asitlik bir bölümü olan peptid sekansı olabilmektedir. Protein immobilizasyonu en genel şekliyle kovalent ve kovalent olmayan immobilizasyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Kovalent olmayan yöntemler; elektrostatik etkileşim ile adsorpsiyon ve ligand-reseptör eşleşmesidir (biotin-avidin gibi). Kovalent olmayan adsorpsiyon, bazı ilaç salım uygulamalarında tercih edilmektedir. Bu yöntem yenilenebilir antimikrobiyal tekstiller için de uygundur. Biotin-avidin etkileşimi, bilinen en güçlü kovalent olmayan bağlanmadır [129, 130]. Fakat, kovalent bağlanma fonksiyonel polimer yüzeyi ve biyosinyal molekül arasında en kararlı bağ yapısını oluşturarak birçok avantaj sunmaktadır. Ayrıca biyosinyal moleküller polimerik malzeme üzerine kovalent olmayan yöntemlerle bağlandığında, bu moleküller hücre reseptörlerince hücre içine alınarak kısa sürede parçalanır, böylelikle biyosinyal moleküllerin stimülasyonları önemli ölçüde düşer. Bu olaya “Down Regulation” adı verilmektedir. Biyosinyal moleküller polimerik yüzeylere kovalent olarak immobilize edilerek hücre içerisine alınması önlenmiş olur [131, 132] (Şekil 2.20).

Biyomedikal alanda kovalent immobilizasyon biyosinyal molekülün yarı ömrünü uzatmak, metabolizmasını önlemek (lokal olarak kullanıldığında anti-tümör aktivite sağlayan bileşenin metabolize edildiğinde toksik olması gibi) veya vücut içi aygıtların (vasküler aygıtlar, şöntler veya kateterler gibi) biyoaktivitesinin devamını sağlamak üzere kullanılmaktadır.



Şekil 2.20. Kovalent immobilizasyon ile down regulation'ın önlenmesi.

Genel olarak polimerik yüzeyler üzerinde kovalent immobilizasyon:

- Yüzeyde fonksiyonel grup oluşturmak için ıslak kimyasallarla muamele,
- Organik polimer ile inorganik yüzeyi birleştirmek için, silan tek tabakaları kullanarak organosilanların yüzeye immobilizasyonu,
- Plazma ve koron yükleri ile yüzey modifikasyonu ve
- UV ışınları ile yüzey modifikasyonu olarak sıralanabilir [133].

Biyosinyal molekülleri polimerik yüzeylere immobilize etmek için en çok kullanılan yöntem ıslak kimya yöntemidir. Peptid veya protein olabilen biyosinyal moleküller malzeme yüzeyine, protein moleküllerini temsil eden nükleofilik N-terminali ve katı malzeme yüzeyini temsil eden diğer aktive edilmiş fonksiyonel gruplar aracılığı ile kararlı kovalent bağlarla bağlanır. Peptidler amin gruplarındaki N-terminalinin aktif hale gelmesiyle malzeme yüzeyine karboksil, hidroksil, epoksit ve aldehit grupları veya bağlayıcılarla birleşmiş diğer etkin sonlu gruplar üzerinden immobilize olabilmektedirler.

Biyomalzeme yüzeyindeki karboksilik asit fonksiyonel grupları, peptid bağlayıcı reaktifler kullanılarak aktive edilebilmektedir. Karbodiimidler, amin grupları ile karboksilik asitlerdeki (veya fosfatlar) amid bağı oluşumları arasında ilgi kuran heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılardır. Nükleofilleri aktive eden kararlı O-üre türevleri sayesinde, amin veya asit gruplarındaki peptid bağlarını üretmek için kullanılmaktadırlar. Karbodiimidler suda çözünebilen türevi 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC) veya organik olarak çözünebilen türevi N,N₀-disikloheksil-karbodiimid (DCC) olarak malzeme yüzeyine peptid immobilizasyonunda kullanılmaktadırlar.

Karbodiimid kimyası kararlı amid bağları ile karboksillenmiş çeşitli malzemeler üzerine biyomimetik peptidlerin kovalent olarak immobilizasyonunda kullanılan yüksek oranda verimli ve sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Ne yazık ki, bu bağlama yöntemi yüksek duyarlığa sahip değildir. Biyomimetik peptidler içerisinde istenmeyen yan tepkimelere neden olabilecek amino asit yan zincirler (karboksil ve guanidin grupları) olarak belirtilen reaktif fonksiyonel gruplar içermektedirler. N-hidroksisüksinimid (NHS) sıklıkla, yüzeyin karboksilik asit grupları ve NHS'in kondenzasyonu ile arada oluşan aktif ester bağları üzerinden karbodiimid bağlanmasına yardımcı olmak için kullanılmaktadır [134].

Polimerik yüzeylere fonksiyonalite kazandırabilmek için yüzeye kovalent olarak bağlanan biyolojik molekülün reaktif bölgelerinin yüzeye uyumlu olması gerekmektedir, yani biyoeşlenik kimyada yer alan tiyoller, aldehitler, karboksilik asitler, hidroksiller ve primer amin grupları gibi benzer fonksiyonel gruplar içermelidirler. Çok sayıda çapraz bağlayıcı ajanın geliştirilmesi eşlenik kimyalarının kullanım alanını genişletmektedir. Biyoaktif bileşenler gibi, çapraz bağlayıcılar da optimum pH değerleri, sıcaklıkları ve çözünürlükleri ile birbirlerinden ayrılmaktadır. Sözü edilen bu parametrelere uygun polimer/biyomolekül eşleniğinin seçilmesi gerekmektedir. Çapraz bağlayıcılar biyoaktif bileşen üzerinden fonksiyonel hale getirilmiş yüzeye bağlanabilir veya değişik angstromlardaki uzatıcıları yüzeylere bağlar [135].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Malzemeler

Bu çalışmada biri sentetik, diğeri doğal olmak üzere iki çeşit polimer kullanılmıştır. Polimerlerden doğal olan domuz derisi kökenli jelatin tip A (Sigma-Aldrich, Almanya) yaklaşık 300 Bloom'dur. Sentetik olan polikaprolakton'un (PCL, Sigma-Aldrich, Almanya) ortalama molekül ağırlığı 80000 Da'dur. PCL için çözücü olarak diklorometan (DCM, Merck, Almanya) ve N,N-dimetilformamid (DMF, Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. PCL/jelatin karışımı için ise çözücü olarak 2,2,2-trifloroetanol (TFE, Sigma-Aldrich, Almanya) ve hekzafloroizopropanol (HFIP, Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır.

Farenin çene altı tükürük bezinden elde edilen epidermal büyüme faktörü (EGF, Cat. No: E4157, Sigma-Aldrich, Almanya) doku iskelelerine immobilize edilmek üzere temin edilmiştir. EGF immobilizasyonunda kullanılan 1,6-diaminohekzan, süberik asit bis(N-hidroksisüksinimid ester) (Disüksinimidil süberat, DSS), 2,2-dihidroksiindan-1,3-dion (Ninhidrin) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından, tetrahidrofuran (THF) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından, etanol (%96) ve izopropanol Aklar Kimya (Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Etanol ve izopropanol hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.

Hücre kültürü çalışmaları için kullanılan Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal sığır serumu (FBS) ve Tripsin/EDTA çözeltisi Hyclone (ABD) firmasından, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) ve penisilin-streptomisin çözeltileri Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hücre fiksasyonunda kullanılan gluteraldehit ve SEM analizi öncesindeki yıkama işleminde hücre deformasyonunu önlemek için kullanılan hekzametildisilazan, Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

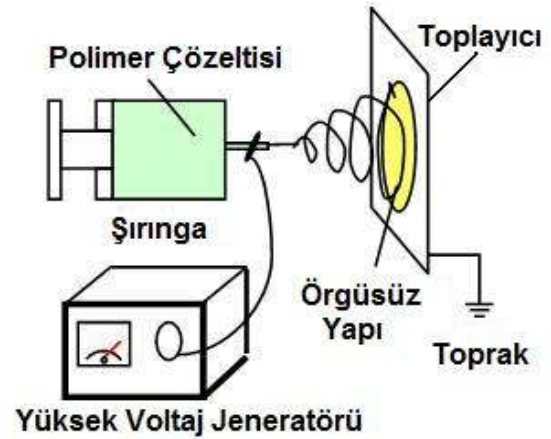
Floresan boyamada kullanılan Alexa Fluor 488 phalloidin Invitrogen (ABD) firmasından, propidyum iyodür ve Triton X-100 Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Nanofibröz Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Modifikasyonu

3.2.1. Nanofibröz Doku İskelelerinin Fabrikasyonu

Nanofibröz doku iskeleleri PCL, PCL/jelatin karışımı, EGF immobilize edilmiş PCL ve EGF immobilize edilmiş PCL/jelatin karışımı olarak hazırlanmıştır.

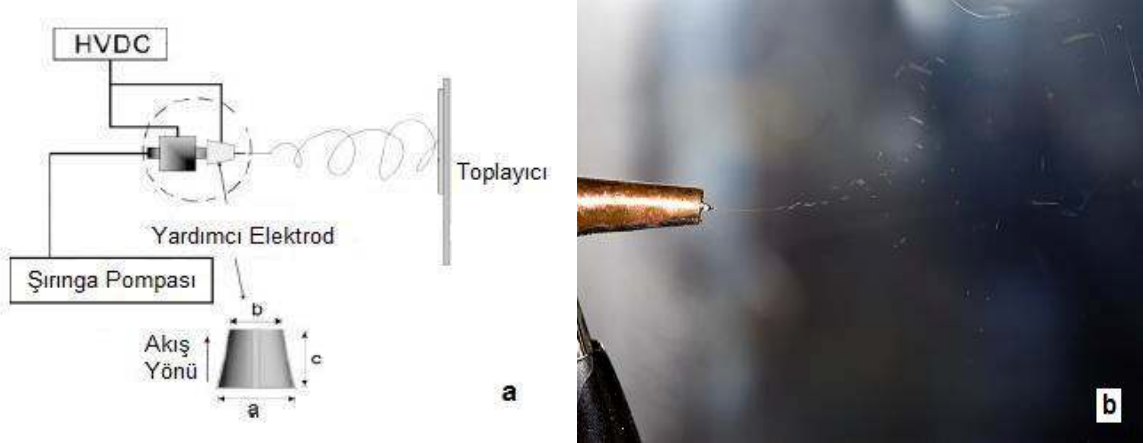
Söz konusu fiber matrisler Şekil 3.1-a'da gösterilen deneysel elektroeğirme düzeneğinde hazırlanmıştır. Şekil 3.1-b'de ise elektroeğirme düzeneğini oluşturan temel elemanlar görülmektedir. Düzeneği oluşturan şırınga pompası, yüksek voltaj kaynağı ve toplayıcı, elektroeğirme işlemini gerçekleştirecek şekilde birleştirilmiştir.



Şekil 3.21. (a) Nanofiber matrislerin üretildiği elektroeğirme düzeneği, (b) Elektroeğirme düzeneğini oluşturan elemanlar.

Öncelikle, 50:50(v/v) bileşimindeki DMF/DCM çözücü karışımı içerisinde %12'lik (w/v) PCL çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra, çözücü HFIP içerisinde önce %5.4'lük PCL çözeltisi ve yine HFIP içerisinde %5.4'lük jelatin çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu iki çözelti, 50:50 oranında karıştırılarak PCL/jelatin çözeltisi elde edilmiştir [136]. PCL ve PCL/jelatin polimer çözeltileri, oda sıcaklığında, 200 rpm hızında, 2 gece süresince manyetik olarak karıştırılmak suretiyle hazırlanmışlardır.

PCL/jelatin nanofibröz matrislerin üretimi sırasında, 0.2 mm kalınlığında bakır levhadan yapılmış koni şeklinde bir yardımcı elektrod kullanılmıştır. Şekil 3.2'de gösterilen koni şeklindeki PCL/jelatin çözeltisi için kullanılan yardımcı elektrodun iki ucu birleştirilmemiş açık haldeki boyutları $a=22\text{mm}$, $b=11\text{mm}$, $c=20\text{mm}$ 'dir. Söz konusu elektrod, şırınga iğnesi boyunca uzanan elektrik alan çizgilerini iğne ucunda yoğunlaştırarak, Taylor konisi ucundan tek ve kararlı bir polimer jeti elde etmeye olanak sağlar. Yardımcı elektrod aynı zamanda, çok yüksek voltaja çıkmaya gerek kalmadan, yüksek akış hızlarında nanofiber elde etmeye yardımcı olmaktadır [83].



Şekil 3.22. Yardımcı elektrod yerleşimi (a), elektroejirme sırasında yardımcı elektrod yardımıyla Taylor konisinden çıkan kararlı PCL/jelatin karışımı polimer jetinin görüntüsü (b).

PCL, PCL/Jelatin nanofibröz matrisler, Şekil 3.1(a)'da görülen düzeneğe hazırlanmıştır. Elektro-eğirme işleminde, polimer çözeltisi için 20 ml'lik şırınga kullanılmıştır ve ucuna dış çapı 0.9 mm'lik ucu düzleştirilmiş iğne yerleştirilmiştir. Şırınga hacmine göre uygun debi şırınga pompasından ayarlanmıştır. Şırınga ucuna yerleştirilen iğne ile toplayıcı (200x300 mm) arasına PCL çözeltisi için 25kV, PCL/jelatin karışımı için ise 12 kV elektro-eğirme voltajı verilmiştir. Yüksek voltajlı güç kaynağı olarak Gamma High-Voltage Research'den (Ormond Beach, FL) temin edilen ve 0-30 kV arası gerilim sağlayabilen pozitif polariteli cihaz kullanılmıştır. Şırınga pompası, PCL için 12 ml/sa, PCL/jelatin karışımı için 1.8 ml/sa besleme hızıyla polimer çözeltisini iğne ucuna beslemek amacıyla kullanılmıştır (New Era Syringe Pump, Wantagh, NY). Toplayıcı olarak 0.2 mm kalınlığında alüminyum folyo kullanılmıştır. İğne, her iki polimer çözeltisi için de toplayıcıdan 350 mm uzaklığa yerleştirilmiştir. Elde edilen yapılar, %70'lik etanol ile ıslatılarak, oda sıcaklığında, vakum altında gece boyunca kurutulmuşlardır.

3.2.2. Nanofibröz Doku İskelelerine EGF immobilizasyonu

EGF, PCL ve PCL/jelatin karışımı nanofibröz doku iskelelerine kovalent immobilizasyon yöntemi ile bağlanmıştır [Santiago et. al. (2006)]. Kovalent bağlanma amino grupları üzerinden gerçekleşmiştir. Dolayısıyla, öncelikle PCL ve PCL/jelatin doku iskelelerine amin gruplarının bağlanması sağlanmıştır. Bunun için, izopropil alkol içerisinde %10'luk (w/v) 1,6-diaminohekzan çözeltisi hazırlanmıştır. EGF immobilize edilecek PCL ve PCL/jelatin karışımı nanofibröz doku iskeleleri, bu çözelti içerisinde, oda sıcaklığında, 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 5'er kez PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerine bağlanan amin gruplarını aktive etmek için, doku iskeleleri %70 (v/v) etanol çözeltisi ve fosfat tampon çözeltisinde (PBS, pH=7.4) yıkanmıştır. Daha sonra 0.08 mmol süberikasit bis(N-hidroksisüksinimid ester) (NHS) içeren 10 ml PBS içinde, hafif karıştırma ile 4 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Aktive edilen doku iskeleleri PBS ile 5 kez yıkandıktan sonra 10 µg/ml EGF çözeltisine (PBS içinde) yerleştirilerek 12 saat boyunca 4°C'de çalkalanmıştır [137]. EGF immobilize edilen doku iskeleleri PBS ile yıkanmış ve dondurularak kurutulmuştur.

3.3. Karakterizasyon Çalışmaları

3.3.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Analiz

PCL ve PCL/jelatin karışımı nanofiberlerin karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu ile yapılmıştır (Zeiss Evo 50, Almanya). İnceleme öncesinde iskeleler altın ile kaplanmıştır.

3.3.2. Ninhidrin Yöntemi ile Bağlanan Amino Gruplarının Spektrofotometrik Tayini

PCL ve PCL/gelatin doku iskelelerinin üzerine bağlanan amino gruplarının varlığını tespit etmek için ninhidrin yöntemi kullanılmıştır [138]. Öncelikle etanol içerisinde 1 mol/l ninhidrin çözeltisi hazırlanmıştır. Amino grupları bağlanmış ve bağlanmamış PCL, PCL/jelatin doku iskeleleri hazırlanan ninhidrin çözeltisiyle 1 dk muamele edilmiştir. Ninhidrinli doku iskeleleri cam tüplere konularak 70°C'de 15 dk su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her bir örneğin üzerine 2 ml THF ve 2 ml izopropanol eklenmiştir. Örnekler, ultrasonik karıştırıcıda tamamen çözülene kadar beklenmiştir. Her bir örneğin, UV-VIS Double Beam PC (Labomed, Inc. ABD) ile 560 nm dalga boyunda absorbanans değerleri ölçülmüştür.

3.3.3. Amin Grupları Bağlanan Nanofibröz Doku İskelelerine FTIC (Floresan İzotiyosiyanat) Bağlanması ve Görüntülenmesi

Doku iskelelerine bağlanan amin gruplarının görüntülenebilmesi için bu gruplar, floresan bir boya olan floresan 5(6) izotiyosiyanat (FITC, Sigma, Almanya) kullanılarak işaretlenmiştir [139]. Yöntemde, doku iskelelerine FITC çözeltisi eklendikten sonra 4°C'de, 8 saat boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. Son olarak elde edilen iskeleler 2 gün boyunca su içerisinde tutularak yıkanmıştır. İskelelerin üzerinde bulunan amin gruplarına bağımlı olarak meydana gelen gözle görünür renk değişimi dijital fotoğraf makinesi ile görüntülenmiştir.

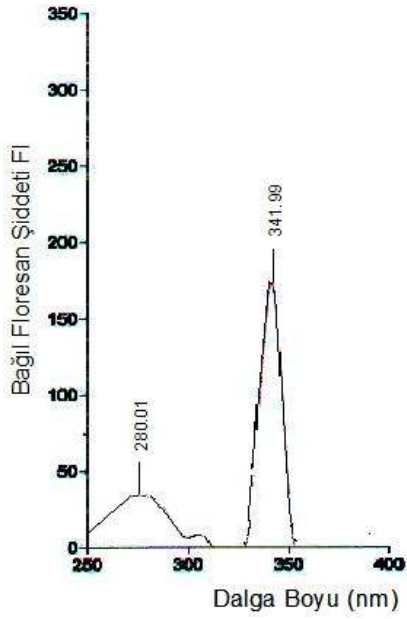
3.3.4. FTIR Analizi

Kovalent immobilizasyon tekniği kullanılarak gerçekleştirilen EGF ile biyomodifikasyon işlemi öncesi ve sonrasında PCL ve PCL/jelatin membranların yüzey kimyasal bileşenleri FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Scientific, Nicolet 6700-Smart Orbit (Diamond Crystal ATR), ABD) ile kalitatif olarak belirlenmiştir. Spektrumlar 4 cm^{-1} znrlkte, $525\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında kaydedilmiş ve Thermo Electron Corporation, Omnic yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.3.5. Floresan Spektrofotometre ile EGF'in Kantitatif Tayini

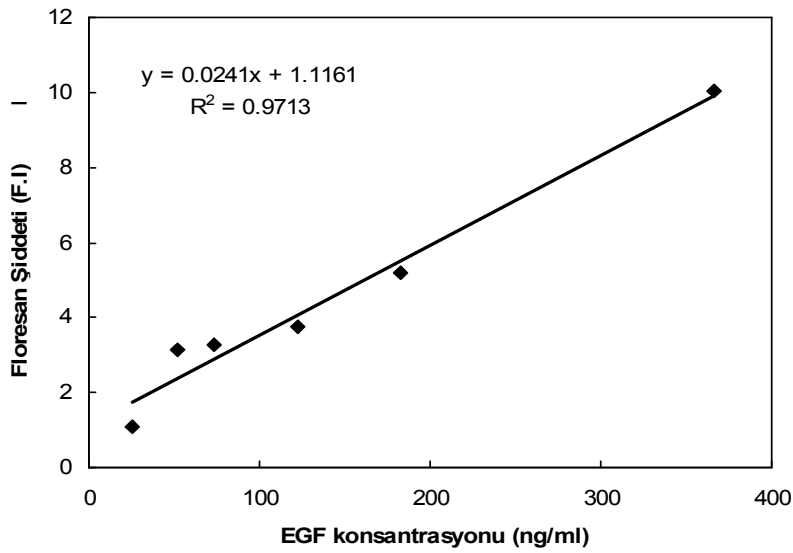
Çalışma kapsamında hazırlanan PCL ve PCL/jelatin membranların yüzeyine immobilize olan EGF miktarı, floresan spektrofotometresi (Cary Eclipse, Avustralya) kullanılarak, oligopeptidin triptofan uçlarından izlenerek tayin edilmiştir [137]. Uyarılma (λ_{uy}) ve emisyon (λ_{em}) dalga boylarını belirlemek amacıyla pH=7'de PBS tamponu içerisinde 0.001 mg/ml derişiminde EGF stok zltisi hazırlanmıştır. Kuartz küvetlere aktarılan EGF zltisinin uyarılma dalga boyu 280 nm'de sabit tutularak, emisyon spektrumu 300-400 nm aralığında taranmıştır. Tarama sonucu EGF'in maksimum emisyon dalga boyu 342 nm olarak bulunmuştur. Emisyon dalga boyu 342 nm'de sabit tutularak, uyarılma dalga boyu için 220-350 nm arasında maksimum dalga boyu taraması yapılmış ve bu değer 280 nm olarak gözlenmiştir [140] (şekil 3.3).

Yüzeylere immobilize olan EGF miktarının tayini amacıyla kovalent immobilizasyon işlemi sonrasında yüzey üzerinden alınan EGF zltisinin floresan şiddeti ölçülerek yüzeye immobilize olan miktar indirekt olarak hesaplanmıştır. İmmobilize olan EGF miktarı, başlangıç zltisindeki EGF miktarından zltide kalan miktarın çıkartılmasıyla hesaplanmıştır.



Şekil 3.23. EGF'e ait uyarılma ve ışıma dalga boyları.

Floresan şiddetinin EGF miktarı ile olan değişimine ait kalibrasyon grafiği Şekil 3.4'de verilmiştir [140].



Şekil 3.24. EGF molekülüne ait kalibrasyon grafiği.

3.3.6. Biyobozunurluk Çalışmaları

PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerinin biyobozunurluk çalışmaları DMEM hücre besisi ortamında gerçekleştirilmiştir. Daha önceden tartımları yapılan doku iskeleleri DMEM ortamına konulmuştur. 3., 5., 7. ve 14. günlerin sonunda alınan örnekler vakumda kurutularak sabit tartıma getirilmiş ve ağırlık kaybına bakılmıştır. Bozuma değerleri, Eşitlik 3.1 yardımıyla yüzde ağırlık kaybı olarak (W_L) belirlenmiştir.

$$W_L (\%) = [(W_0 - W)/W_0] \times 100 \quad (3.1)$$

Eşitlikteki W_0 doku iskelesinin başlangıç kuru ağırlığını, W ise bozunma sonrası kuru ağırlığı göstermektedir.

Örneklerin yapısal bozunmaları ise SEM görüntüleri üzerinden incelenmiştir.

3.3.7. Su Temas Açısı Ölçümleri

Çalışma kapsamında hazırlanan PCL ve PCL/jelatin doku iskelelerinin EGF biyomodifikasyonu öncesi ve sonrasında su temas açısı değerleri yapışık damla (sessile drop) yöntemi ile ölçülmüştür. Ölçümler, Kruss DSA 100 (Almanya) ganyometre sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.8. Gözeneklilik Ölçümleri

PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerinin görünür yoğunluk ve gözeneklilik değerleri sırasıyla, Eşitlik 3.2 ve 3.3'den yararlanılarak hesaplanmıştır [5].

Doku iskelelerinin görünür yoğunluğu (g/cm³);

$$\text{İskelenin görünür yoğunluğu (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{İskelenin kütlesi (g)}}{\text{İskelenin kalınlığı (cm) x İskele alanı (cm}^2\text{)}} \quad (3.2)$$

Doku iskelelerinin gözenekliliği (%);

$$\text{Gözeneklilik (\%)} = 1 - \frac{\text{İskelenin görünür yoğunluğu (g/cm}^3\text{)}}{\text{Malzemenin yığın yoğunluğu (g/cm}^3\text{)}} \times 100 \quad (3.3)$$

PCL ve PCL/jelatin yığın yoğunluklarını hesaplamak için; PCL veya PCL/jelatin çözeltisi ince bir tabaka halinde Petri kabına dökülmüş ve kuruyana kadar beklenmiştir. Elde edilen membrandan yüzey alanı bilinen dairesel bir parça kesilmiştir. Kesilen parçanın kütlesi (m) ve et kalınlığı (h) ölçülmüştür. Kesilen parçanın hacmi (v) Eşitlik 3.4'den hesaplanmıştır.

$$v = \pi \times r^2 \times h \quad (3.4)$$

Eşitlik 3.5'den ise doku iskelelerinin yığın yoğunlukları hesaplanmıştır.

$$d = m/v \quad (3.5)$$

Hesaplanan yığın yoğunluk değerleri Eşitlik 3.3.'te doku iskelelerinin gözenekliliğini hesaplamak üzere kullanılmıştır.

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.4.1. L929 Hücre Hattının Karakterizasyon Çalışmaları

Çalışmada kullanılan L929 fare fibroblast hücre hattı, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Şap Enstitüsü, Hayvan Hücre Kültürü Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir [HÜKÜK (Cell Culture Collection) 92123004, Ankara]. Hücrelerin subkültür işlemleri, %10 FBS (fetal bovine serum, Hyclone) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma) ortamında, 37°C'lik inkubatörde (Hereaus, %5 CO₂, %95 nemlilik) gerçekleştirilmiştir.

Hücre üreme grafiği çalışmaları için çok gözlü polistiren kültür kapları (Nunc, Danimarka) ve 40 mm'lik Petri kapları (Orange Scientific, Belçika) kullanılmıştır. Hücreler, tripsinle muamele edilerek aktif olarak üredikleri flask yüzeylerinden kaldırılmış ve çok gözlü kültür kaplarına ekilmiştir. MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) çalışmaları için, 24-gözlü kültür kaplarının her bir gözüne 1 ml, 1×10^5 hücre/ml konsantrasyonunda hücre ekimi yapılmıştır. Kültürün 1, 2, 3, 5, 9 ve 12. günlerinde hücrelerin üzerindeki kültür ortamı çekilmiş, 24-gözlü kabın her bir gözüne 600 µl taze DMEM ve 60 µl MTT (2.5 mg/ml) eklenmiştir. Örnekler, 37°C'de 3 saat bekletildikten sonra, ortam uzaklaştırılmış ve her göze 400 µl HCl-izopropanol çözeltisi eklenerek oluşan mor formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözelti, 96-gözlü ELISA pleytine aktarılmış ve pleyt okuyucu kullanılarak (ASYS Hitech UVM 340 Plate Reader) 570 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

Hücre sayım testleri ise 12-gözlü polistiren kültür kaplarında (Orange Scientific, Belçika) gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için, 12-gözlü kültür kabının her bir gözüne 1×10^5 hücre/ml konsantrasyonunda hücre ekimi yapılmıştır. Kültürün 1, 2, 3, 5, 9 ve 12. günlerinde hücrelerin üzerindeki kültür ortamı çekilmiş ve hücreler tripsinize edilmiştir. Hücreler tamamen kalktıktan sonra, elde edilen hücre süspansiyonu tripan mavisi ile boyanmış, Neubauer lamı kullanılarak hücre sayımı yapılmıştır.

Hücrelerin yapışma, yayılma ve üreme karakteristikleri, 40 mm'lik Petri kaplarında, invert mikroskop (Olympus) kullanılarak gözlemlenmiştir. Tüm örnekler için, ortam, her üç günde bir yarı yarıya taze besi ortamıyla değiştirilmiştir.

3.4.2. Nanofibröz Doku İskeleleri Üzerinde L929 Hücre Hattı ile Yapılan Çalışmalar

3.4.2.1. MTT Analizi

Nanofibröz doku iskeleleri üzerindeki L929 hücrelerinin canlılığı, kültürasyon süresince farklı zamanlarda, MTT testi ile kantitatif olarak tayin edilmiştir. Seçilen zaman aralıklarında, kültür ortamı uzaklaştırılmıştır ve her bir örneğe 60 µl MTT çözeltisi (2.5 mg/ml, PBS içinde) ve 600 µl taze kültür ortamı eklenmiştir, 37 °C'de 3 saat boyunca inkübasyon gerçekleşmiştir. Inkübasyon periyodundan sonra, her bir gözden ortam uzaklaştırılmış ve doku iskeleleri başka bir 24 gözlü kültür kabına aktarılmıştır. Formazan kristallerini çözmek için her bir göze 400 µl 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenmiştir. Optik yoğunluk, her bir örnekten 200 µl alınarak, 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de mikropate okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.4.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Analiz

Hücrelerin nanofibröz doku iskeleri içerisindeki morfolojileri 1, 2, 3, 5 ve 7 günlük inkübasyon sonunda taramalı elektron mikroskopisi (Zeiss Evo 50, Almanya) ile incelenmiştir. İskeleler hafifçe PBS ile yıkandıktan sonra hücreler 0.1 M PBS (pH=7.4) içerisindeki %2.5'luk (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile yarım saat boyunca muamele edilerek sabitlenmiştir. Sonrasında iskeleler etanol çözeltileri (%30, %50, %70, %90 ve %96 (v/v)) içerisinde dehidre edilmiştir. Hekzametildisilazan ile yıkandıktan sonra kurutulan örnekler altın-paladyum ile kaplanmış ve incelemeye alınmıştır.

3.4.2.3. İmmüno-floresan boyama

Nanofibröz doku iskelelerindeki hücre iskeleti organizasyonu hücre ekimi sonrasında 1., 2., 3. ve 5. günlerde değerlendirilmiştir. Hücreler 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra 1.1 M PBS (pH 7.4) içerisindeki % 2.5 (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile 4°C'de 10 dakika süresince sabitlenmiştir. Ardından PBS içerisindeki %0.1'lik Triton X-100 çözeltisi ile 5 dakika boyunca muamele edilerek hücre membran geçirgenliği arttırılmıştır. Hücreler, %2.5 (v/v) Fluor 488 phalloidin ile 20 dakika boyunca muamele edilerek filamentöz aktinleri (F-aktin) boyanmıştır. Hücre çekirdeği, 10 µg/ml propidyum iyodür (Sigma, Almanya) ile 5 dakika muamele edilerek ters boyama yapılmıştır. Örnekler floresan mikroskobu (Olympus, ABD) kullanılarak görüntülenmiştir.

3.4.2.4. İstatistiksel analiz

Çalışma sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi, GraphPad InStat yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Veriler $n \geq 3$ için $\pm$ standart sapma değerleri ile birlikte sunulmuştur ve farklı deney gruplarında istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Normallik ve varyansların homojenliği varsayımları ile gerçekleştirilen analizler sonucunda post hoc değerlendirilmesi Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. Değerlendirmede, $p < 0.01$ olduğu durum, istatistiksel olarak önemli fark kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, deri doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak hazırlanmış PCL ve PCL/jelatin doku iskelelerinin karakterizasyonuna yönelik yapılan deneysel çalışmaların sonuçları sunulmuş ve irdelenmiştir. Söz konusu sonuçlar doku iskelelerinin elektroegirme ile hazırlanması ve modifikasyonu, doku iskeleleri üzerinde yapılan karakterizasyon çalışmaları ve hücre kültürü çalışmaları olmak üzere 3 ana başlıkta sunulmuştur.

4.1. Nanofibröz Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Modifikasyonu

4.1.1. Nanofibröz Doku İskelelerinin Fabrikasyonu

PCL ve PCL/jelatin doku iskeleleri elektroegirme yöntemi ile hazırlanmıştır. Nano ölçekte hazırlanan fiber doku iskelelerinin en önemli avantajları, yüksek gözeneklilik, yüksek yüzey alanı/hacim oranı ve en önemlisi doğal ECM yapısına olan benzerliğidir [141]. Tüm bu özelliklerin birleşmesi, nanofibröz yapıları, doku mühendisliği için uygun doku iskeleleri haline getirmektedir.

PLA, PGA ve PLGA gibi hidroliz atağına açık ve camsı geçiş sıcaklığı düşük poliestерler, hücre kültürü ortamındaki inkübasyon sırasında büzülerek yapısal bütünlüklerini kaybetmektedirler. Bu çalışmada seçilen PCL ise düşük camsı geçiş sıcaklığına (-60°C Tg) sahip bir polimer olmasına rağmen hidrofobik karakteri ve yüksek kristalinitesinden dolayı düşük biyobozunma hızına sahiptir [142] ve yeterli sürede hücre büyümesini başlatıp düzenleyebilen gerekli yapısal kararlı ortamı sağlayabilmesi nedeniyle bu çalışmada tercih edilmiştir.

Lee ve arkadaşları, değişik çözücülerde hazırladıkları PCL çözeltilerinden elektroegirme ile elde ettikleri membranların morfoloji, kristalinite ve mekanik özelliklerini karakterize etmişler, sonuç olarak PCL çözeltilerinin yüzey gerilimi, viskozite ve elektriksel iletkenliğinin eklenen DMF çözücüsüne bağlı olduğunu bulmuşlardır

[88]. DMF, polimer çözeltisinin viskozitesi ve yüzey gerilimini düşürürken aynı zamanda çözelti iletkenliğini ve dielektrik sabitini arttırarak üretilen fiberlerin çapını küçültmektedir. Elektroëğirme işlemi, polimer zincirlerini düzenleyerek malzeme içerisindeki kristalin bölgeleri arttırmaktadır [143].

Polimerik malzemeler bozunmaya amorf bölgelerden başladığı için, kristalin bölgelerin artışı nanofibröz yapıların bozunmasını zorlaştırabilmektedir. Ancak, diğer yandan nano ölçekli fiberlerin yüksek yüzey alanına sahip olmasından dolayı, yüzeyleri daha fazla su ile temas etmekte ve bunun sonucu olarak hidroliz ataklarına karşı savunmasız hale gelmektedir. Böylece PCL nanofibröz doku iskeleleri biyobozunur özelliklerini korumaktadır. Bozunmayı kolaylaştırmanın bir başka yolu ise biyobozunur PCL'i doğal bir polimer ile karışım halinde hazırlamaktır. Araştırmacılar PCL'i tek başına kullanarak, yada başka biyobozunur polimerlerle kopolimerlerini hazırlayarak hem uygun mekanik dayanıma hem de deri dokusu için uygun bozunma süresine sahip doku iskelesi üretimini gerçekleştirmeye çalışmaktadırlar.

Kollajenin hidrolizi sonucu elde edilen bir ECM proteini olan jelatin, hücre yapışması, üremesi ve farklılaşması bakımından mükemmel bir malzemedir [144]. Birçok protein bazlı polimer gibi jelatin de, su içerisinde kolayca iyonize olup yük taşıyabilen amin ve karboksil grupları içermektedir. Jelatinin bu polielektrolit özelliği ve güçlü hidrojen bağlarının birleşimi, jelatin sıvı çözeltilerinin elektroëğirme işleminde kullanımını daha da ilgi çekici hale getirmektedir [145, 146, 106].

Jelatinin tek başına elektroëğirme işlemi için kullanılamamasının en önemli nedeni; fiberlerin sulu ortama girdiğinde fibröz yapılarının kolaylıkla kaybolmasıdır, başka bir deyişle jelatinin suda çözünmesinden dolayı fibröz yapı bozulmaktadır. Bu fibröz yapıyı korumak için çapraz bağlayıcı bir ajan olan gluteraldehitin buharı kullanılmaktadır, ancak bu işlem yapıyı sarartmakta ve fibröz görünümü bozmaktadır. Ayrıca kullanılan gluteraldehit hücreler üzerinde toksik etkiye neden olmaktadır [147]. Bu nedenle jelatin gibi doğal polimerik malzemeler PCL gibi

eğirilebilir diğer sentetik malzemelerle karışım halinde eğirilmektedir. PCL'in aynı zamanda jelatin karışım içerisindeki viskoziteyi arttırarak boncuk oluşumunu engellediği de söylenebilir.

Elektroeğirme işleminde kullanılan polimerik çözeltiler karışım halinde hazırlanırken dikkat edilecek önemli nokta, her iki polimeri de çözebilecek bir çözücü seçmektir. Çözücü karışım içerisinde kullanılan polimerlerin yığın yapısı içerisine girebilmeli ve yapıdaki ikincil hidrojen bağlarını zayıflatarak polimerik yapıyı daha lineer hale getirebilmelidir. Lineer hale gelen polimerik yapıdan elektroeğirmeyle nano boyda fiberler elde edilebilmektedir. Aynı zamanda kimi polimer sistemlerinde (örneğin: Nylon 6) eğirme sonucunda fiber içerisindeki kristalin bölgeler artabilmektedir. Bu etkinin yine aynı sistemlerde fiberlerin dönen bir toplayıcı üzerinde toplanması sırasında arttığı ortaya konmuştur. Bu çalışmada dönen bir toplayıcı kullanılamamış olması nedeniyle, diğer yöntemlere göre elektroeğirme sonucu ne kadar kristallenme artışı sağlandığı ölçülmemiştir.

Bölüm 2.2.6.2.7'de bahsedildiği üzere, yüksek dielektrik sabitine sahip olan çözücüler fiberlerde boncuk oluşumunu azaltmakta ve fiber çapını düşürmektedir. Yüksek dielektrik sabiti nedeniyle elektroeğirme jetinin bükülme kararsızlığı artmakta ve bu durumda nanofibröz yapıların toplanma alanı genişleyerek daha ince fiberlerin oluşumu mümkün olmaktadır. Buna benzer olarak, yardımcı elektrodun iğne ucu etrafındaki elektrik alanı lineer hale getirerek, çözücü moleküllerinin polimer zincirleriyle olan etkileşimlerine voltajın olası negatif etkilerini azalttığı ve bunun sonucunda da boncuk oluşumunu önlediği söylenebilir. Bir diğer deyişle, Taylor konisine iğne ucu boyunca daha iyi koşullanarak (eş yük dağılımı) ulaşmış çözücü sistemi; karşılaşacağı ani ve yüksek voltaj nedeniyle etrafına yerleştiği polimer zincirlerinden ayrılmadan eğrilme işlemi başlayabilecektir. Böylece voltaj ve akış hızları daha yüksek değerlere çekilse dahi, eğrilme kararlılığında bir bozulma olmamaktadır. Aksi durumlarda ise çözücü polimer zincirini terk ederek; polimerin dolaşık (entangled) bir halde eğrilmesine ve yapının boncuklanmasına neden olmaktadır. Buna göre örneğin, Çizelge 4.1'de verilen değerlere bakıldığında yüksek dielektrik sabitine sahip olan DMF'in, PCL'in eğirilebilirliğini arttıracığı söylenebilir [148].

Çizelge 4.1. Elektroeğirme işleminde kullanılan bazı çözücülerin dielektrik sabitleri.

Çözücü	Dielektrik sabiti	Referans
2-Propanol	18.3	Merck teknik kataloğu
Asetik asit	6.15	Wannatong ve ark.,2004 [90]
Aseton	20.7	Berkland ve ark., 2004 [165]
Asetonitril	35.92-37.06	Wannatong ve ark.,2004 [90]
Kloroform	4.8	Berkland ve ark., 2004 [165]
Diklorometan	8.93	Yang ve ark., 2004 [148]
Dimetilformamid	36.71	Yang ve ark., 2004 [148]
Etil asetat	6.0	Theron ve ark., 2004 [166]
Etanol	24.55	Prego ve ark., 2000 [167]
Metanol	32.6	Merck teknik kataloğu
Piridin	12.3	Merck teknik kataloğu
Tetrahidrofuran	7.47	Wannatong ve ark.,2004 [90]
Trifloroetanol	27.0	Berkland et. al., 2004 [165]
Hekzafloropropanol	16.7	Min et. al., 2004 [168]
Toluen	2.438	Wannatong ve ark.,2004 [90]
Su	80.2	Merck teknik kataloğu

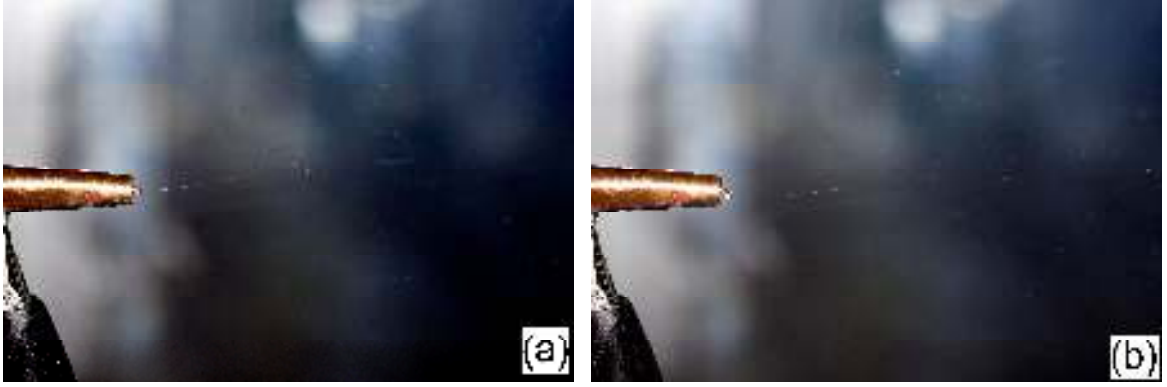
Huang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, elektroeğirme için optimum konsantrasyonda, yüksek oranda polar ve florlanmış bir çözücü içerisinde hazırlanmış jelatin çözeltisi kullanılmıştır [149]. Bu çalışma, polimer konsantrasyonuna bağlı olan fiber morfolojisinin, üretilen jelatin membranın mekanik dayanımı üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Örneğin, polimer konsantrasyonunun artmasıyla ortalama fiber çapı 100 nm'den 1.9 µm'ye kadar

artmış ve fiberlerin eş boylu olması şartıyla, düşük çaplı fiberlerin mekanik dayanımının, yüksek çaplı fiberlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tez kapsamında yapılan ön çalışmalarda, PCL için elektroëirme parametreleri Maviş ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmadan alınmıştır [150]. DMF ve DCM çözücü karışımı içerisinde hazırlanan PCL, mevcut parametreler ile elektroëirilmiştir. Elektroëirme işlemi sonucu üretilen fiberlerin çap aralığı yaklaşık 488 ± 114 nm olarak ölçülmüştür.

PCL/jelatin matrisler için yapılan ön çalışmalarda, PCL ve jelatinin çözelti içerisinde farklı viskozitelere sahip olmasından dolayı farklı konsantrasyonlarda elektroëirme çözeltileri hazırlanmıştır. PCL/jelatin matrisler öncelikle TFE içerisinde çözümlenerek elektroëirme çözeltisi hazırlanmıştır [5]. TFE içerisinde %12 (w/v), %10 (w/v) ve %8 (w/v) konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerden, en düşük fiber çapının elde edildiği %8 (w/v)'lik konsantrasyon tercih edilmiştir. Elektroëirme işlemi sırasında kullanılan yardımcı elektrodla birlikte, çapları birbirine yakın ve düzgün fiberler elde edilmiştir.

PCL/jelatin çözeltisi kullanılarak yapılan elektroëirme işleminde 10.5-20 kV arası voltaj değerlerinde, her bir voltaj değeri için, başlangıç koni oluşumu ve Taylor konisi oluşumu gözlenen akış hızlarında, ideal elektroëirme aralığını saptayabilmek için deneysel bir çalışma yapılmıştır. Belli bir voltaj değeri için elektroëirme jetinin kesintisiz beslenebildiği en düşük akış hızında gözlemlenen koniye “başlangıç konisi” adı verilmiştir. Başlangıç konisinden elde edilen fibröz yapılarda eşboyluluk azalmıştır. Bu nedenle ideal bir elektroëirme işlemi için Taylor konisinin ideal şeklini alması gerektiği anlaşılmıştır. İdeal şekil ile kastedilen belli bir voltaj değerinde iğne ucundaki polimer çözeltisini besleyecek maksimum akış hızında (damlama olmadan) elde edilen Taylor konisidir. Şekil 4.1’de başlangıç ve ideal Taylor konileri görölmektedir. Çizelge 4.2’de ise PCL/jelatin için, başlangıç konisi ve Taylor konisi’nin gözlemlendiği koşul değerleri yer almaktadır.



Şekil 4.1. Başlangıç konisi (a) ve ideal Taylor konisi (b) görünüşleri.

Çizelge 4.2. TFE içerisindeki %8 (w/v)'lik PCL/jelatin çözeltisi ile yapılan elektroegirme işlemlerinde, başlangıç konisi ve Taylor konisi'nin gözlemlendiği koşul değerleri.

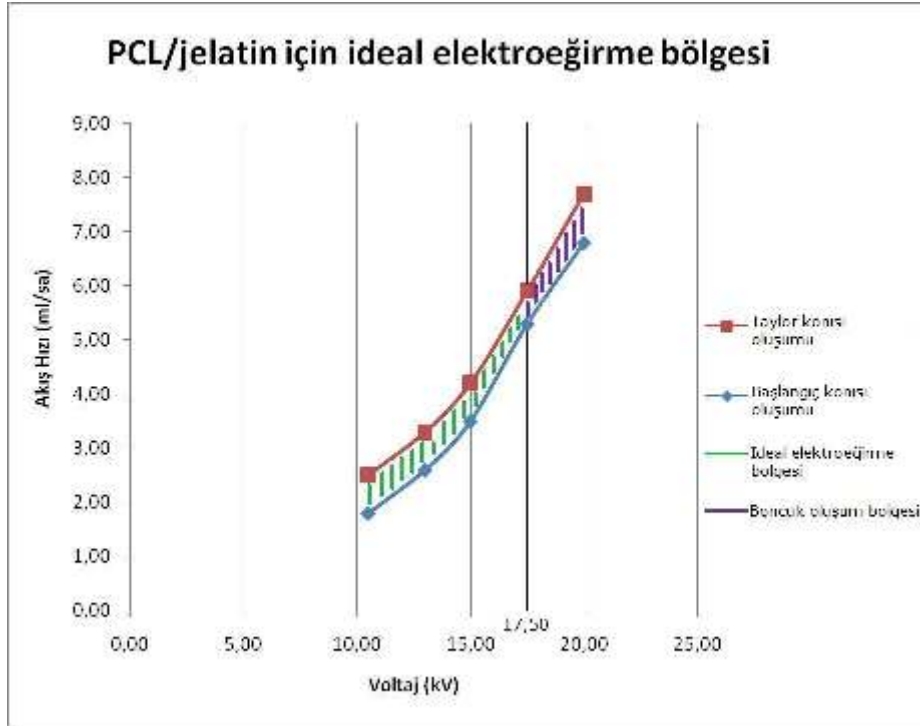
Örnek Adı	Akış Hızı (m/sa)	Voltaj (kV)	Mesafe (mm)
PCL/Jelatin-TFE (%8w/v)	2.0	10.5	350
	2.3 *	10.5	350
	2.9	13.0	350
	3.8 *	13.0	350
	5.0	15.0	350
	5.6 *	15.0	350
	6.2	17.5	350
	6.8 *	17.5	350
	7.0	20.0	350

* Taylor konisinin görüldüğü akış hızı değerleri.

Eşboylu ve en düşük fiber çaplarının elde edildiği koşullar çizelgede koyu olarak gösterilmiştir.

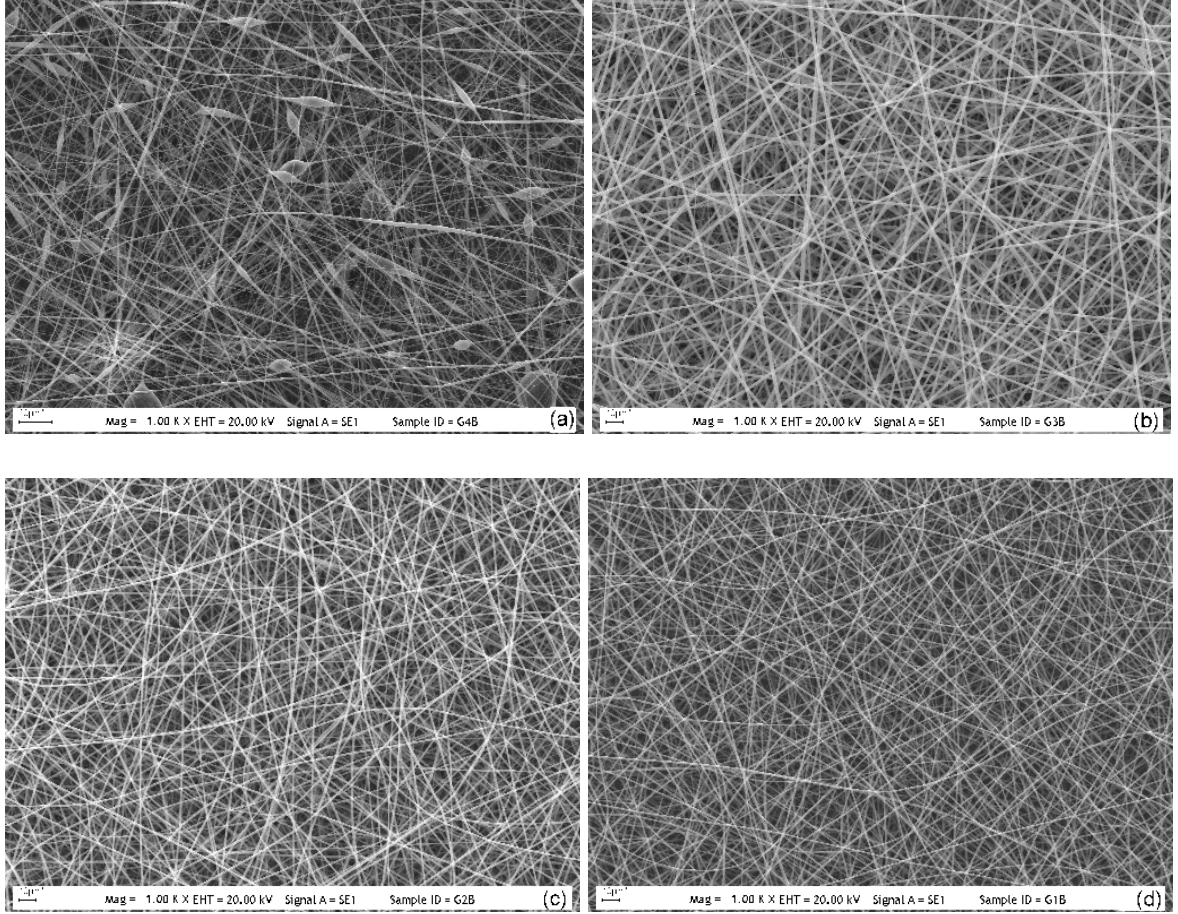
Sonuçlar incelendiğinde, 20 kV değerinden sonra Taylor konisi gözlemek mümkün olmamıştır. 13 kV'dan itibaren elde edilen matrislerde ise çapta eşboyluluk azalmaya başlamıştır. 17.5 kV'a kadar akış hızı ve voltajda gözlenen lineer artış ise Şekil 4.2'de görüldüğü gibi bu voltaj değerinde kırılmaya uğramıştır. Bu kırılmanın nedeni Şekil 4.3'de de görüldüğü gibi boncuk oluşumundan kaynaklanmaktadır. PCL ile yapılan yardımcı elektrod çalışmalarında da boncuk oluşumu gözlenmiştir.

PCL/jelatin için TFE ile yapılan deneyler sonucu elde edilen ve görsel olarak farkedilebilen sübjektif veriler, HFIP ile yapılan çalışmalarda deneysel parametrelerin daha kolay optimize edilmesine yardımcı olmuştur. Sonuçta, kullanılan parametreler, en ideal koşulları temsil etmekten ziyade, daha iyi bir sonuç alabilmek için pratik bir araç görevi görmüştür.



Şekil 4.2. %8 (w/v) konsantrasyondaki PCL/jelatin matrisler için ideal elektroegirme bölgesi.

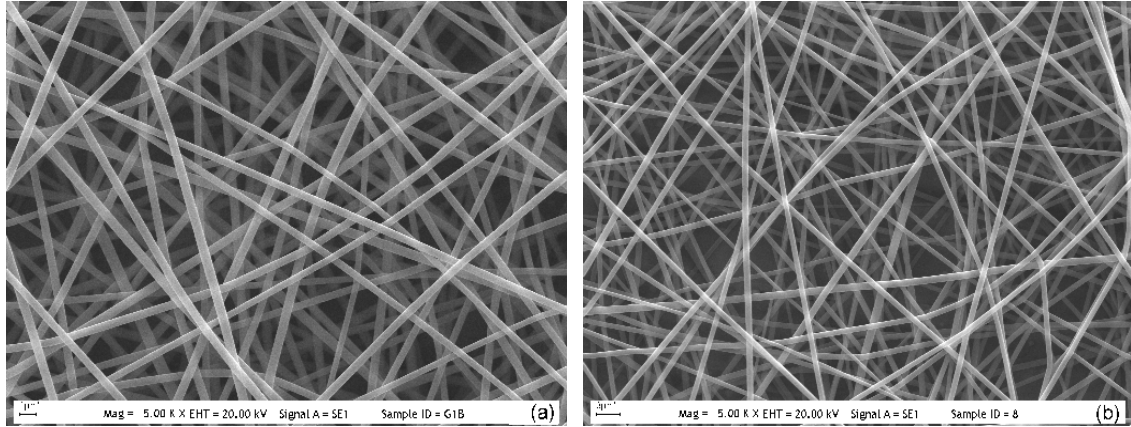
Şekil 4.2'deki grafikte görülen kırmızı çizgi ideal Taylor konisinin oluştuğu akış hızı ve voltaj değerlerini, mavi çizgi başlangıç konisinin oluştuğu akış hızı ve voltaj değerlerini, yeşil çizgilerle taralı alan ideal elektroëirme bölgesini, mor çizgilerle taralı alan ise boncuk oluşumunun görüldüğü bölgeyi ifade etmektedir. Kırmızı çizginin üstü damlama bölgesini, mavi çizginin altı ise koni oluşumunun gözlenmediği bölgeyi ifade etmektedir. Voltaja bağlı olarak arttırılabilen akış hızı belli değerlerden sonra elektroëirmeye izin vermemektedir. Bu duruma, elektrik alan şiddetinin artışı ve viskozitenin artan bu değerlere göre düşük kalmasının yol açtığı düşünülebilir. 17.5 kV'dan düşük voltaj değerlerinde boncuk oluşumuna rastlanmadığı görülmektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. PCL/jelatin matrislerde voltaj değerinin artmasıyla artan boncuk oluşumu; (a) 17.5 kV, (b) 15 kV, (c) 13 kV, (d) 10.5 kV.

%8 (w/v)'lik çözelti konsantrasyonundan 1104 ± 129 nm aralığında fiberler elde edilmiştir. Fiber çaplarının nano ölçeğe düşürülebilmesi için jelatinin içerisinde daha iyi çözüldüğü bir çözücü olan HFIP'ın kullanılmasına karar verilmiştir [136]. TFE'ye göre fazladan 3 flor içeren bir yapı olan HFIP, flor gruplarının artan etkinliği ve molekül büyüklüğü ile proteinlerle daha güçlü bir etkileşim kurabilmektedir [151]. Bu nedenle HFIP içerisinde daha saydam bir PCL/jelatin çözeltisi elde edilmiştir. Çözünürlüğün artması polimer zincirlerini açarak, polimer moleküllerinin biraraya gelmesini (birbirine dolanmasını) engeller ve boncuk oluşumuna neden olan etmenleri belli ölçüde etkisiz hale getirebilir.

Bu deney grubunda, %8(w/v)'lik konsantrasyona göre daha yüksek konsantrasyon değerlerine denk gelen ve ağırlıkça hazırlanan %6.24 ve %5.40 çözelti konsantrasyonlarından, %5.4'lük çözeltiden daha ince fiber elde edilebildiği için, bu çözelti konsantrasyonu tercih edilmiştir. %5.4'lük konsantrasyonda 663 ± 107 nm aralığında fiberler elde edilmiştir (Şekil 4.4). Çözünürlüğün ve konsantrasyonun artması fiber çapını neredeyse yarı yarıya azaltmıştır.

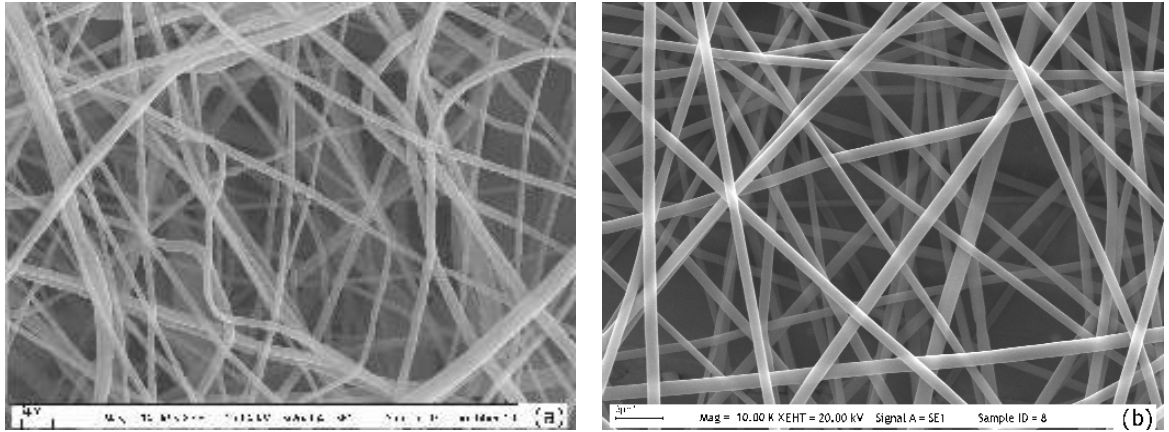


Şekil 4.4. Çözücü değişikliğinin fiber çapı üzerine etkisi; (a) TFE içerisinde (1104 ± 129 nm), (b) HFIP içerisinde (663 ± 107 nm) deri doku iskelesi olarak kullanılmak amacıyla hazırlanan PCL/jelatin çözeltilerinden elde edilen fiberlerin SEM görüntüleri.

Çizelge 4.3’de, PCL ve PCL/jelatin nanofiber matrislerinin elektroëirme işlem koşulları ve elektroëirme sonucu elde edilen nanofiber çapları verilmiştir. Şekil 4.5’de ise bu parametrelerle hazırlanmış PCL ve PCL/jelatin karışımı doku iskelelerinin SEM görüntüleri yer almaktadır.

Çizelge 4.3. Deri doku iskelesi olarak kullanılmak amacıyla hazırlanan PCL ve PCL/Jelatin nanofiber matrislerin hazırlanmasında kullanılan elektroëirme işlem koşulları ve nanofiber çapları.

Nanofiber	Çözücü	Akış Hızı (ml/sa)	Uzaklık (cm)	Gerilim (kV)	Nanofiber Çapı (nm)
PCL (%12w/v)	DMF/DCM (50:50)	5	35	25	488±114
PCL/Jelatin (%5.4) (50:50)	HFIP	1.8	35	12	663±107



Şekil 4.5. Elektroëirme yöntemiyle elde edilen; (a) PCL, (b) PCL/jelatin karışımı doku iskelelerinin SEM görüntüleri.

EGF immobilizasyonu ve hücre kültürü çalışmaları bu koşullarda hazırlanmış örneklerle gerçekleştirilmiştir. 14 ml PCL/jelatin çözeltisi, 8 saat süreyle 20X25 cm²'lik alana toplanarak 14.3 ± 0.37 µm kalınlığında PCL/jelatin matrisler, 3 ml PCL çözeltisi, 1.5 saat süreyle 10X15 cm²'lik alana toplanarak 27.7 ± 0.33 µm kalınlığında PCL matrisler elde edilmiştir. PCL matrisler, yüksek voltaj değerinden dolayı daha dar bir alana toplandığı için elde edilen matrislerin kalınlığı artmıştır. Elde edilen matrislerden çapı 1.5 cm olan dairesel parçalar kesilerek EGF immobilizasyonu ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.

4.1.2. Nanofibröz Doku İskelelerine EGF immobilizasyonu

Polimerik nanofiber iskeleler, nano ölçekli ekstraselüler matris (ECM) proteinleri ile benzer yapıya sahiptir. Bu nedenle, ECM taklidi doku mühendisliği iskeleleri olmaya en yakın aday olmaktadır [152]. Başarılı bir doku mühendisliği iskelesi, hücre yapışmasına ve üremesine elverişli, hücre uyumlu bir yüzeye sahip olmalıdır. Çoğu yüzey modifikasyonu, hücreler tarafından spesifik olarak algılanabilen biyomoleküllerin polimerik yüzeylere immobilizasyonu ile doku iskelesinin biyouyumluluğunu arttırmaya yöneliktir [153]. Bu biyomoleküller kollajen, fibronektin, arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) peptidleri gibi adeziv proteinler ve bFGF, EGF, insülin gibi büyüme faktörleri olabilmektedirler. Biyomoleküller, biyomalzeme yüzeylerine hem kovalent olarak hem de elektrostatik olarak bağlanabildikleri gibi, kendiliğinden düzenlenme ile de bağlanabilmektedir.

Choi ve arkadaşları diabetik ülser tedavisinde kullanmak üzere, elektroeğirdikleri PCL-PEG ve PCL nanofiber matris yüzeyine EGF immobilize ederek insan keratinosit hücrelerinde ve dorsal diabetik yarası olan hayvan modellerinde çalışmışlardır. Elde edilen sonuçlar, kimyasal olarak nanofiber matris üzerine tutturulan rhEGF'in (rekonbinant insan EGF), rhEGF çözeltisinde bekletilen matrislere göre keratinosit ekspresyonunu daha çok arttırdığı yönündedir [154].

Klenkler ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, polidimetilsiloksan'ın (PDMS) yüzeyi EGF ile modifiye edilerek epitelyal kornea hücrelerinin üremesini arttırmak hedeflenmiştir. EGF, PDMS üzerine kovalent olarak alilamin monomeri ve PEG ayırıcısı kullanılarak plazma polimerizasyonu ile bağlanmıştır. Daha sonra EGF, PEG bütanoik asitin homobifonksiyonel N-hidroksisüksinimidil esteri ile aktif hale getirilmiştir (SBA₂-PEG). Ortamdaki SBA₂-PEG, EGF'in PEG'in uç grubuna bağlanmasını sağlar. Yapılan hücre hücre kültür çalışmaları sonucu, EGF immobilize edilmiş matrisin epitelyal kornea hücrelerinin proliferasyonunu uyardığı ve hızlandırdığı görülmüştür [155].

Tavşanlarda doku kaybından oluşmuş deri kusurunu gidermek için, EGF yüklü mikroküreler kullanarak iki katmanlı polimerik yara örtüsü sentezlenmiştir [156]. Jelatin, doğal, nontoksik ve biyouyumlu olduğundan dolayı alt tabaka seçilmiştir ve bu malzemeden dondurarak kurutma yöntemiyle sünger formda çeşitli gözenekli matrisler hazırlanmıştır. Dış tabakada ise elastomerik poliüretan membranlar kullanılmıştır. Hücre proliferasyonunu aktive etmesi için jelatin süngerlere iki farklı dozda EGF (1-15µg) eklenmiştir. Birinci tip jelatin süngerde, EGF jelatin süngere heparin ile immobilize edilmiştir. İkinci tipte ise EGF, köpük çözeltisine eklenmiştir. Yapılan testlerde iki şekilde hazırlanan sünger formda jelatin matrislerde işlev açısından belirgin bir fark görülmemiştir. Sonuç olarak dermisin tamamen yenilendiği ve yara izi oluşumunun önlendiği görülmüştür.

Fiziksel karışım veya kaplamaya ek olarak, kollajen ve jelatin gibi ECM proteinlerini kovalent olarak nanofiber yüzeylerine bağlamak biyomimetik doku mühendisliği iskeleleri geliştirmek için bir diğer seçenektir.

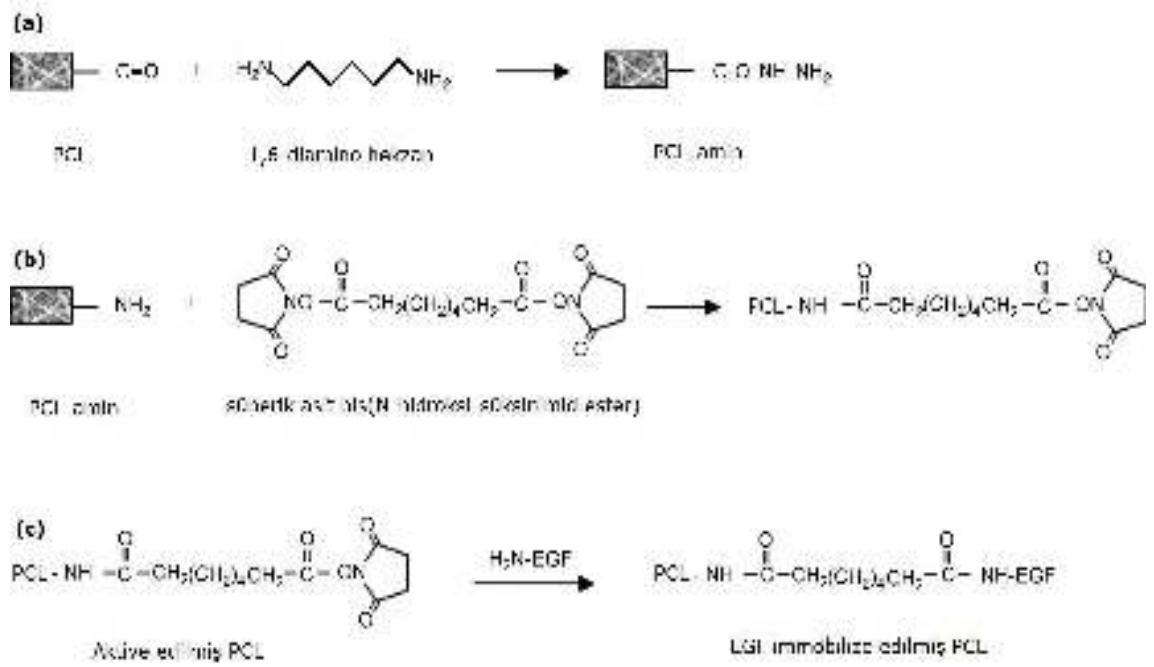
Protein moleküllerini polimer yüzeyine kovalent olarak bağlamak için popüler bir metod ise biyomalzeme yüzeyinde öncelikle karboksil veya amin grupları oluşturmak ardından da proteini yüzeye, bağlanma ajanı olarak suda çözünebilen karbodiimid kullanarak bağlamaktır [157, 158]. Örgüsüz PET nanofiber matrisler elektro-eğirme yöntemiyle hazırlandıktan sonra yüzeyleri jelatin ile modifiye edilir.

PET nanofiberler yüzeylerinde hidroksil grupları oluşturmak için formaldehit ile muamele edilir, ardından başlatıcı Ce (IV) kullanılarak metakrilik asit (MAA) ile greft polimerizasyonu yapılır. Sonuç olarak PMMA greftlenmiş PET nanofiberler üzerine bağlanma ajanı olarak suda eriyebilen karbodiimid kullanılarak jelatin bağlanır [38]. PCL nanofiber yüzeylere jelatin bağlayabilmek için nanofiberler öncelikle hava plazması ile muamele edilerek yüzeyde karboksil grupları oluşturulur, ardından jelatin molekülleri yüzeye kovalent olarak bağlanır [39]. Jelatin bağlı PET ve PCL nanofiber yüzeyler için endotel hücrelere olan uyumluluk, modifiye edilmeyen nanofiberlere göre yükselmiştir. Ayrıca, jelatin bağlanmış ve hizalanmış PCL nanofiberler endotel hücrelere yüksek uyumluluk göstermiştir.

Santiago ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 6 mm kalınlığındaki PCL diskler üzerine 1,6-hekzadiamin ile amin grupları bağlanmıştır. Ardından 1-etil-3-(dimetilaminopropil) (EDC) ve NHS karışımı kullanılarak PCL üzerindeki amin grupları aktive edilmiştir. Aktive edilen amin grupları üzerinden RGD, YIGSR ve IKVAV peptid sekansları kovalent olarak doku iskelelerine immobilize edilmiştir. Yüzeydeki amin gruplarının varlığı XPS analizi ve ninhidrin testi ile doğrulanmıştır. Laminin türevli bu peptid sekanslarının adipoz türevli kök hücrelerin (ASCs) PCL üzerindeki yapışmalarını desteklediği görülmüştür. Yüzeye bağlanan RGD ve YIGSR'ye kıyasla, IKVAV'ın yüzeye yapışan hücrelerin daha çok yayılmasına katkıda bulunduğu görülmüştür [159].

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda PCL ve PCL/jelatin karışımı olarak hazırlanan polimer çözeltilerinden elde edilen nanofibröz matris yüzeylerine EGF kovalent olarak immobilize edilmiştir [159]. Yapılan çalışmada EGF konsantrasyonu 10 µg/ml olarak seçilmiştir. Bu konsantrasyonun seçilmesinin nedeni, literatürde ideal yara kapanmasının gerçekleşmesi ve epitelizeasyonda önemli bir artışın gözlenmesi için, topikal uygulamalarda (her 8 saatte bir) en uygun EGF konsantrasyonu aralığının, 1-10 µg olarak belirlenmiş olmasıdır [169].

EGF immobilizasyonu, PCL yüzeyine bağlanan amin grupları üzerinden gerçekleştirilmiştir [160]. PCL yüzeyinde EGF ile etkileşecek amin grupları olmadığı için öncelikle yüzeyine amin grupları bağlanmıştır. PCL yüzeyine amin grupları bağlamak için kullanılan 1,6-diaminohekzan, PCL'in yapısındaki oksijen çift bağını açarak oksijene bağlanır. NHS yapısındaki oksijen ile PCL'in oksijenine bağlanan 1,6-diaminohekzanın azotu bağ yapar. Son olarak amin grubuna sahip EGF, NHS'deki benzen halkasını açarak azot üzerinden bağlanır. Bu şekilde aktive olmuş PCL üzerine EGF sabitlemesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. PCL üzerinden EGF immobilizasyonunun şematik gösterimi; (a) PCL yüzeyinin aminlenmesi, (b) PCL yüzeyindeki amin gruplarının NHS ile aktive edilmesi, (c) Aktive edilmiş PCL üzerinden EGF immobilize edilmesi.

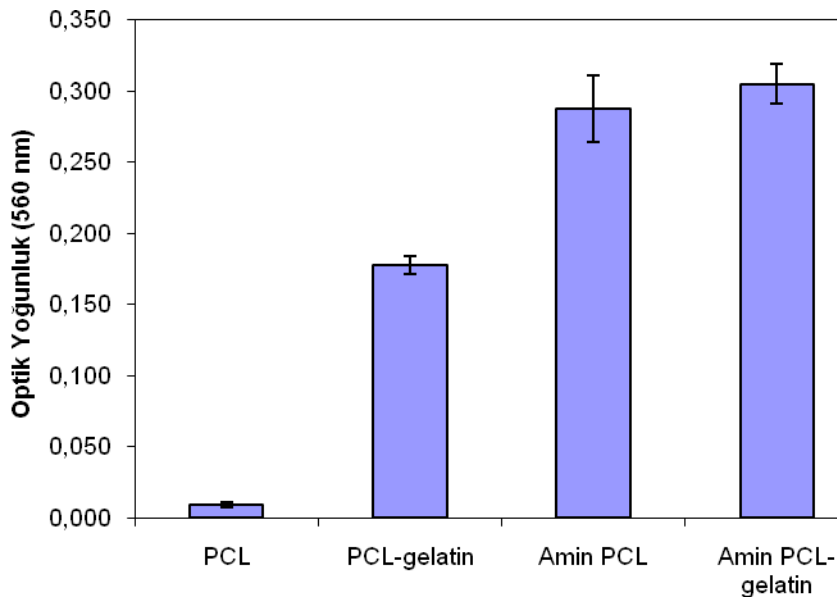
PCL/jelatin karışımında ise, jelatinin üzerinde hali hazırda var olan amin gruplarının aktive olması ile immobilizasyon işlemi gerçekleşmektedir.

4.2. Karakterizasyon Çalışmaları

Tez kapsamında gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları, Çizelge 4.3’de verilen koşullarda hazırlanan nanofibröz matrislerle yürütülmüştür.

4.2.1. Ninhidrin Yöntemi ile Bağlanan Amino Gruplarının Spektrofotometrik Tayini

Nanofiber matrislere bağlanan amino gruplarının tayini için ninhidrin yöntemi kullanılmıştır. Amino grubu bağlanmış PCL doku iskeleleri ve PCL/jelatin karışımı doku iskeleleri ninhidrin ile muamele edilince koyu mor renk almışlardır. Amino grubu bağlanmamış PCL/jelatin doku iskelelerinin, jelatinin yapısında var olan amino gruplarından dolayı daha açık mor renk aldığı görülmüş, amino grubu bağlanmamış PCL’de ise renk değişimi gözlenmemiştir. Renk değişimlerinin absorbans değerleri UV-vis spektrofotometre ile ölçülmüştür. Şekil 4.7’de doku iskelelerinden elde edilen absorbans değerleri yer almaktadır.

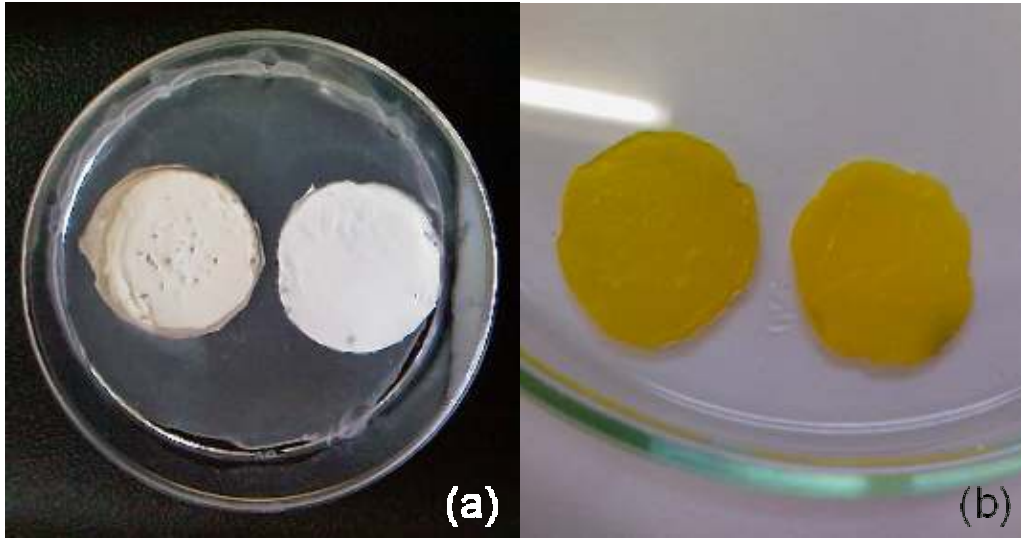


Şekil 4.7. Amino grubu bağlanan ve bağlanmayan doku iskelelerinin ninhidrin yöntemi sonucu elde edilen absorbans değerlerinin karşılaştırılması.

Yüzeyinde amin grubu yer almayan PCL'in absorbands değeri sıfıra yakındır. Amin grubu bağlanmamış PCL/jelatin'in jelatinden kaynaklı amin gruplarına sahip olmasından dolayı, absorbands değerinde belirgin bir biçimde artış gözlenmiştir. Amin grubu bağlanmış PCL ve PCL/jelatin doku iskelelerinden elde edilen absorbands değerleri ise tüm örnekler arasında en yüksek olanlardır. Aradaki az miktardaki fark, daha önce söz edildiği gibi jelatinin yapısında var olan amin gruplarından kaynaklanmaktadır.

4.2.2. Amin Grupları Bağlanan Nanofibröz Doku İskelelerine FTIC (Floresan İzotiyosiyanat) Bağlanması ve Görüntülenmesi

Floresan bir boya olan FITC, yapıda var olan amin uç gruplarına bağlanarak bu grupları görünür hale getirmektedir. FITC içerisinde 1 gece bekletilen doku iskelelerinde renk farkı meydana gelmiştir. Nanofibröz doku iskelelerini floresan mikroskopta görüntülemek mümkün olmadığından, mevcut renk değişimi dijital fotoğraf makinesi ile görüntülenmiştir.

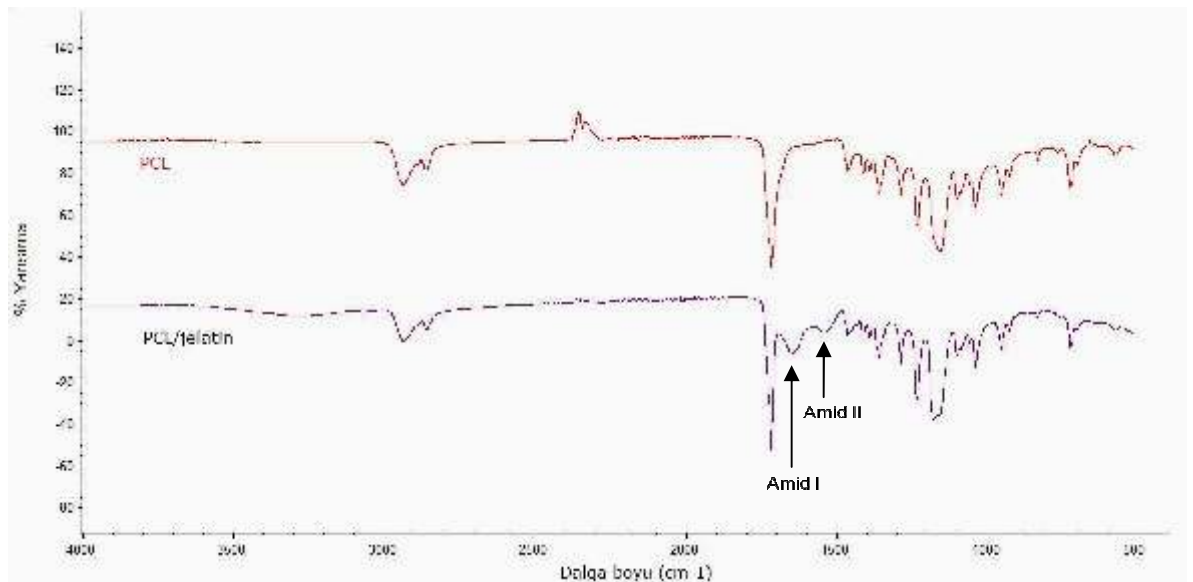


Şekil 4.8. FITC bağlanan (a) PCL ve (b) PCL/jelatin doku iskeleleri.

Şekil 4.8'de FITC ile muamele edilen doku iskelelerinin görüntüleri yer almaktadır. Şekil 4.8-a'daki doku iskelelerinden amin grubu bağlanmış olan PCL, hafif sararmıştır, sağdaki amin grubu bağlanmamış PCL'de herhangi bir renk değişimi görülmemektedir. Şekil 4.8-b'deki amin grubu bağlanmış (solda) ve bağlanmamış (sağda) PCL/jelatin doku iskelelerinin her ikisi de amin gruplarının varlığından dolayı FITC ile boyanmıştır. Soldaki PCL üzerinden amin grubu bağlanmış olan PCL/jelatin doku iskelesinin PCL'den gelen amin grupları nedeniyle, amin grubu bağlanmamış olan PCL/jelatin doku iskelesine göre biraz daha koyu bir renk aldığı görülmektedir.

4.2.3. Nanofibröz Doku İskelelerinin FTIR Analizi

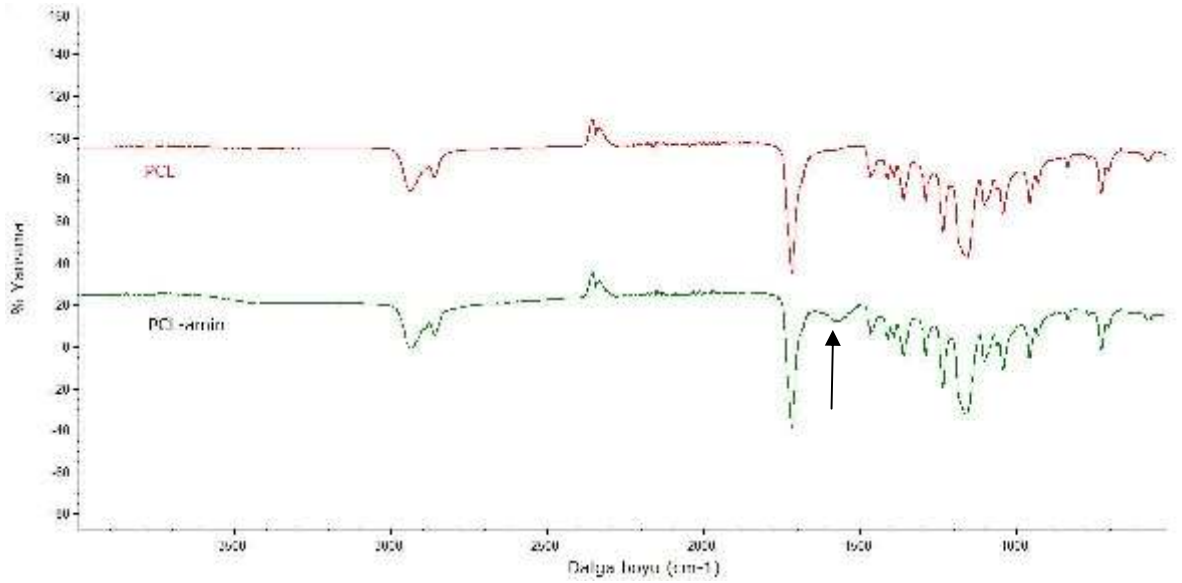
PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerinin yüzey karakterizasyonları ATR-FTIR spektrofotometresi kullanılarak yapılmıştır. Şekil 4.9'da PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumu görülmektedir. 2866 cm^{-1} (simetrik CH_2 gerilmesi), 2943 cm^{-1} (asimetrik CH_2 gerilmesi), 1721 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ gerilmesi), 1294 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}$ ve $\text{C}-\text{C}$ gerilmesi) ve 1239 cm^{-1} (asimetrik $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ gerilmesi) dalga boylarındaki pikler PCL için karakteristik piklerdir.



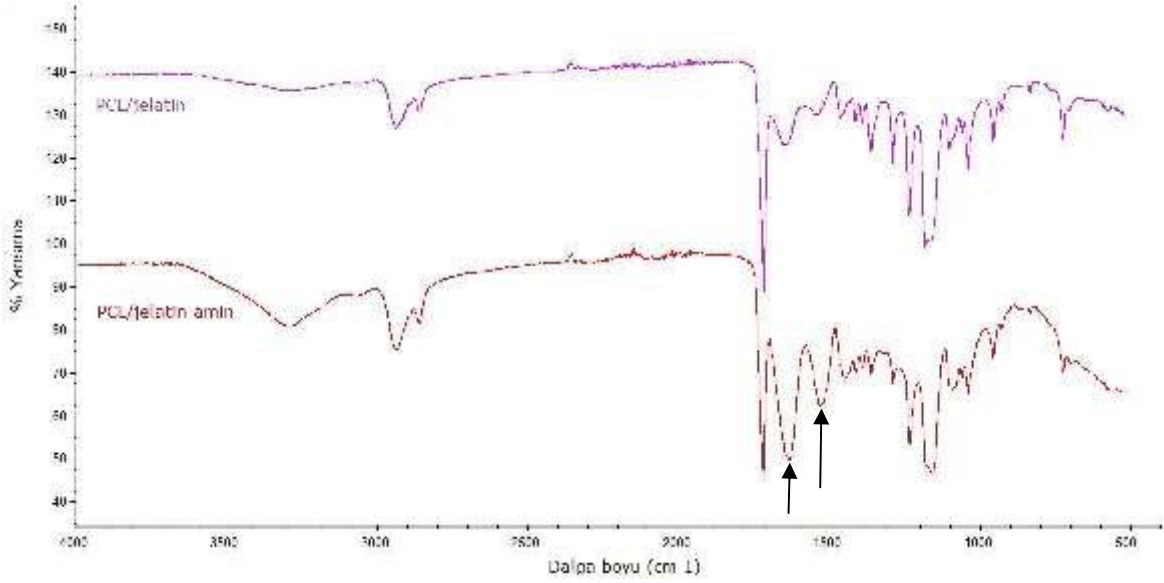
Şekil 4.9. PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerine ait ATR-FTIR analizleri.

PCL/jelatin doku iskelesi içerisindeki jelatin protein yapısını temsil eden karakteristik pikler ise Amid I ve Amid II bağlarındaki gerilmeden kaynaklanan ve sırasıyla 1646 cm^{-1} , 1537 cm^{-1} dalga boylarında yer alan piklerdir. Her iki yapıya ait spektrumlar karşılaştırılarak PCL/jelatin içerisindeki jelatin varlığı kalitatif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9).

Yüzeylerine amin grupları bağlanmış PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerinin yüzey analizleri yine ATR-FTIR spektrofotometresiyle yapılmıştır. PCL doku iskelesi yüzeyine bağlanan amin gruplarına ait pik Şekil 4.10'da okla gösterilmektedir. 1581 cm^{-1} dalga boyunda oluşan bu pikin Amid I ve Amid II bağlarının gerilmesinden gelen piklerin birleşimi olduğu, yada amin gruplarını aktive etmek için kullanılan NHS'in yapısında yer alan C=O gruplarından kaynaklanan pikle birleştiği düşünülmektedir.



Şekil 4.10. Amin grupları bağlanmış ve bağlanmamış PCL nanofibröz doku iskelelerinin ATR-FTIR analizleri.



Şekil 4.11. Amin grupları bağlanmış ve bağlanmamış PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerinin ATR-FTIR analizleri.

Şekil 4.11’de ise amin grupları bağlanan PCL/jelatin doku iskelesinin Amid I ve Amid II bağ gerilmelerinden kaynaklanan piklerinde şiddet artışı görülmektedir. Bunun nedeni PCL yüzeyine bağlanan amin gruplarından kaynaklanan artıştır.

4.2.4. Floresan Spektrofotometre ile EGF’in Kantitatif Tayini

PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerine bağlanan EGF miktarı, oligopeptidin floresan özellik gösteren triptofan uçları üzerinden, floresan spektrofotometreyle kantitatif olarak tayin edilmiştir. 10 µg/ml EGF çözeltisi kullanılarak, doku iskelelerine EGF immobilize edilmiş ve immobilize olan EGF miktarı, başlangıç floresan şiddetinden immobilizasyon işlemi sonrasında kalan çözeltinin floresan şiddeti çıkartılarak hesaplanmıştır. Immobilizasyon verimliliği ise, immobilize olan miktarın başlangıçtaki EGF miktarına oranının %’si şeklinde tanımlanmış ve hesaplanmıştır. Bulunan değerler Çizelge 4.4’de sunulmuştur. Bu değerler doku iskelelerine immobilize olmuş gerek PCL gerekse PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerine yüksek oranda EGF’in immobilize olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.4. Nanofibröz doku iskelelerine immobilize olan EGF miktarları ve % immobilizasyon verimliliği değerleri.

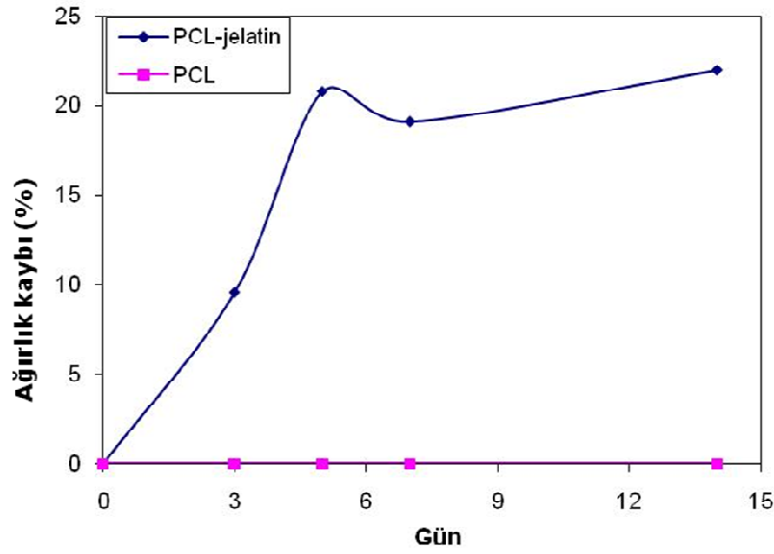
Nanofibröz doku iskelesi	İmmobilize EGF miktarı (µg/g doku iskelesi)	İmmobilizasyon verimliliği (%)
PCL	1.75 ± 0.01	97.82 ± 0.14
PCL-jelatin	5.83 ± 0.01	99.10 ± 0.08

4.2.5. Biyobozunurluk Çalışmaları

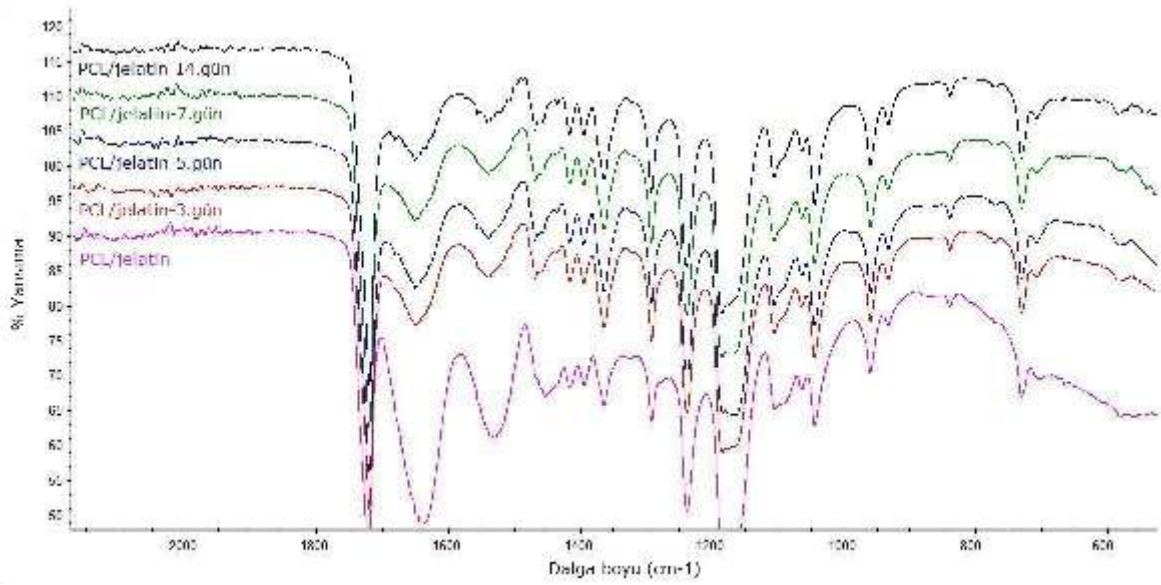
PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerinin biyobozunurluk çalışmaları, DMEM besi ortamı varlığında ve 37°'de CO₂ etüvü içerisinde gerçekleştirilmiştir. PCL'in bozunma mekanizması PLA ve PGA gibi diğer alifatik poliesterlere benzemektedir. Bozunma sırasında ester bağları hidrolize uğrar ve zincirler ayrılarak karboksilik asit ve alkol açığa çıkar [161]. Jelatin ise hidrolize uğrayarak yapısındaki amino asitlere parçalanır [162].

Şekil 4.12'de PCL ve PCL/jelatin doku iskelelerinin, ağırlık kaybına bağlı bozunma yüzdelere ait grafik yer almaktadır. PCL/jelatin doku iskelelerinin %20'sinin ilk beş günlük periyotta doğrusal hızlı bir şekilde bozunmaya uğradığı, 7. günden itibaren de bozunmanın yavaşladığı görülmektedir. PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerindeki %50 oranındaki jelatinin tamamının bozunmamasının nedeni, PCL ve jelatinin homojen bir şekilde karışması ve fiberlerin iç kısmında yer alan jelatinin hidrolizinin zorlaşması olarak açıklanabilir.

Şekil 4.12'de de görüldüğü gibi fibröz yapıdaki PCL doku iskeleleri 14 günlük sürede bozunmaya uğramamıştır.



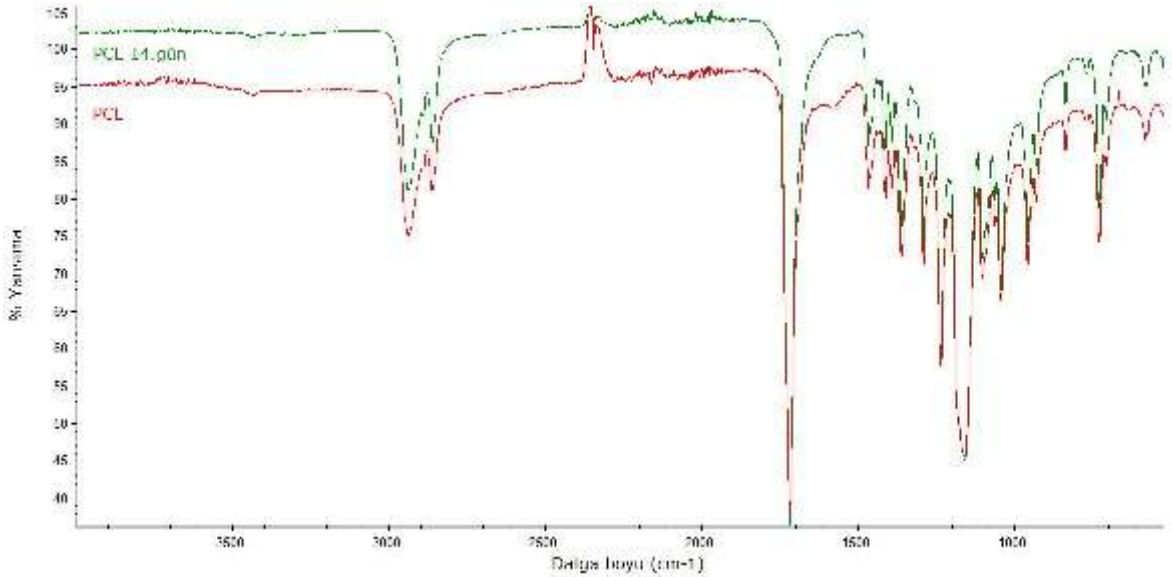
Şekil 4.12. PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerinin 14 günlük süredeki % ağırlık kaybı.



Şekil 4.13. PCL/jelatin doku iskelelerinin bozunma öncesi ve 3., 5., 7., 14. günlerdeki bozunmalarına ait FTIR spektrumları.

PCL ve PCL/jelatin doku iskelelerinin bozunmadan önceki ve sonraki kimyasal yapılarının incelenmesi için ATR-FTIR analizi yapılmıştır (Şekil 4.13). PCL/jelatinin analiz sonuçlarında görülen 1646 ve 1537 cm^{-1} dalga boyu civarındaki piklerin yüksekliği, 14. günün sonuna kadar kademeli olarak azalmıştır. Bu dalga boylarındaki pikleri temsil eden Amid I ve Amid II bağ şiddetlerinde meydana gelen azalma, jelatinin bozunarak amino asitlerine ayrılmaya başladığını göstermektedir.

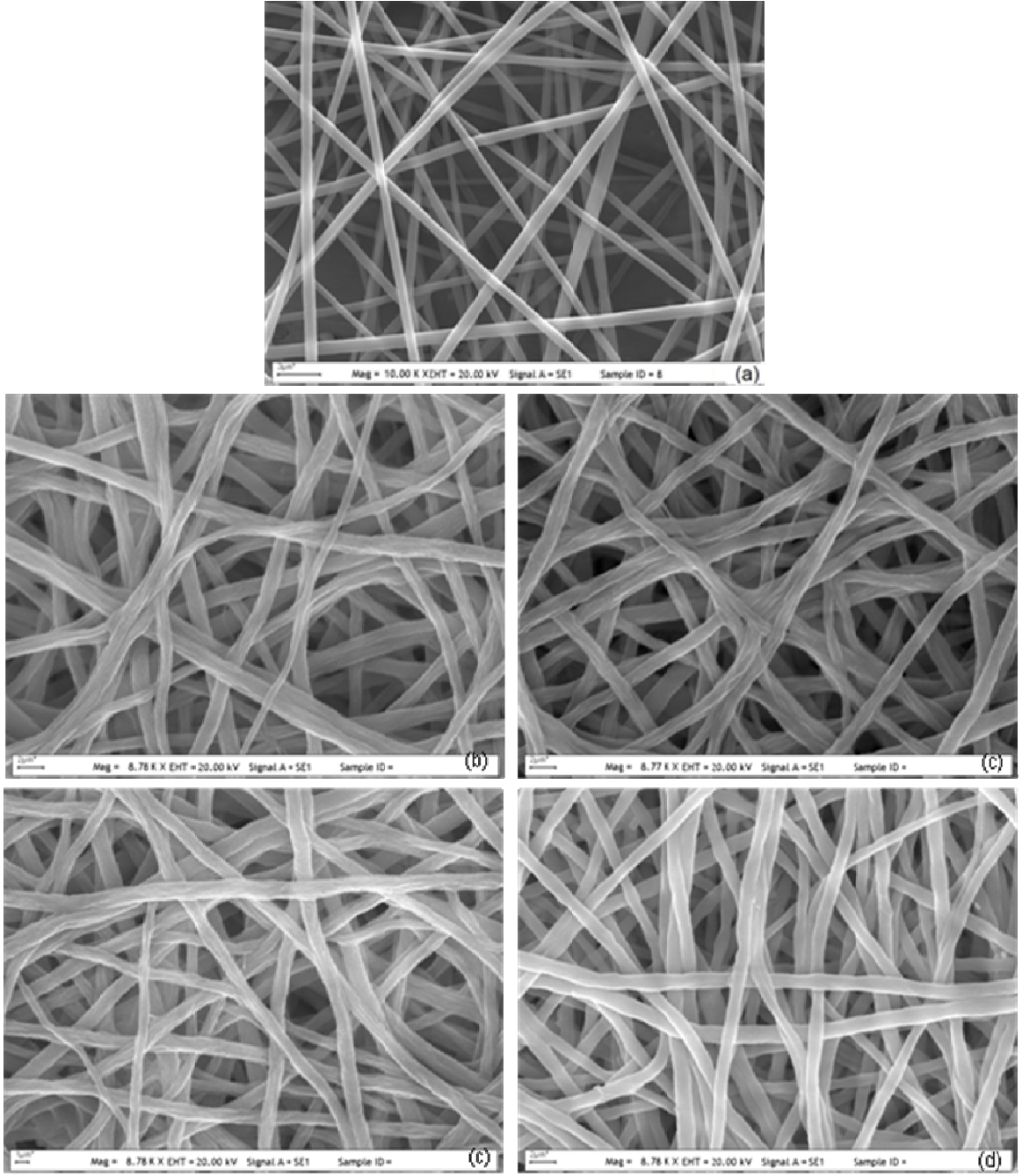
PCL doku iskelelerinin degradasyon öncesi ve sonrası yapılarının incelenmesi için yürütülen FTIR analizinden elde edilen spektrumlar Şekil 4.14'de verilmiştir. Hidrolitik bozunma sonucu oluşan ürünlerinde yer alan COOH ve OH gruplarına bağlı olarak, spektrumda 2866 cm^{-1} ve 2943 cm^{-1} dalga boyları civarında oluşan piklerde artış beklenmektedir [161]. Şekil 4.14'de 14 günün sonundaki PCL doku iskelelerinde, bozunma öncesi PCL doku iskelelerine göre 2866 cm^{-1} ve 2943 cm^{-1} dalga boylarındaki piklerde kayda değer bir artış görülememektedir. Sonuç olarak PCL, 14 günlük sürede biyobozunma göstermemiştir denilebilir. Zaten bu da beklenen bir durumdur.



Şekil 4.14. Bozunma öncesi ve 14 gün süresince bozunmaya uğratılmış PCL doku iskelelerine ait FTIR spektrumları.

Hidrofilik özelliğe sahip polimerlerde su, yapıdan içeri girerek polimerin şişmesine neden olur. Su girişi, polimerin kimyasal bozunmasını tetikleyerek yığın yapıda gözenekler oluşturur ve yapının oligomer ve monomerlerine ayrışmasına neden olur. Kimyasal bağ yapıları, yapının bileşimi ve su alımı, bozunma reaksiyonlarının hızına etki eden önemli faktörlerdir. Tipik yığın bozunma reaksiyonlarından farklı olarak nanofibröz doku iskelelerinde yüzey erozyonu gözlenmektedir. Polimer matrisinin kimyasal bağlarının bozunma hızı ve suyun polimer matrisi içerisine dağılma hızı arasındaki fark birçok biyobozunur polimerin bozunma mekanizmasını tanımlamaktadır. Yüzey erozyonuna bağlı bozunma mekanizmasında yapıya su girişi olduğunda matris yıkılması daha yavaş gerçekleşmektedir [Cui et. al.] Bu durum nanofibröz yapıların yüzeyine protein immobilizasyonu yapılarak yüzeylerin hidrofilik hale getirilmesiyle çözülebilmektedir. Hidrofilik hale gelen yüzey daha hızlı su girişine izin vereceğinden bozunma hızı artacaktır [Ma et. al. (2005a)]. Bu nedenle PCL nanofibröz doku iskeleleri 14 günlük periyod boyunca bozunma göstermemekte, fakat PCL/jelatin karışımı doku iskeleleri 14 günlük periyod içerisinde yüzey erozyonuna uğramaktadır.

Jelatin üzerinden bozunmaya uğrayan PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri Şekil 4.15'de yer almaktadır. Bozunma öncesi ve 3, 5, 7, 14. günlerin sonunda bozunmaya uğramış doku iskelelerinin SEM görüntülerinden de anlaşıldığı üzere PCL/jelatin yüzeysel bir bozunmaya uğramıştır. PCL ile homojen bir şekilde karışan jelatin fiber boyunca homojen bozunma göstermektedir.



Şekil 4.15. 14 günlük bozunma periyodu içerisinde, PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerine ait SEM görüntüleri ((a) bozunma öncesi (X10000), (b) 3.gün, (c) 5.gün, (d) 7.gün, (e) 14.gün (X8780)).

4.2.6. Su Temas Açısı Ölçümleri

PCL ve PCL/jelatin doku iskeleleri üzerinde yapışık damla metoduyla gerçekleştirilen su temas açısı ölçümlerinin sonuçları Çizelge 4.5’de görülmektedir. Nanofibröz doku iskeleleri literatürle paralel olarak hidrofobik özellik göstermektedir [163]. Bunun nedeni artan nano yapılarla doğru orantılı olarak hidrofobisitenin artmasıdır. Hidrofobik özelliğe sahip PCL, hidrofilik jelatin ile karıştığında su temas açısı düşmektedir. Ayrıca yüzeye immobilize edilen amin grupları yüzeyi aktif hale getirdiğinden yine temas açısını azaltmıştır. EGF immobilizasyonu sonrasında ise damlatılan damla yüzey tarafından tamamen emilmiş ve temas açısı 0° olarak ölçülmüştür. EGF gibi protein yapılar yüzeylerin hidrofilitesini yüksek oranda arttırdığından yüzey temas açısı sıfırlanmaktadır [38].

Çizelge 4.5. Nanofibröz doku iskelelerine ait su temas açısı değerleri.

Nanofibröz doku iskelesi	Su temas açısı (θ)
PCL	133.0 $\pm$ 0.2
PCL-amin	121.6 $\pm$ 1.6
PCL-EGF	0
PCL-jelatin	125.0 $\pm$ 1.7
PCL-jelatin-amin	86.7 $\pm$ 2.4
PCL-jelatin-EGF	0

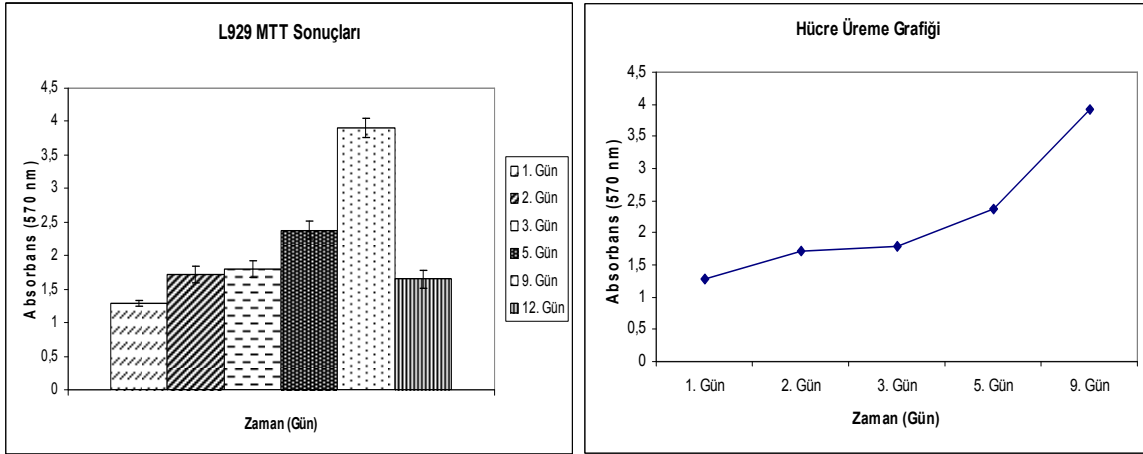
4.2.7. Gözeneklilik Ölçümleri

Doku iskelelerinin gözeneklilik özelliklerinin belirlenebilmesi için yapılan analizde PCL ve PCL/jelatin doku iskelelerinin sahip olduğu % gözeneklilik değerleri, Bölüm 3.3.2.1’de anlatılan yöntem ile, sırasıyla, 79 ve 68 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, % gözenekliliğin fiber çapıyla ters orantılı olarak değiştiğini göstermiştir. PCL doku iskelelerinin içerisinde yer alan nano ölçekteki fiberler dağılım açısından PCL/jelatin karışımı halinde hazırlanan doku iskelelerine göre daha fazla olduğundan, bu doku iskelelerinin gözenekliliği daha fazladır. Literatürde % 65 ve üzeri gözenekliliğe sahip olan doku iskelelerinin kütle aktarımı ve gaz geçişine izin verdiği bilinmektedir. Bu nedenle, hücre kültürü analizinden elde edilen sonuçlar da göz önünde bulundurularak elde edilen gözeneklilik sonuçlarının, hücre infiltrasyonu, besin ve atık aktarımı için yeterli olduğu düşünülmektedir.

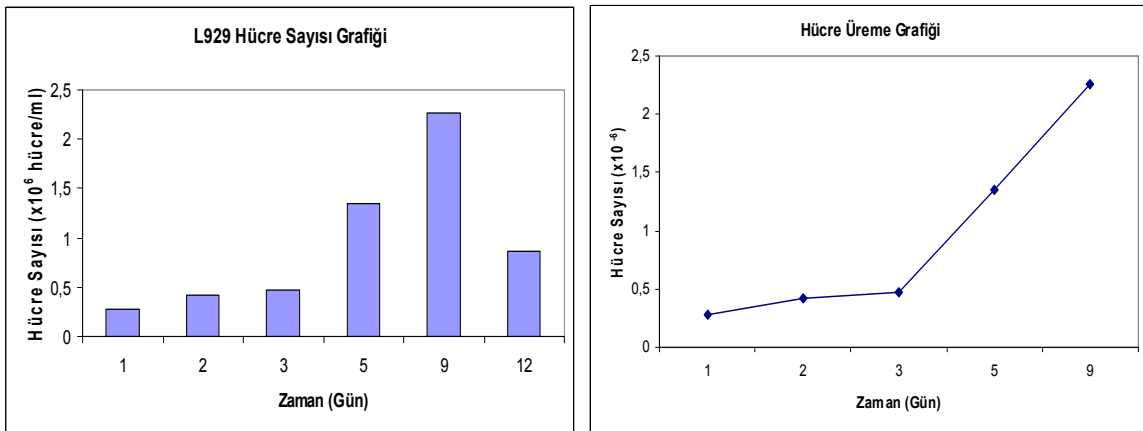
4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.3.1. L929 Hücre Hattının Karakterizasyon Çalışmaları

Tez kapsamında yapılan hücre kültürü çalışmaları fare bağdokusuna ait fibroblast hücrelerinden elde edilmiş L929 hücre hattı ile yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucu elde edilen MTT ve hücre sayım değerleri, Şekil 4.16 ve 4.17’de verilmiştir. Bu grafiklerden de görülebileceği gibi, hücreler kültürün 3. gününde üstel üreme fazına (logaritmik faz) geçmişlerdir. 9. günden sonra üreme yavaşlamıştır. 12. gün değerleri ise hücrelerin ölüm fazında olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.16. L929 hücrelerine ait MTT sonuçları.



Şekil 4.17. L929 hücrelerine ait hemositometrik sayım sonuçları.

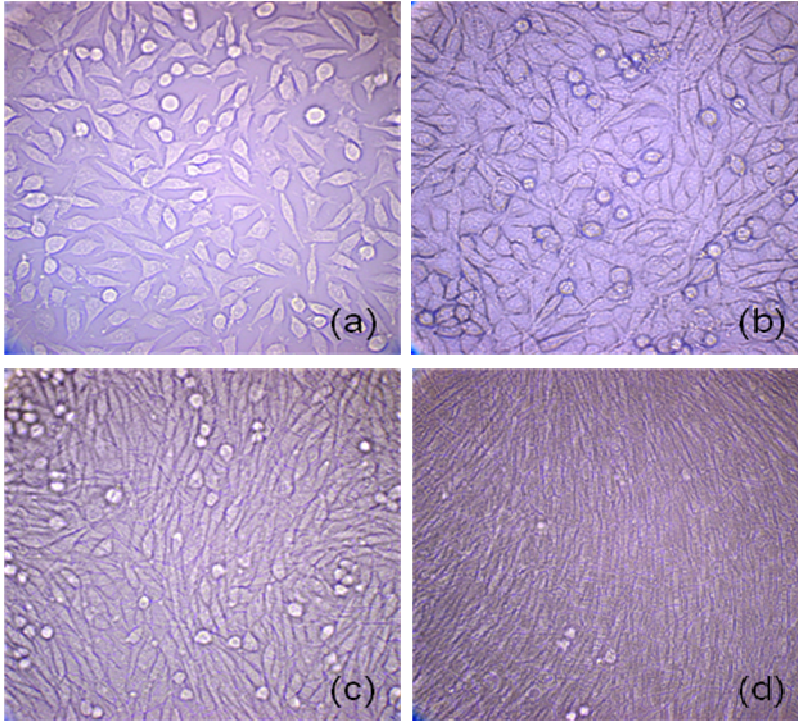
Logaritmik fazda, hücelere ait ikilenme süresi 4.2. numaralı denklik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$dx/dt = \mu x/dt \quad (4.1)$$

Bu denklik düzenlendiğinde;

$$\mu t = \ln x \quad (4.2.)$$

şekline dönüşmektedir. Burada x; hücre sayısını, μ ; özgül üreme hızını ve t ise zamanı göstermektedir. Başka bir deyişle, zamana karşı $\ln x$ değerleri grafiğe geçirildiğinde eğim, özgül üreme hızını vermektedir. Çalışmamızda, L929 fare fibroblast hücre hattı için özgül üreme hızı 0.016 sa^{-1} ikilenme süresi ise 43 sa olarak bulunmuştur. Hücrelerin invert mikroskop altında günlük gözlemleri yapılmış; 1, 3, 5 ve 9. günlerde sahip oldukları morfoloji ve yayılımlara ait görüntüler Şekil 4.18'de verilmiştir.



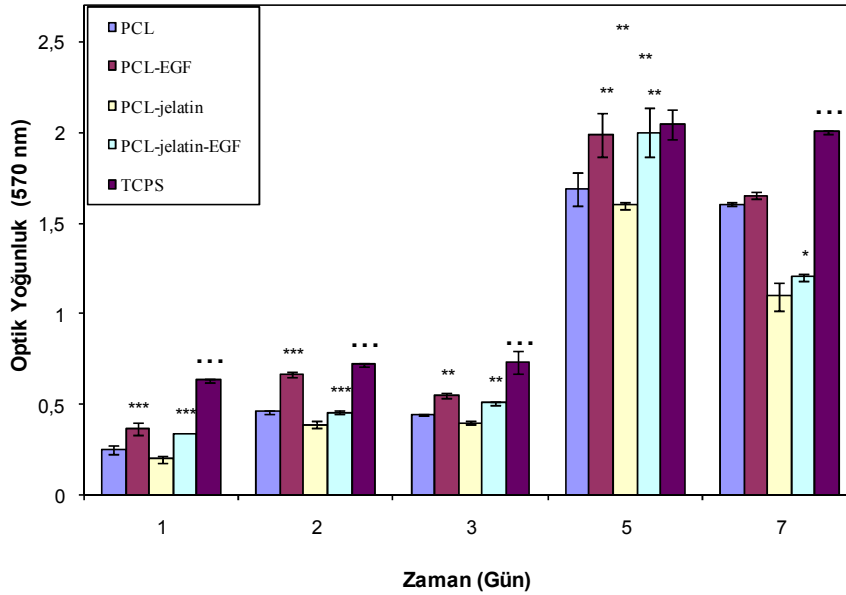
Şekil 4.18. Kültür kabındaki L929 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri (x20); (a) 1. gün, (b) 3. gün, (c) 5. gün, (d) 9.gün.

Şekil 4.18'den açıkça görüldüğü üzere hücreler düzgün fibroblastik morfolojiye sahiptirler. Birinci gün sonunda hücrelerin çoğu yüzeye yapışıp yayılarak fibroblastik morfolojilerini kazanmışlardır. İlerleyen zamana bağlı olarak hücreler arası boşluklar tamamiyle dolmuş ve 9. günde “confluent kültür” oluşmuştur. Bundan sonra ölüm fazı başlamıştır.

4.3.2. Nanofibröz Doku İskeleleri Üzerinde L929 Hücre Hattı İle Yapılan Çalışmalar

4.3.2.1. MTT Analizi

Çalışmalar 5 grup örnek ile yapılmıştır. Bunlar, PCL, PCL/jelatin, EGF immobilize edilmiş PCL, EGF immobilize edilmiş PCL/jelatin matrisler ve kontrol grubu olarak kullanılan TCPS'dir. L929 hücre hattı ile yapılan MTT analizinin sonuçları Şekil 4.19'da zamana karşı optik yoğunluk değerlerinin değişimi şeklinde verilmiştir.



Şekil 4.19. MTT analizi ile hücre canlılığı ve üremesinin takibi (istatistiksel önem farklılığı n=3, * için p<0.05, ** için p<0.01, *** için p<0.001 olup PCL ve PCL/jelatin kendi aralarında kontrol grubudur. *** için p<0.001 olup TCPS kontrol grubudur.

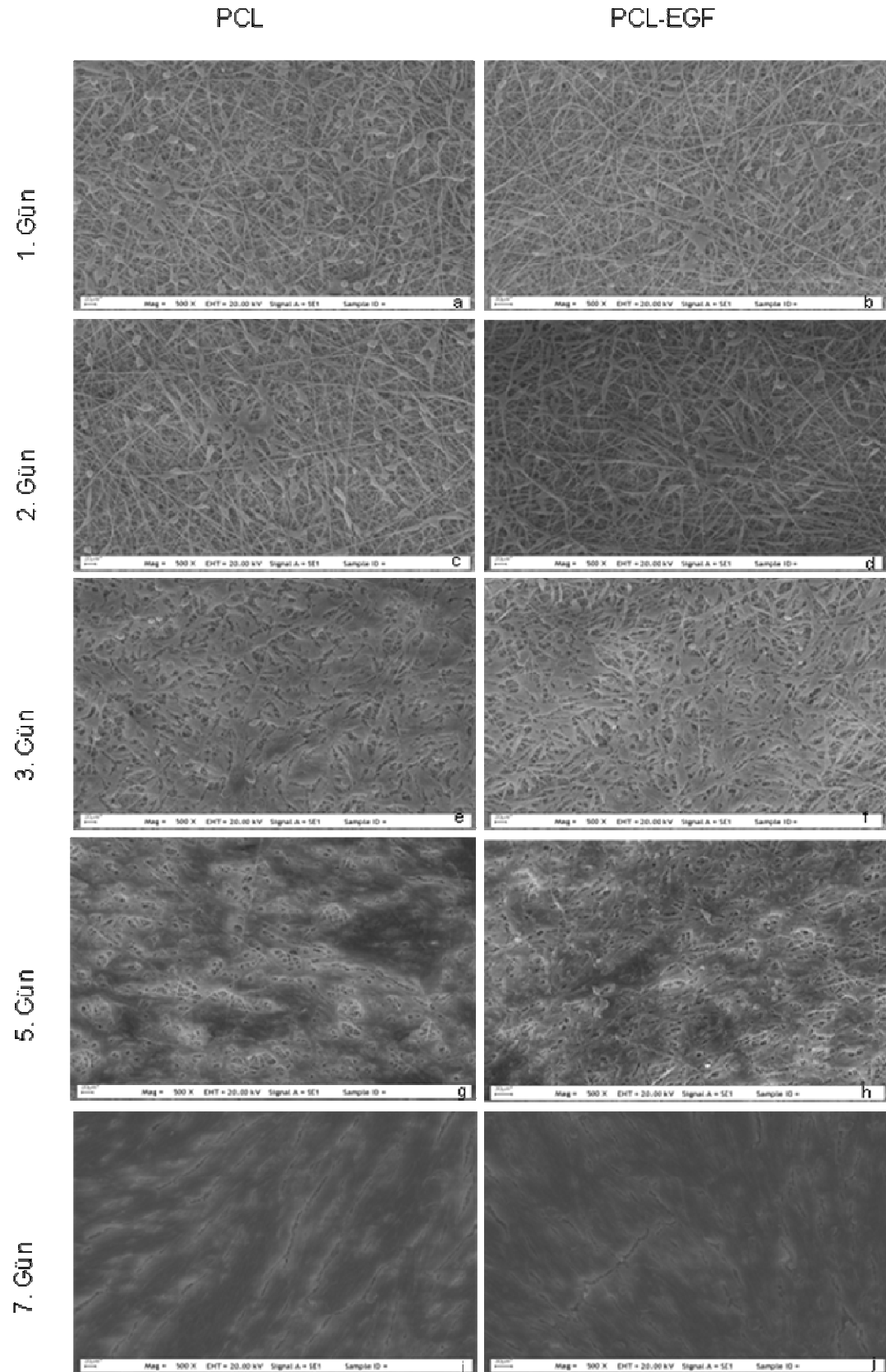
Şekil 4.19'da, 1. günün sonunda görülen absorbands artışından fibroblast hücrelerinin tüm yüzeylerde yapıştığı anlaşılmaktadır. 5. günde ise absorbands değerleri maksimum değerlerine ulaşmıştır. Absorbans değerlerindeki bu artış PCL ve PCL/jelatin doku iskelelerinin fibroblast hücrelerinin yapışma, yayılma ve üremelerini desteklediğini göstermektedir. Doku iskelelerine immobilize edilen EGF'in ise, boş olan doku iskelelerine oranla hücre üremesini daha çok arttırdığı görülmektedir. PCL ve EGF immobilize edilmiş PCL nanofibröz doku iskelelerinde görülen hücre üremesi, PCL/jelatin ve EGF immobilize edilmiş PCL/jelatin doku iskelelerine göre 5. güne kadar daha yüksek değerlerde seyretmiştir. 5. günün sonunda EGF immobilize edilmiş PCL/jelatin doku iskeleleri üzerindeki hücre üremesine bağlı absorbands değerleri, EGF immobilize edilmiş PCL doku iskelelerinden elde edilen absorbands değerlerine yaklaşmıştır.

Yapılan çalışmanın sonunda, EGF immobilize edilmiş doku iskeleleri hücre aktivitesi ve uygun morfolojinin elde edilmesi açısından daha başarılı bir substrat olma özelliği taşıdığı görülmektedir. Absorbans değerlerinden, EGF'in hücre yapışmasını ve üremesini önemli ölçüde arttırdığı görülmektedir (Şekil 4.19).

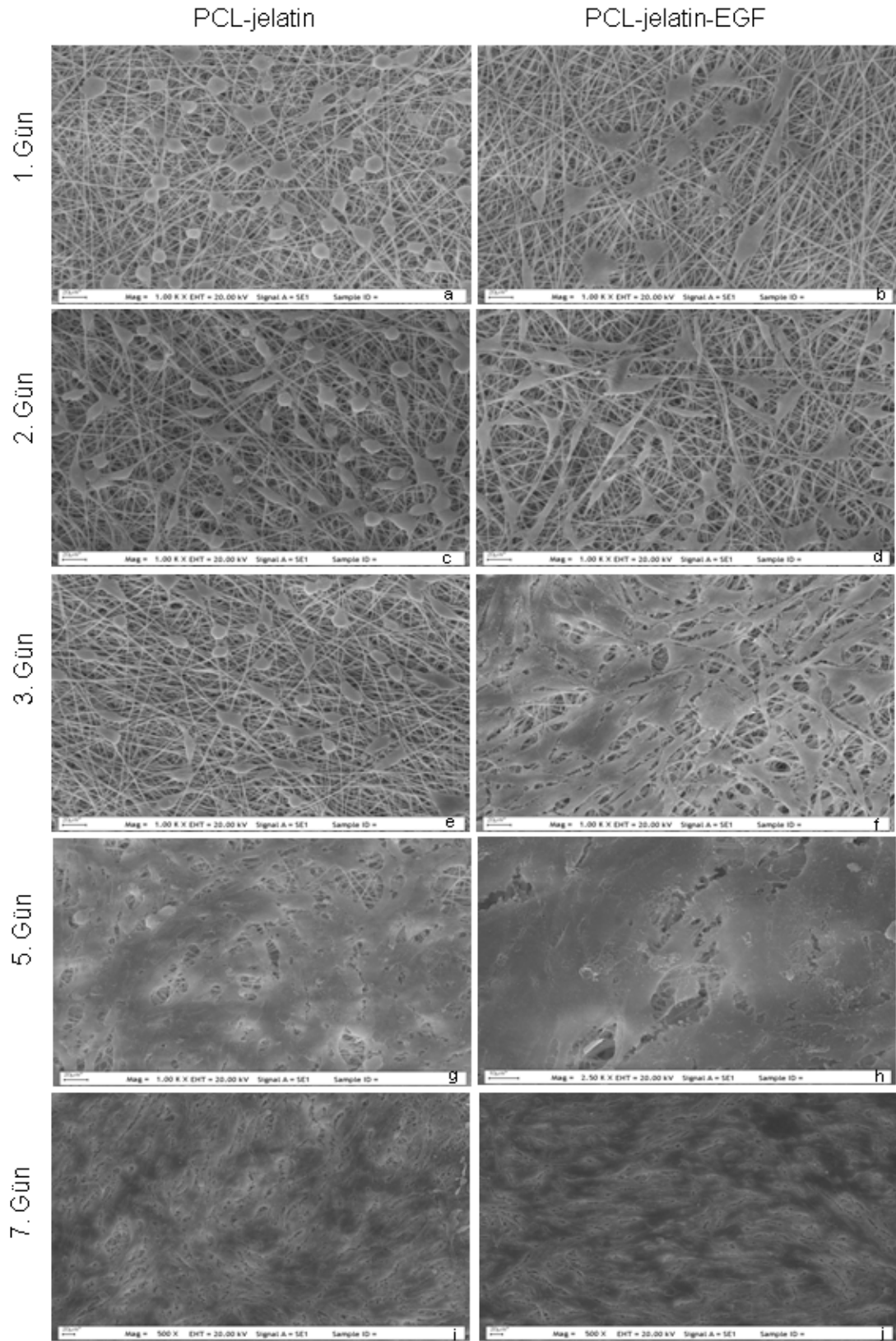
4.3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Analiz

PCL, EGF immobilize edilmiş PCL, PCL/jelatin ve EGF immobilize edilmiş PCL/jelatin nanofibröz doku iskeleleri üzerindeki, L929 hücrelerinin, kültürasyonun 1., 2., 3., 5. ve 7. günlerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.20 ve Şekil 4.21’de verilmiştir. Kültürün ilk 3. gününde, EGF immobilize edilmiş PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerinin üzerindeki L929 hücreleri hızla yapışıp yayılırken, EGF immobilize edilmemiş doku iskeleleri üzerindeki hücre yayılmasının daha yavaş olduğu görülmektedir. EGF immobilize edildikten sonra yüzeyleri hidrofilik özellik kazanan doku iskeleleri üzerindeki hücreler orjinal fibroblastik hücre morfolojisine sahip, hızlı yapışıp üreyen hücreler haline gelmiştir. Bu hızlı üreme eğilimi MTT sonuçlarına da yansımıştır. Kültürün 5. gününden itibaren hücre morfolojilerindeki fark ortadan kalkmış, 7. günün sonunda ise doku iskelelerinin yüzeyi tamamen hücreler ve hücrelerin ürettiği ECM proteinleriyle kaplanmıştır. Yara iyileşme sürecinin erken evrelerinde etkili olan EGF, yara alanına fibroblast göçünü artırarak burada kollajen sentezlenmesine neden olmaktadır [164]. Böylece yara erken kapanmakta ve iz oluşumu riski azalmaktadır. SEM görüntülerinden de anlaşılabileceği üzere EGF gücünü doku iskelelerinin nano ölçekteki fibröz yapısıyla birleştirerek ilk üç güne ait hücre yapışması ve yayılmasında etkili olmuş ve hücrelerin ECM matris salgılama oranlarını arttırmıştır.

Yapılan SEM analizlerinden, hücrelerin nanofibröz membranların yüzeylerinde yapışıp ürettiği tespit edilmiştir. Ayrıca membranların nano ölçeğe sahip yapısı hücre yapışması ve üremesini desteklemektedir. Membran şeklindeki 2 boyutlu yapılar yara örtüsü uygulamalarında, yara bölgesine hücre göçünü sağlamak açısından idealdir. Elektroeğirme ile üretilen matrisler 2 boyutlu membranların yanı sıra diğer doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak 3 boyutlu doku iskelesi şeklinde üretilmektedir. 2 boyutta gözeneklilik özellikleri sınırlı kalan nanofibröz membranlar, 3 boyutlu üretildiklerinde diyabetik deri ülseri veya dermisi de kapsayan derin yanık ve yaralar için kullanılabilir. Bu nedenle, elektroeğirme yöntemi ile üretilen 2 boyutlu membranlar epidermal yara örtülerine yönelik hücre matrisi olarak ihtiyaca hizmet etmektedir.



Şekil 4.20. PCL (a, c, e, g, i) ve PCL-EGF (b, d, f, h, j) doku iskeleleri üzerindeki L929 hücrelerinin morfoloji ve yoğunluklarına ait SEM görüntüleri (X500).

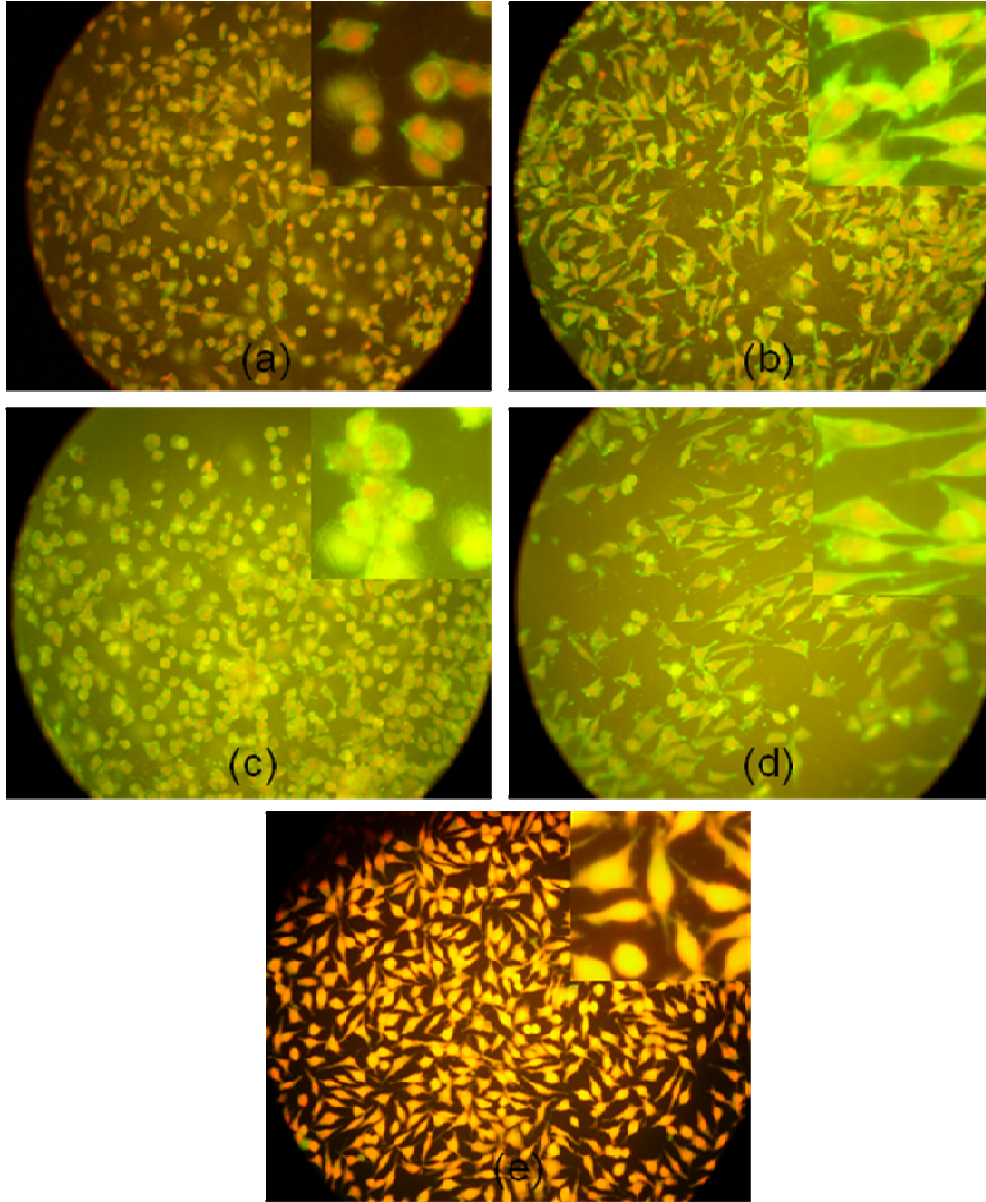


Şekil 4.21. PCL/jelatin (a, c, e, g, i) ve PCL/jelatin-EGF (b, d, f, h, j) doku iskeleleri üzerindeki L929 hücrelerinin morfoloji ve yoğunluklarına ait SEM görüntüleri (X1000, X2500, X500).

4.3.2.3. İmmüno-floresan boyama

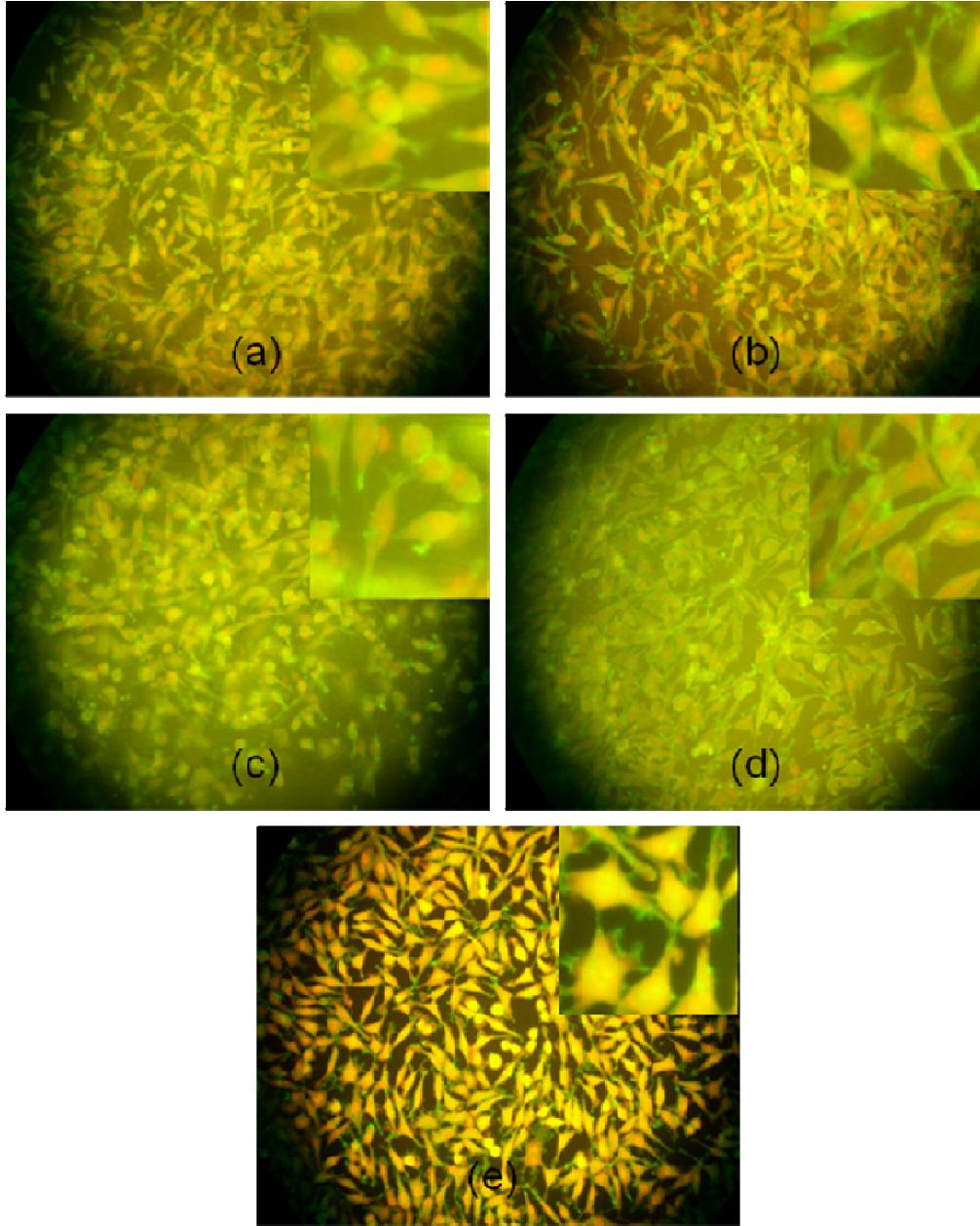
PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskeleleri yüzeyindeki hücrelerin yoğunluğu ve morfolojileri immüno-floresan boyama ile görünür hale getirilmiştir. PCL, PCL/jelatin, EGF immobilize edilmiş PCL, EGF immobilize edilmiş PCL/jelatin ve TCPS yüzeyindeki hücrelerin boyamaları 1., 2., 3. ve 5. günlerde yapılmıştır. Floresan mikroskobu ile çekilen görüntüler, EGF immobilize edilen doku iskelelerinde diğer iskelelere oranla hücre yoğunluğunun daha hızlı arttığını göstermektedir.

PCL doku iskelelerinin hücre morfolojisi ve yoğunluğu bakımından PCL/jelatin doku iskelelerine üstünlük sağladığı görülmektedir. Bunun nedeni PCL nanofibröz yapılar içerisinde nanometre bazında düşük çaplara sahip fiberlerin dağılımının yüksek olmasıdır. Dolayısıyla, hücreler nanofibröz yapıdaki fiber çapı azaldıkça, bu yüzeylere daha iyi yapışma ve yayılma eğilimi göstermektedirler. SEM görüntüleri ve MTT sonuçları da floresan görüntülerle karşılaştırıldığında birbirini desteklemektedir.



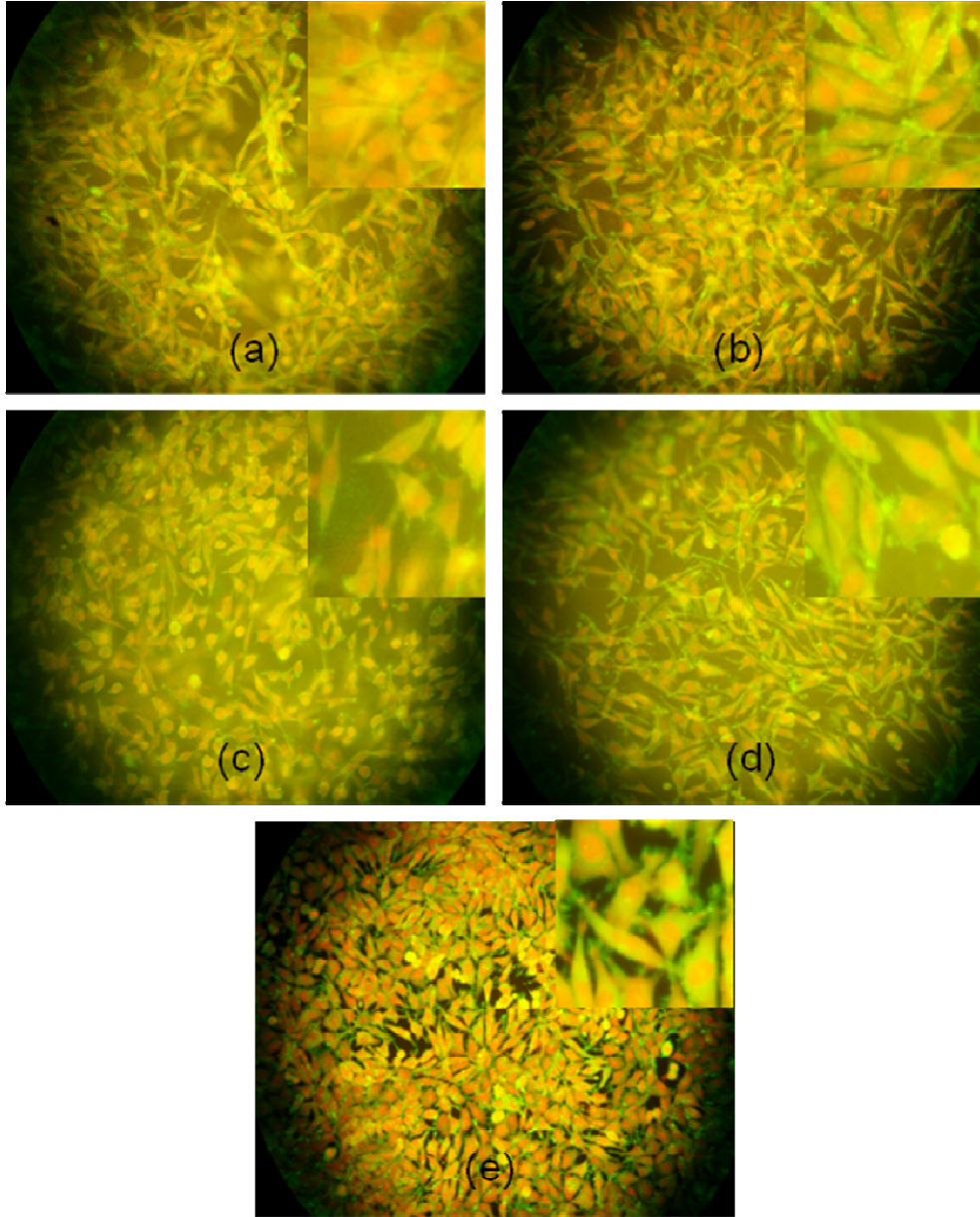
Şekil 4.22 İmmüno-floresan boyama ile elde edilmiş 1. gün görüntüleri; (X20, X40) (a) PCL, (b) PCL-EGF, (c) PCL/jelatin, (d) PCL/jelatin-EGF, (e) TCPS.

1. gün sonunda EGF immobilize edilmemiş PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerindeki hücreler küresel morfoloji gösterirken (Şekil 4.22-a,c), EGF immobilize edilmiş doku iskeleleri üzerindeki hücreler iç şeklindeki fibroblastik morfolojiyi kazanmıştır (Şekil 4.22-b,d). Kontrol grubu olan TCPS yüzeyinde ise hücreler, yapışmaya ve yayılmaya başlamışlardır.



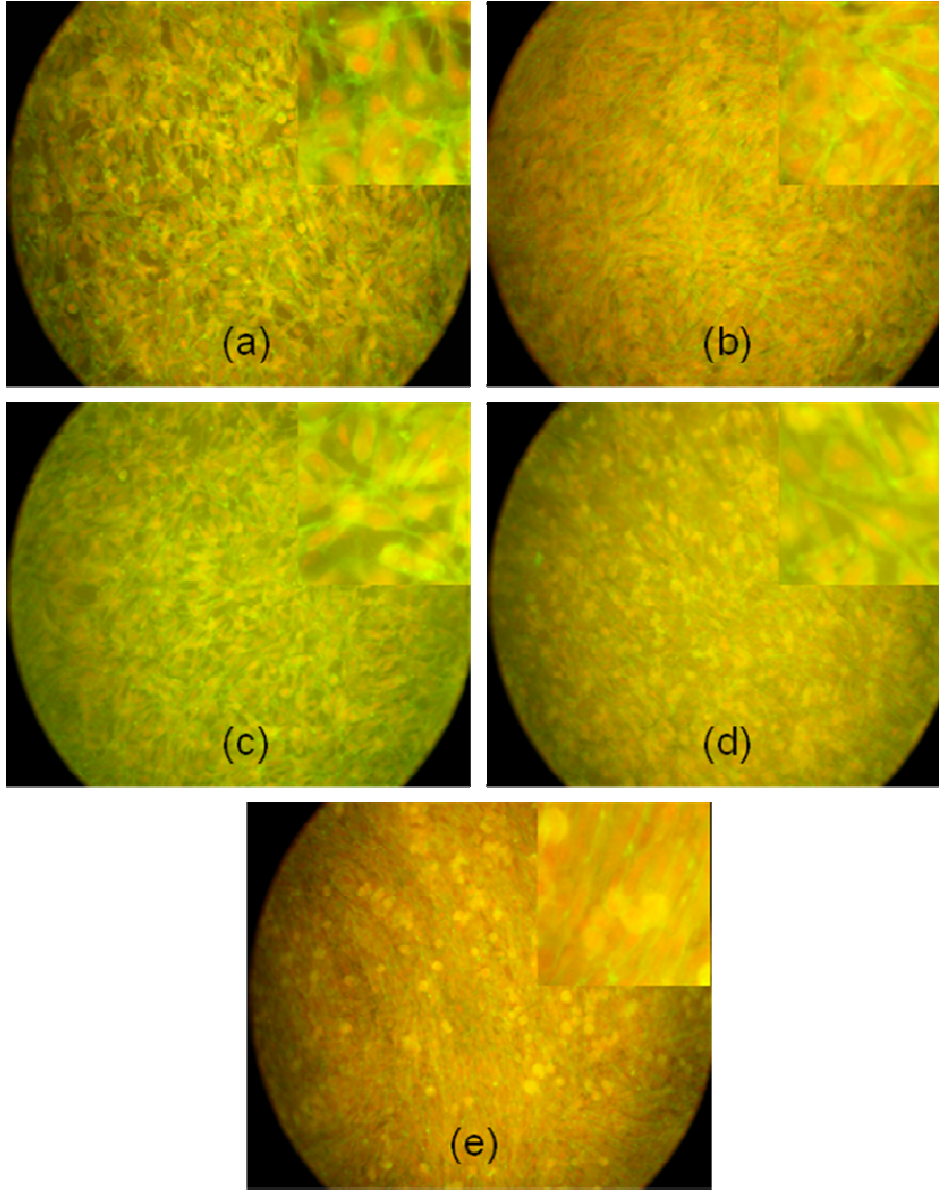
Şekil 4.23. İmmüno-floresan boyama ile elde edilmiş 2. gün görüntüleri; (X20, X40) (a) PCL, (b) PCL-EGF, (c) PCL/jelatin, (d) PCL/jelatin-EGF, (e) TCPS.

2. günün sonunda EGF immobilize edilmemiş doku iskeleleri üzerindeki hücreler iğ şeklini alırken bir yandan da nanofibröz membran içerisine az miktarda göç etmeye başlamışlardır (Şekil 4.23-a,c). EGF immobilize edilmiş iskeleler üzerindeki hücreler (Şekil 4.23-b,c), kontrol grubu olan TCPS yüzeyindeki hücelere nazaran tam bir fibroblastik morfoloji göstermektedir (Şekil 4.23.e).



Şekil 4.24 İmmüno-floresan boyama ile elde edilmiş 3. gün görüntüleri; (X20, X40) (a) PCL, (b) PCL-EGF, (c) PCL/jelatin, (d) PCL/jelatin-EGF, (e) TCPS.

TCPS yüzeyindeki hücreler 3.günün sonunda tek tabaka olmaya yaklaşmışken (Şekil 4.24-e), diğer doku iskeleleri hücre yoğunluğunu yakalayamamıştır. EGF immobilize edilmiş doku iskelelerinde (Şekil 4.24-b,d) hücreler 2. günde olduğu gibi yüzeyde üremelerine devam ederken, EGF immobilize edilmemiş doku iskeleleri üzerinde bulunan hücreler doku iskelelerinin içine penetre olmaya başlamışlardır (4.24-a,c).



Şekil 4.25. İmmüno-floresan boyama ile elde edilmiş 5. gün görüntüleri; (X20, X40) (a) PCL, (b) PCL-EGF, (c) PCL/jelatin, (d) PCL/jelatin-EGF, (e) TCPS.

5. günün sonunda ise EGF'li doku iskeleleri ve TCPS tek tabaka hücre yoğunluğuna ulaşırken (Şekil 4.25-b,d,e) EGF immobilize edilmemiş hücrelerin yüzeyinde boşluklar bulunmaktadır (Şekil 4.25-a,c). Özellikle EGF immobilize edilmiş doku iskeleleri ve TCPS'de yer alan hücreler, hücre-hücre etkileşimini gerçekleştirerek ekstraselüler matris sentezlemeye başlamıştır.

Tez kapsamında yapılan tüm çalışmaların ışığında, PCL ve PCL/jelatin nanofibröz matrislerin fibroblastik hücre yapışmasını ve üremesini desteklediği görülmüştür.

PCL/jelatin nanofibröz matrislerin, jelatin varlığı nedeniyle PCL matrislere göre hidrofilisiteleri daha yüksektir ve bu nedenle PCL/jelatin yapılar, hücre yapışması ve yayılmasını önemli ölçüde destekler. Yapıya jelatin katılmasıyla, PCL/jelatin nanofibröz matrislerin biyobozunurluğu artmaktadır. Polimer karışımı içerisindeki jelatin oranı ayarlanarak yapının biyobozunurluk süresi değiştirilebilmektedir. SEM, immüno-floresan görüntüler ve biyobozunurluk çalışmaları göz önünde bulundurulursa, PCL/jelatin nanofibröz matrisler üzerindeki hücre üreme hızı, kısa dönem kullanılacak doku iskeleleri için oldukça uygundur.

Jelatinin yapısında var olan amin grupları, PCL matrislerin aksine, herhangi bir aminoliz işlemine ihtiyaç duyulmadan kovalent immobilizasyon gerçekleştirmeye olanak sağlamaktadır. Bu nedenle PCL/jelatin matrislere ek bir aminleme basamağı uygulamadan EGF immobilizasyonu gerçekleştirilebilmektedir.

Elektroeğirme ile üretilen PCL/jelatin nanofibröz yapılar, jelatinden kaynaklanan viskozite artışından dolayı, PCL nanofibröz yapılara göre daha düzgün morfolojide ve eş boylu çaplarda üretilmiştir.

Nanofibröz matrislerin yüzeyine immobilize edilen EGF molekülleri ile hücrelerin yüzeyinde bulunan EGF reseptörlerinin etkileşimi sonucu, hücrelerin fibroblastik morfoloji kazandığı, yapışma ve üremelerinin hızlandığı görülmüştür. Özellikle biyobozunurluk özelliğinden dolayı PCL/jelatin nanofibröz matrislerin yara örtüsü uygulamaları için ideal bir substrat özelliği taşıdığı tespit edilmiştir.

5. GENEL SONUÇLAR

Tez kapsamındaki çalışmalar dahilinde üretilen ve yüzeylerine EGF immobilize edilen nanofibröz doku iskelelerinin yüzey karakterizasyonları ve hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerden elde edilen sonuçlar aşağıda ayrıntılı bir şekilde özetlenmiştir.

- Elektroeğirme yöntemiyle, membran şeklinde PCL ve PCL/jelatin karışımı nanofibröz membranlar üretilmiştir.
- Nanofibröz membranların uygun fiber morfolojisi ve çaplarda üretimi, elektroeğirme parametrelerinin optimizasyonu ile gerçekleştirilmiştir.
- Elde edilen nanofibröz PCL matrislerin fiber çapları 488 ± 114 nm ve gözenekliliği %79, PCL/jelatin nanofibröz matrislerin fiber çapları ise 663 ± 107 nm ve gözenekliliği %68 olarak ölçülmüştür.
- Nanofibröz matrislerin yüzeyine EGF kovalent immobilize edilmiştir. Kovalent bağlama işlemi PCL yüzeyine amin grupları yerleştirilerek yapılmıştır. Daha sonra PCL ve PCL/jelatin matrislerin yüzeyindeki amin grupları NHS ile aktive edilerek EGF immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.
- Yüzeylere bağlanan amin gruplarının varlığı ninhidrin yöntemi ve ATR-FTIR analizleri ile doğrulanmıştır.
- EGF immobilizasyonu sonrasında PCL ve PCL/jelatin yüzeylere immobilize edilen EGF miktarları sırasıyla 1.75 ± 0.01 ve 5.83 ± 0.01 mg/g'dır.
- EGF ile yüzey modifikasyonundan sonra hidrofobik özellik gösteren PCL ve PCL/jelatin matrislerin tamamen hidrofilik özellik kazandığı görülmüştür.

- Yapılan ölçümlerde su temas açısı değerleri EGF immobilizasyonu öncesinde PCL için 133.0 ± 0.2 derece, PCL/jelatin için 125.0 ± 1.7 derece olarak bulunmuştur. EGF immobilizasyonundan sonra her iki doku iskelesi için yapılan temas açısı ölçümlerinde yüzeylerin tamamen hidrofilik hale geldiği görülmüştür.
- Hücre besisi ortamı DMEM içerisinde gerçekleştirilen 14 günlük biyobozunurluk çalışmalarında PCL doku iskelelerinin bozunmadığı, PCL/jelatin doku iskelelerinin ise %20 oranında bozunmaya uğradığı saptanmıştır. SEM görüntülerinden bozunmanın, matrislerin fibröz yüzeylerinden biyoerozyon şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ATR-FTIR analizleriyle incelenen bozunma karakteristikleri PCL/jelatin doku iskelelerinin bozunduğunu göstermiştir.
- L929 fare fibroblast hücre hattı ile yürütülen hücre kültürü çalışmaları kapsamında yapılan MTT ve SEM analizleri, EGF immobilize edilen doku iskelelerinin edilmeyenlere göre hücre yapışması ve yayılmasını daha fazla desteklediğini göstermiştir.
- EGF, nanofibröz doku iskelelerinin yüzeyine immobilize olduğundan, hücrelerin, EGF immobilize edilmemiş PCL ve PCL/jelatin doku iskelelerine penetre olduğu, EGF immobilize edilen doku iskelelerinin yüzeyinde yapışıp yayıldıkları yapılan immüno-floresan boyama görüntülerinden tespit edilmiştir.
- Sonuç olarak, sunulan tez kapsamında deri doku mühendisliği ve yara örtüsü uygulamalarına yönelik olarak üretilen PCL ve PCL/jelatin nanofibröz doku iskelelerinin yüzeyi EGF ile immobilize edilerek biyoaktiviteleri arttırılmıştır. Yapılan hücre kültürü çalışmaları ile uygulamaya yönelik kullanımlarının uygunluğu araştırılmıştır.

KAYNAK DİZİNİ

- [1] Lee, K.H., Tissue-engineered human living skin substitutes: Development and clinical application, Yonsei Medical Journal, vol.41, no.6, s.774-779, 2000.
- [2] Yannas, I.V., Tissue and organ regeneration, Springer, s.48-50, 2001.
- [3] Wood, E.J., Harris, I.R., Reconstructed human skin: transplant, graft or biological dressing?, Essays Biochem., 29, s.65–85, 1995.
- [4] Kumar, Challa S.S.R. (eds.), Tissue, Cell and Organ Engineering, Wiley-VCH, s.135- 136, 2006.
- [5] Chong, E.J., Phan, T.T., Lim, I.J., Zhang, Y.Z., Bay, B.H., Ramakrishna, S., and Lim, C.T., Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. Acta Biomater., 3, s.321–330, 2007.
- [6] Gümüşderelioğlu, M., Doku mühendisliğinde nanoteknoloji, Bilim ve Teknik Özel Eki, Tübitak Yayınları, s.2-3, Ekim, 2007.
- [7] Woo K.M., Chen V.J., Ma P.X., Nanofibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment, J. Biomed. Mater. Res., 67A, s.531–537, 2003.
- [8] Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.E., Lim, T.C., Ma, Z., Introduction to electrospinning and nanofibers, World Scientific Publishing, s.266, 2005.
- [9] Katti, D.S., Robinson, K.W., Ko, F.K., and Laurencin, C.T., Bioresorbable nanofiber- based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters, J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater., 70, s.286–296, 2004.

- [10] Simpson, D.G., Dermal templates and the wound-healing paradigm: The promise of tissue regeneration, *Expert. Rev. Med. Devices*, 3, s.471–484, 2006.
- [11] Rho, K.S., Jeong, L., Lee, G., Seo, B.M., Park, Y.J., Hong, S.D., Roh, S., Cho, J.J., Park, W.H., and Min, B.M., Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials* 27, s.1452–1461, 2006.
- [12] Myung-Seob, K., Dong-II, C., Hak-Yong, K., In-Shik, K., Narayan, B., Electrospun nanofibrous polyurethane membrane as wound dressing, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, 67B, s.675–679, 2003.
- [13] Port F, OPTN/SRTS Annual Report in Scientific Registry of Transplant Recipients and Organ Procurement Transplantation Network, Washington D.C., 2007.
- [14] Türkiye’de organ bağışı ve 2006-2007 yılı sonuçları, <http://www.f1press.org/10/saglik/organ-bagisi-bir-yil-icinde-uc-kat-artti/>, 2007.
- [15] Nerem RM, Cellular Engineering, *Ann.Biomed.Eng.*, vol.19, 1991.
- [16] Langer, R. and Vacanti, J.P., Tissue engineering, *Science* 260, s.920–926, 1993.
- [17] Rizzo, D.C., Delmar’s Fundamentals of Anatomy and Physiology., Thompson Learning, s.137-142, 2001.
- [18] Barbul, A., Wound healing, *Schwartz’s Principles of Surgery*, Eight edition, Mc Graw Hill, 223s., 2005.
- [19] Sherris, D.A., Kern, E.B., The wound: In basic surgical skills, Mayo Foundation for Medical Education and Research, Rochester, s.8-12, 1999.

- [20] Onat, D.A., Yara iyileşmesi, Temel Klinik Bilimler., Saraçoğlu F.(ed), Güneş Kitabevi Ltd. Şti., cilt 2, Ankara, s.635-636, 1989.
- [21] Lanza, R.P., Langer, R., Vacanti, J.P., Principles of Tissue Engineering, Academic Press, Third Edition, 2007.
- [22] Watson, F.S.N., Hodgkin, W., Wound dressings, The Medicine Publishing Company Ltd., Surgery, vol.23, no.2, s.52-55, 2005.
- [23] Rheinwald, J.G. and Green, H., Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells, Cell, 6, s.331-343, 1975.
- [24] Bello, Y.M., Falabella, A.F., Eaglstein, W.H., Tissue-engineered skin: Current status in wound healing. Am. J. Clin. Dermatol., vol.2, no.5, s.305–313, 2001.
- [25] Sefton, M.V., Woodhouse, K.A., Tissue engineering, J. Cutan. Med. Surg. 3, s.18-23, 1998.
- [26] Jones, I., Currie, L. and Martin, R., A guide to biological skin substitutes, British Journal of Plastic Surgery, 55, s.185-193, 2002.
- [27] Supp, D.M., Boyce, S.T., Engineered skin substitutes: practices and potentials, Clinics in Dermatology, 23, s.403–412, 2005.
- [28] Phillips, T.J., Tissue-engineered skin: an alternative to split thickness skin grafts?, Arch. Dermatol., 135, s.977–978, 1999.
- [29] Kirsner, R.S., The use of Apligraf in acute wounds, J. Dermatol., 25, s.805–811, 1998.

- [30] Eaglstein, W.H., Alvarez, O.M., Auletta, M. Related acute excisional wounds treated with a tissue-engineered skin (Apligraf). *Dermatol. Surg.*, 25, s.195–201, 1999.
- [31] Streit, M., Braathen, L.R., Apligraf; a living human skin equivalent for the treatment of chronic wounds, *Int. J. Artif. Organs* 23, s.831–833, 2000.
- [32] Falabella, A.F., Valencia, I.C., Eaglstein, W.H., Schachner, L.A., Tissue-engineered (Apligraf) in the healing of patients with epidermolysis bullosa wounds, *Arch. Dermatol.*, 136, s.1225–1230, 2000.
- [33] Long, R.E., Falabella, A.F., Valencia, I., Treatment of refractory, atypical lower extremity ulcers with tissue engineered skin (Apligraf), *Arch. Dermatol.*, 137, s.1660 -1661, 2001.
- [34] Horch, R.E., Kopp, J., Kneser, U., Beier, J., Bach, A.D., Tissue engineering of cultured skin substitutes, *J. Cell. Mol. Med.*, vol.9, no.3, pp. 592-608, 2005.
- [35] Gümüşderelioğlu, M., *Biyomalzemeler, Bilim ve Teknik Özel Eki, Tübitak Yayınları*, s.2, Temmuz, 2002.
- [36] Blitterswijk C.V., *Tissue Engineering*, Academic Press, s.146-178, 2008.
- [37] John, J., Bioresorbable and bioerodible materials, In: Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Je L., (eds.), *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, Academic Press, New York, s.64–72, 1996.
- [38] Ma Z., Kotaki M., Yong T., He W., Ramakrishna S., Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering, *Biomaterials*, vol.26, s.2527–2536, 2005.

- [39] Ma Z., He W., Yong T., Ramakrishna S., Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation, *Tissue Eng.*, vol.11, s.1149-1158, 2005.
- [40] Fellers, C.R. and Griffeths, F.P., Jelly-strength measurements of fruit jellies by the bloom gelometer, *Industrial and Engineering Chemistry*, August, s.857, 1928.
- [41] Pitt, C.G., Poly-epsilon-caprolactone and its copolymers. In: *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*. Chasin, M., Langer, R. (Eds.), Marcel Dekker, New York, s.71-120, 1990.
- [42] Lee, K.H., Kim, H.Y., Khil, M.S., Ra, Y.M., Lee, D.R., Characterization of nanostructured poly(ϵ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning, *Polymer*, 44, s.1287-1294, 2003.
- [43] Li, W.J., Danielson, K.G., Alexander, P.G., Tuan, R.S., Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 67, s.1105-1114, 2003.
- [44] Zhang, Y.Z., Ouyang, H., Lim, C.T., Ramakrishna, S., Huang, Z.M., Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 72, s.156-165, 2005.
- [45] Yoshimoto, H., Shin, Y.M., Terai, H., Vacanti, J.P., A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 24, s.2077-2082, 2003.
- [46] Shin, M., Yoshimoto, H., Vacanti, J.P., In vivo bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold, *Tissue Eng.*, 10, s.33-41, 2004.
- [47] Shin, M., Ishii, O., Sueda, T., Vacanti, J.P., Contractile cardiac grafts using a novel nanofibrous mesh, *Biomaterials*, 25, s.3717-3723, 2004.

- [48] Li, D., Ouyang, G. McCann, J. T. and Xia, Y., Collecting Electrospun nanofibers with patterned electrodes, Nano. Lett. ASAP article, 2005.
- [49] Khil, M.S., Cha, D.I., Kim, H.Y., Kim, I.S. and Bhattarai, N., Electrospun nanofibrous polyurethane membrane as wound dressing, J. Biomed. Mater. Res. 67B, s.675-679, 2003.
- [50] Venugopal, J., Ma, L.L., Yong, T., Ramakrishna, S., In vitro study of smooth muscle cells on polycaprolactone and collagen nanofibrous matrices. Cell Biol. Int., 29, s.861-867, 2005.
- [51] Zhang, Y.Z., Venugopal, J., Huang, Z.M., Lim, C.T., Ramakrishna, S., Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanofibers using fibroblasts, Biomacromolecules, 6, s.2583-2589, 2005.
- [52] Venugopal, J., Ramakrishna, S., Biocompatible nanofiber matrices for the engineering of a dermal substitute for skin regeneration, Tissue Eng. 11, s.847-854, 2005.
- [53] Vaz, C.M., Tuijl, S.V., Bouten, C.V.C., Baaijens, F.P.T., Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique, Acta Biomater., 1, s.575-582, 2005.
- [54] Fujihara, K., Kotaki, M., Ramakrishna, S., Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nanofibers, Biomaterials, 26, s.4139-4147, 2005.
- [55] Iroh, J.O., Poly-ε-caprolactone, Polymer Data Handbook, Mark, J.E. (ed.), Oxford University Press, USA. s361-362, 1999.

- [56] Guarino, V., Causa, F., Taddei, P., Foggia, M., Ciapetti, G., Martini, D., Fagnano, C., Baldini, N., Ambrosio, L., Polylactic acid fibre-reinforced polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 29, s.3662–3670, 2008.
- [57] Khor, H.L., Ng, K.W., Schantz, J.T., Phan, T.T., Lim, T.C., Teoh, S.H., Hutmacher, D.W., Poly(ϵ -caprolactone) films as a potential substrate for tissue engineering an epidermal equivalent, *Mat. Sci. Eng., C*, 20, s.71–75, 2002.
- [58] Kang, H.W., Tabata, Y., Ikada, Y., Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 20, s.1339-1344, 1999.
- [59] Sachlos, E., and Czernuszka, J.T., Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds, *European Cells and Materials*, 5, s.29-40, 2003.
- [60] Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D., Farson, D., Electrospinning for tissue engineering scaffolds, *Mater. Sci. and Eng., C* 27, s.504–509, 2007.
- [61] Formhals A., Process and apparatus for preparing artificial threads, US Patent. 1975504, 1934.
- [62] Taylor, G.I., *Proc Roy Soc London*, A313, s.453, 1969.
- [63] Lyons, J., Li, C. and Ko, F., Melt-electrospinning part I: processing parameters and geometric properties, *Polymer.*, 45, s.7597-7603, 2004.
- [64] Larrondo, L. and Manley R.S.J., Electrostatic fiber spinning from polymer melts. I. Experimental observations on fiber formation and properties, *J. Polym. Sci. Pol. Phys.* 19, s.909-920, 1981.
- [65] Larrondo, L. and Manley R.S.J., Electrostatic fiber spinning from polymer melts. II. Examination of the flow field in an electrically driven jet, *J. Polym. Sci. Pol. Phys.*, 19, s.921-932, 1981.

- [66] Larrondo, L. and Manley R.S.J., electrostatic fiber spinning from polymer melts. III. Electrostatic deformation of a pendant drop of polymer melt. *J. Polym. Sci. Pol. Phys.*, 19, s.933-940, 1981.
- [67] Buchko, C.J., Chen, L.C., Shen, Y. and Martin, D.C., Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films, *Polymer*, no.40, s. 7397-7407, 1999.
- [68] Shenoy, S.L., Bates, W.D., Frisch, H.L. and Wnek, G.E., Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer-polymer interaction limit, *Polymer.*, 46, s.3372-3384, 2005.
- [69] Kameoka, J., Orth, R., Yang, Y., Czaplewski, D., Mathers, R., Coates, G. and Craighead, H.G., A scanning tip electrospinning source for deposition of oriented nanofibres, *Nanotechnology*, 14, s.1124-1129, 2003.
- [70] Zhong, X.H., Kim, K.S., Fang, D.F., Ran, S.F., Hsiao, B.S. and Chu, B., Structure and process relationship of Electrospun bioabsorbable nanofiber membranes, *Polymer.*, 43, s.4403-4412, 2002.
- [71] Megelski, S., Stephens, J.S., Chase, D.B. and Rabolt, J.F., Micro and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers, *Macromolecules.*, 35, s.8456-8466, 2002.
- [72] Fong, H., Chun, I., Reneker, D.H., Beaded nanofibers formed during electrospinning, *Polymer*, 40, s.4585-4592, 1999.
- [73] Mit-uppatham, C, Nithitanakul, M. and Supaphol, P., Ultrafine electrospun polyarnide-6 fibers: Effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter, *Macromol. Chem. Physic.*, 205, s.2327-2338, 2004.

- [74] Jeun, J.P., Lim, Y.M., Nho, Y.C., Study on morphology of electrospun poly(caprolactone) nanofiber, *J. Ind. Eng. Chem.*, vol.11, no.4, pp. 573-578, 2005.
- [75] Baumgarten, P.K., Electrostatic Spinning of Acrylic Microfibers, *J. Colloid Interf. Sci.* 36, s.75-79, 1971.
- [76] Jarusuwannapoom, T., Hongrojjanawiwat, W., Jitjaicham, S., Wannatong, L., Nithitanakul, M., Pattamaprom, C., Koombhongse, P., Rangkupan, R. and Supaphol, P., Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers. *Euro. Polym. J.*, 41, s.409-421, 2005.
- [77] Demir, M.M., Yilgor, I., Yilgor, E. and Erman, B., Electrospinning of polyurethane fibers, *Polymer*, 43, s.3303-3309, 2002.
- [78] Deitzel, J.M., Kleinmeyer, J., Harris, D. and Tan, N.C.B., The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer*, 42, s.261-272, 2001.
- [79] Reneker, D. H., Yarin, A. L., Fong, H. and Koombhongse, S., Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning, *J. Appl. Phys.* 87, s.4531-4547, 2000.
- [80] Kim, J.R., Choi, S.W., Jo, S.M., Lee, W.S. and Kim, B.C., Characterization and properties of P(VdF-HFP)-based fibrous polymer electrolyte membrane prepared by electrospinning, *J. Electrochem. Soc.* 152, s.A295-A300, 2005.
- [81] Zhao, S.L., Wu, X.H., Wang, L.G. and Huang, Y., Electrospinning of ethyl-cyanoethyl cellulose/tetrahydrofuran solutions, *J. Appl. Polym. Sci.*, 91, s.242-246, 2004.

[82] Morozov, V.N., Morozova, T.Y. and Kallenbach N.R., Atomic force microscopy of structures produced by electrospraying polymer solutions, *Int. J. Mass. Spec.*, 178, s.143-159, 1998.

[83] Kim, G.H., Han, H., Park, J.H., Kim, W.D., An applicable electrospinning process for fabricating a mechanically improved nanofiber mat, *Polym. Eng. Sci.*, 47, s.707–712, 2007.

[84] Zeng, J., Xu, X., Chen, X., Liang, Q., Bian, X., Yang, L. and ling, X., Biodegradable electrospun fibers for drug delivery, *J. Control. Release*, 92, s. 227-231, 2003.

[85] Choi, J.S., Lee, S.W., Jeong, L., Bae, S.H., Min, B.C., Youk, J.H. and Park, W.H., Effect of organosoluble salts on the nanofibrous structure of electrospun poly(3-hydroxy butyrate-co-3-hydroxy valerate). *Int. J. Biol. Mac.*, vol.34, no.4, s.249-256, 2004.

[86] Son, W.K., Youk, J.H., Lee, T.S. and Park, W.H., Electrospinning of ultrafine cellulose acetate fibers: studies of a new solvent system and deacetylation of ultrafine cellulose acetate fibers, *J. Polym. Sci. Pt. B-Polym. Phys.*, vol.42, s.5-11, 2004.

[87] Son, W.K, Youk, J.H, Lee, T.S. and Park, W.H., The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers, *Polymer*, vol.45, s.2959-2966, 2004.

[88] Lee, K.H., Kim, H.Y., Khil, M.S., Ra, Y.M., Lee, D.R., Characterization of nano-structured poly(ϵ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning, *Polymer*, 44, s.1287–1294, 2003.

[89] Hsu, C.M. and Shivakumar, S., N,N-Dimethylformamide additions to the solution for the electrospinning of poly(ϵ -caprolactone) nanofibers. *Macromol. Mater. Eng.*, vol.289, s.334-340, 2004.

- [90] Wannatong, L., Sirivat, A. and Supaphol, P., Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene, *Polym. Int.*, vol.53, s.1851-1859, 2004.
- [91] Taylor, G.I., Disintegration of water drops in an electric field, *Proc Roy Soc London, A*, 280, s.383-397, 1964.
- [92] Lee, J.S., Choi, K.H., Ghim, H.D., Kim, S.S., Chun, D.H., Kim, H.Y. and Lyoo, W.S., Role of molecular weight of atactic poly(vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning, *J. Appl. Polym. Sci.*, 93, s.1638-1646, 2004.
- [93] Pawlowski, K.J., Belvin, H.L., Raney, D.L., Su, J., Harrison, J.S. and Siochi, E.J., Electrospinning of a micro-air vehicle wing skin, *Polymer.*, 44, s.1309- 1314, 2003.
- [94] Krishnappa, R.V.N., Desai, K., Sung, C.M., Morphological study of electrospun polycarbonates as a function of the solvent and processing voltage, *J. Mater. Sci.* 38, s.2357-2365, 2003.
- [95] Rutledge, G.C., Li, Y., Fridrikh, S., Warner, S.B., Kalayci, V.E. and Patra, P., Electrostatic spinning and properties of ultrafine fibers, national textile center, Annual Report (M98-D01), National Textile Center, s.1-10, 2000.
- [96] Yuan, X., Zhang, Y., Dong, C. and Sheng, J., Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning, *Polym. Int.*, vol.53, no.11, s.1704-1710, 2004.
- [97] Kessick, R. and Tepper, G., Microscale polymeric helical structures produced by electrospinning, *Appl. Phys. Lett.*, vol.84, no.23, s.4807-4809, 2004.

- [98] Liu, H. Q. and Hiseh, Y. L., Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate, *J. Polym. Sci. Pol. Phys.*, 40, s.2119-2129, 2002.
- [99] Teo, W.E. and Ramakrishna, S., A review on electrospinning design and nanofibre assemblies, *Nanotechnology*, 17, s.R89–R106, 2006.
- [100] Mo, X. M., Xu, C. Y., Kotaki, M, Ramakrishna, S., Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation, *Biomaterials*. 25, s.1883-1890, 2004.
- [101] Ayutsede, J., Gandhi, M., Sukigara, S., Micklus, M., Chen, H. E. and Ko, F. Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning. Part 3: characterization of electrospun nonwoven mat, *Polymer* 46, s.1625-1634, 2005.
- [102] Bognitzki, M., Czado, W., Frese, T., Schaper, A., Hellwig, M., Steinhart, M., Greiner, A. and Wendorff, J. H., Nanostructured fibers via electrospinning, *Adv. Mater.*, vol.13, s.70-72, 2001.
- [103] Jeun, J.P., Kim, Y.H., Lim, Y.M., Choi, J.H., Jung, C.H., Kang, P.H., and Nho, Y.C., Electrospinning of poly(L-lactide-co-D, L-lactide), *J. Ind. Eng. Chem.*, vol.13, no.4, s.592-596, 2007.
- [104] Nieh, S. and Nguyen, T., Effects of humidity, conveying velocity, and particle size on electrostatic charges of glass beads in a gaseous suspension flow, *J. Electrostat.*, vol.21, s.99-114, 1988.
- [105] Li, D. and Xia, Y., Direct fabrication of composite and ceramic hollow nanofibers by electrospinning, *Nano Lett* 4, s.933-938, 2004.
- [106] Li, M., Mondrinos, M.J., Gandhi, M.R., Ko, F.K., Weiss, A.S., Lelkes, P. I., Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering, *Biomaterials*, vol.26, s.5999–6008, 2005.

- [107] Bhattarai, S.R., Bhattarai, N., Yi, H.K., Hwang, P.H., Cha, D.I. and Kim, H.Y., Novel biodegradable electrospun membrane: Scaffold for tissue engineering, *Biomaterials*. No.25, s.2595-2602, 2004.
- [108] Venugopal, J.R., Zhang, Y., and Ramakrishna, S., In vitro culture of human dermal fibroblasts on electrospun polycaprolactone collagen nanofibrous membrane, *Artificial Organs*, vol.30, no.6, s.440–446, 2006.
- [109] Shapiro, A.M.J., Lakey, J.R.T., Ryan, E.A., Korbitt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., Rajotte, R.V., Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen, *N. Engl. J. Med.*, 343, s.230-238, 2000.
- [110] Platt, J.L., The immunological barriers to xenotransplantation, *Crit. Rev. Immunol.*,16, s.331–358, 1996.
- [111] Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, vol.282, s.1145–1147, 1998.
- [112] Solter, D. and Gearhart, J., Putting stem cells to work, *Science*, 283, s.1468–1470, 1999.
- [113] Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D.A., Benvenisty, N., Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells, *PNAS.*, vol.97, no.21, s.11307-11312, 2000.
- [114] Heath, C.A., Cells for tissue engineering, *TIBTECH*, 18, s.17-19, 2000.
- [115] Tan, P.S., Teoh, S.H., Effect of stiffness of polycaprolactone (PCL) membrane on cell proliferation, *Materials Science and Engineering C* 27, s.304–308, 2007.

- [116] Karakeçili, A.G., Satriano, C., Gümüşderelioğlu, M., Marletta, G., Enhancement of fibroblastic proliferation on chitosan surfaces by immobilized epidermal growth factor, *Acta Biomaterialia*, 4, s.989–996, 2008.
- [117] Steed, DL., Modifying the wound healing response with exogenous growth factors, *Clin Plast Surg*, 25, s.397-405, 1998.
- [118] Cohen, S., The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF), *Dev. Biol.*, 12, s.394-407, 1965.
- [119] Cohen, S., The Epidermal Growth Factor (EGF), *Cancer*, 51, s.1787-1791, 1983.
- [120] Erbaş, D., Epidermal Growth Factor, *Gazi. Üniv. Tıp Fak. Der. I*, s.30-34, 1990.
- [121] Carpenter, G., Cohen, S., Epidermal growth factor, *Ann. Rev. Biochem.*, no.68, s.194-216, 1979.
- [122] Konturec, R.C., Konturecs, J., Brzozowski, T., Ernst. H., Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha: Role in protection and healing of gastric mucosal lesions, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* vol.7, no.10, s.933-937, 1995.
- [123] Yeler, H., Yücetaş, Ş., Yılmaz, D., Öztürk, M., Arıcı, S., Epidermal büyüme faktörünün (EGF) diş çekim yarası iyileşmesi üzerine etkisinin incelenmesi, *Cumhuriyet Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, Cilt 2, Sayı 1, 1999.
- [124] Gregory, H., Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature*, 257, s.325-327, 1975.

[125] Klegerman, M.E., Plotnikoff. N.P., Proteins as biological response modifiers, in Klegerman, M.E., Groves, M.J. (Eds), Pharmaceutical Biotechnology Interpharm. Press, USA, 1992.

[126] Thompson, D.M., Gill. G.N., The EGF receptor: structure, regulation and potential role in malignancy, *Cancer Surv.*, vol.4, no.4, s.767-788, 1985.

[127] Dietel M., What's new in cytostatic drug resistance and pathology, *Pathol. Res. Pract.*, 187, s.892-905, 1991.

[128] Shin, H., Jo, S., and Mikos, A.G., Biomimetic materials for tissue engineering, *Biomaterials*, 24, pp. 4353–4364, 2003.

[129] Gitlin , G., Bayer , E.A. , and Wilchek , M., Studies on the biotin-binding site of avidin: Lysine residues involved in the active site, *Biochem. J.*, 242, s.923–926, 1987.

[130] Gitlin , G., Bayer , E.A. , and Wilchek , M., Studies on the biotin-binding site of avidin: Tryptophan residues involved in the active site, *Biochem. J.*, 250, s.291–294, 1988.

[131] Ito, Y., Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering, *Soft Matter.*, 4, s.46-56, 2008.

[132] Stoscheck, C.M. and CARPENTER, G., Down regulation of epidermal growth factor eceptors : Direct demonstration of receptor degradation in human fibroblasts, *The Journal of Cell Biology*, vol.98, s.1048-1053, 1984.

[133] Goddard, J.M., Hotchkiss, J.H., Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds, *Prog. Polym. Sci.*, 32, s.698–725, 2007.

[134] Laurencin, C.T., Nair, L.S., Nanotechnology and tissue engineering: The scaffold, CRC Press Taylor & Francis Group, s.172, 2008.

[135] Hermanson, G.T., Bioconjugate techniques, Academic Press, New York, s.101-216, 1996.

[136] Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M.P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.H., Ramakrishna, S., Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *Biomaterials*, vol.29, s.4532–4539, 2008.

[137] Tıǧlı, R.S., Gümüşderelioǧlu, M., Evaluation of RGD- or EGF immobilized chitosan scaffolds for chondrogenic activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, s.121–128, 2008.

[138] Ito, Y., Inoue, M., Liu, S., Imanishi, Y., Cell growth on immobilized cell growth factor. 6. Enhancement of fibroblast cell growth by immobilized insulin and/or fibronectin, *J. Biomed. Mater. Res.*, 27, s.901–907, 1993.

[139] Tıǧlı, R.S., Akman, A.C., Gümüşderelioǧlu, M., Nohutçu, R.M., In-vitro Release of dexamethasone or bFGF from chitosan/hydroxyapatite scaffolds, *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition* (In Press), 2009.

[140] Karakeçili, A.G., Mikrodesenli Biyoaktif Malzemelerin Dizaynı ve Karakterizasyonu ve Doku Mühendisliği'ndeki Uygulamaları, Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006.

[141] Li, W.J., Cato T. Laurencin, C.T., Caterson, E.J., Tuan, R.S., Ko, F.K., Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res.*, vol.60, no.4, s.613-621, 2002.

[142] Kweon, H.Y., Yoo, M.K., Park, I.K., Kim, T.H., Lee, H.C., Lee, H.S., Oh, J.S., Akaike, T., Cho, C.S., A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering, *Biomaterials*, 24, s.801–808, 2003.

[143] Arinstein, A., Burman, M., Gendelman, O., Zussman, E., Effect of supramolecular structure on polymer nanofibre elasticity, *Nature Nanotechnology*, vol.2, s.59-62, 2007.

- [144] Shu, X.Z., Liu, Y., Palumbo, F., Prestwich, G.D., Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: a covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth, *Biomaterials*, vol.24, s.3825-3834, 2003.
- [145] Kidoaki S., Kwon, K.I., Matsuda, T., Mesoscopic spatial designs of nano- and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques, *Biomaterials*, vol.26, s.37–46, 2005.
- [146] Telemeco, T.A., Ayres, C., Bowlin, G.L., Wnek, G.E., Boland E.D., Cohen, N., Baumgarten, C.M., Mathews, J., D.G. Simpson, D.G., Regulation of cellular infiltration into tissue engineering scaffolds composed of submicron diameter fibrils produced by electrospinning, *Acta Biomaterialia*, vol.1, s.377–385, 2005.
- [147] Zhang, Y.Z., Venugopal J., Huang, Z.M., Lim, C.T., Ramakrishna, S., Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers, *Polymer*, vol.47, s.2911–2917, 2006.
- [148] Yang, Q.B., Li, Z.Y., Hong, Y.L., Zhao, Y.Y., Qiu, S.L., Wang, C. and Wei, Y., Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning, *I. Polym. Sci. Pol. Phys.*, 42, s.3721-3726, 2004.
- [149] Huang, Z.M., Zhang, Y.Z., Ramakrishna, S. and Lim, C.T., Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers, *Polymer*, vol.45, s.5361-5368, 2004.
- [150] Maviş, B., Demirtaş, T.T., Gerçek, I., Gümüşderelioğlu, M., Gündüz, G., Çolak, Ü., Bonelike apatitic calcium phosphate sandwiched between electrospun polycaprolactone nanofiber mats: synthesis, characterization and osteoblastic activity, *Proceedings of the 10th International Conference of the European Ceramic Society*, CD-ISBN:3-87264-022-4, s.1023-1028, 2008.

- [151] Dicko, C., Knight, D., Kenney, J.M., Vollrath, F., Conformational polymorphism, stability and aggregation in spider dragline silks proteins, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol.36, 215–224, 2005.
- [152] Ma, Z.W., Kotaki, M., Inai, R., Ramakrishna, S., Potential of nanofiber matrix as tissue engineering scaffolds, *Tissue Eng.*, 11, s.101, 2005.
- [153] Elbert, D. L.; Hubbell, Surface treatments of polymers for biocompatibility, *J. A. Annu. ReV. Mater. Sci.*, vol.26, s.365, 1996.
- [154] Choi, J.S., Leong, K.W., Yoo, H.S., In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF), *Biomaterials*, vol.29, s.587–596, 2008.
- [155] Klenkler, B.J., Griffith, M., Becerril, C., West-May J.A., Sheardown, H., EGF grafted PDMS surfaces in artificial cornea applications, *Biomat.*, vol.26, s.7286–7296, 2005.
- [156] Ulubayram, K., Çakar A.N., Korkusuz P., Ertan, C., Hasırcı, N., EGF containing gelatin-based wound dressings, *Biomaterials* 22, 1345–1356, 2001.
- [157] Steffens, G.C.M., Nothdurft, L., Buse, G., Thissen, H., Höcker, H., Klee, D., High density binding of proteins and peptides to poly(d,l-lactide) grafted with polyacrylic acid, *Biomaterials*, vol.23, s.3523–3531, 2002.
- [158] Ma, Z.W., Gao, C.Y., Ji, J., Shen, J.C., Protein immobilization on the surface of poly-L-lactic acid films for improvement of cellular interactions. *Europ. Polym. J.*, vol.38, s.2279, 2002.
- [159] Santiago, L.Y., Nowak, R.W., Rubin, J.P., Marra, K.G., Peptide-surface modification of poly(caprolactone) with laminin-derived sequences for adipose-derived stem cell applications, *Biomaterials*, 27, s.2962–2969, 2006.

- [160] Zhu, Y.B., Gao, C.Y., Liu, X.Y., Shen, J.C., Surface modification of polycaprolactone membrane via aminolysis and biomacromolecule immobilization for promoting cytocompatibility of human endothelial cells, *Biomacromolecules*, vol.3, no.6, s.1312-1319, 2002.
- [161] Pena, J., Corrales, T., Izquierdo-Barba, I., Doadrio, A.L., Vallet-Regi M., Long term degradation of poly(e-caprolactone) films in biologically related fluids, *Polymer Degradation and Stability*, vol.91, s.1424-1432, 2006.
- [162] Peng, H.T., Martineau, L., Shek, P.N., Development of a novel biomaterial: Part III. Stability and hydration in various media. Defence R&D Canada – Toronto, Technical Report, December, s.3, 2005.
- [163] Luong-Van, E., Grøndahl, L., Chua, K.N., Leong, K.W., Nurcombe, V., Cool, S.M., Controlled release of heparin from poly(e-caprolactone) electrospun fibers, *Biomaterials*, vol.27, s.2042–2050, 2006.
- [164] Çınar, C. Yara iyileşmesinde destek sağlayan yöntemler, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Cilt Hastalıkları ve Yara Bakımı Sempozyumu, 18-19 Ekim, İstanbul, s.165-171, 2001.
- [165] Berkland, C, Pack, D.W. and Kim, K., Controlling surface nano-structure using flow-limited field-injection electrostatic spraying (FFESS) of poly(D,L-lactide-coglycolide), *Biomaterials*, 25, s.5649-5658, 2004.
- [166] Theron, S.A., Zussman, E. and Yarin, A.L., Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions, *Polymer*, 45, s.2017-2030, 2004.
- [167] Prego, M., Cabeza, O., Carballo, E., Franjo, C.F. and Jimenez, E., Measurements and interpretation of the electrical conductivity of 1-alcohols from 273K to 333K, *J. Mol. Liq.* 89, s.233-238, 2000.

[168] Min, B. M., Lee, G., Kim, S. H., Nam, Y. S., Lee, T. S. and Park, W. H., Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, vol.25, s.1289-1297, 2004.

[169] Niall, M., Ryan, G.B., O'Brien BMc.C., The effect of epidermal growth factor on wound healing in mice. *J Surg Res.*, vol.33, s.164-169, 1982.