T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DERİ DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN EGF VE ALTIN NANOPARÇACIK YÜKLÜ ELEKTROEĞRİLMİŞ PLLA/KOL-I DUAL-NANOFİBER ÜRETİMİ

BETÜL BEYZANUR ULUSAGÜVEN

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ BENGİ YILMAZ

DOKU MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI
DOKU MÜHENDİSLİĞİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
HAZİRAN/2021

İTHAF

Bu tezi, sevgili anneme ve babama ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmamın tüm aşamalarında değerli katkı ve eleştirileri ile bana yol gösteren tez danışmanım ve sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Bengi YILMAZ'a,

Laboratuvarımızda sunduğu imkanlardan dolayı Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi - Validebağ Araştırma Parkı'nın merkezi müdürü Sayın Prof. Dr. Şaban TEKİN'e ve Müdür Yardımcısı Dr. Öğr. Üyesi Ahmet KATI'ya,

Lisansüstü ve lisans eğitimim boyunca akademik bilgi ve deneyimlerini bana aktaran tüm hocalarıma,

Tez çalışmam boyunca her daim yardımlarını esirgemeyen tüm arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca beni maddi ve manevi her konuda destekleyen değerli aileme,

Değerli katkılarından dolayı tez jürisi üyelerine,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma S.B.Ü. BAP Koordinatörlüğü tarafından 2020/009 no'lu Yüksek Lisans Tez Projesi kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ ix
ŞEKİLLER LİSTESİ x
RESİMLER LİSTESİ xi
SİMGELER VE KISALTMALAR xv
ÖZET xvi
ABSTRACT xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. DERİ 3
2.1.1. Epidermis 3
2.1.2. Dermis 5
2.2. DERİDE BULUNAN HÜCRE TİPLERİ 6
2.3. DERİDE YANIK VE DİĞER YARALAR 7
2.4. YARA İYİLEŞMESİ 10
2.5. DERİ DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE DERİ İKAMELERİ 13
2.6. DOĞAL BİYOMALZEMELER 16
2.6.1. Kolajen 16
2.6.2. Jelatin 18
2.6.3. Elastin 19
2.6.4. Fibrin 19
2.6.5. Hyaluronik Asit 20
2.6.6. Kitin ve Kitosan 21
2.6.7. İpek Fibroin 22
2.7. SENTETİK BİYOMALZEMELER 22
2.7.1. Poli (Laktik Asit) (PLA) 23
2.7.2. Poli (Laktik Asit-Ko-Glikolik Asit) (PLGA) 24
2.7.3. Poli (ε-Kaprolakton) (PCL) 24
2.7.4. Poli (Etilen Glikol) (PEG) 25
2.7.5. Poliüretan (PU) 25

2.8. DERİ DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER 26
2.8.1. Elektroeğirme Yöntemi ile Deri İkamesi Üretimi 26
3. GEREÇ VE YÖNTEM 35
3.1. MALZEMELER 35
3.2. ELEKTROEĞİRME DÜZENEĞİ 35
3.3. ALTIN NANO PARÇACIK SENTEZİ 36
3.4. ÇÖZELTİ HAZIRLANMASI VE OLUŞTURULAN DENEY GRUPLARI 37
3.5. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOPİSİ (SEM) 39
3.6. FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR) 40
3.7. YARA ÖRTÜLERİNİN PBS İÇERİSİNDEKİ ŞİŞME DAVRANIŞININ BELİRLENMESİ 40
3.8. OKSİJEN GEÇİRGENLİK TESTİ 41
3.9. NEM GEÇİRGENLİK TESTİ 41
3.10. *IN VITRO* HÜCRE-UYUMLULUK TESTLERİ 42
3.10.1. Hücre Proliferasyon Testi 42
3.10.2. İmmunofloresan Boyama 43
3.10.3. Hücre Yayılması ve Morfolojisi 43
3.14. YÜZEY TEMAS AÇISI TESTİ 43
3.15. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE TESTİ 44
4. BULGULAR 45
4.1. ÜRETİLEN DERİ İKAMELERİNİN GÖRÜNÜMÜ 45
4.2. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOPİSİ (SEM) 45
4.3. ALTIN NANOPARÇACIK KARAKTERİZASYONU 57
4.4. FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR) 59
4.5. YARA ÖRTÜLERİNİN PBS İÇERİSİNDE ŞİŞME DAVRANIŞININ BELİRLENMESİ 61
4.6. ALTIN NANOPARÇACIKLARIN FİBER YAPIDAN SALINMA MİKTARI 62
4.7. OKSİJEN GEÇİRGENLİK TESTİ 64
4.8. NEM GEÇİRGENLİĞİ TESTİ 65
4.9. HÜCRE PROLİFERASYON TESTİ 66
4.10. İMMÜNOFLORESAN BOYAMA 67
4.11. HÜCRE YAYILMASI VE MORFOLOJİSİ 71
4.12. YÜZEY TEMAS AÇISI TESTİ 76
4.13. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE TESTİ 77
5. TARTIŞMA 82

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 93
KAYNAKLAR 97

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Yara iyileşmesinin fazları 12

Tablo 2.2: Yaygın olarak kullanılan ticari yara örtüleri ve greftleri 15

Tablo 2.3: Elektroeğirme proses parametreleri 29

Tablo 2.4: Elektroeğirme yöntemi ile yapılmış uygulamalar 30

Tablo 3.1: Elektroeğirmede çalışılan deney grupları ve isimlendirmesi 39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Derinin fiziksel ve immünolojik bariyeri 3

Şekil 2.2: Deri hasarında yara örtüsü 13

Şekil 2.3: Genel bir koaksiyel elektroeğirme prosesinin şematik gösterimi 27

Şekil 2.4: Çeşitli elektroeğirme yöntemleri 28

Şekil 4.1: Elde edilen altın nanoparçacıkların zetasizer şiddet (%) partikül boyut grafikleri: (a) 2 ml sitrat dihidrat, (b) 2,5 ml sitrat dihidrat, (c) 3 ml sitrat dihidrat, (d) 3,5 ml sitrat dihidrat, (e) 4 ml sitrat dihidrat kullanılarak oluşturulan altın süspansiyonları. 59

Şekil 4.2: FTIR spektrumları: (a) kolajen tip I; (b) saf PLLA; (c) PLLA/Kol-I kompozit fiber 60

Şekil 4.3: Saf PLLA ve PLLA/Kol-I çekirdek-kabuk yapıdaki fiberlerin karşılaştırmalı FTIR spektrumları 61

Şekil 4.4: Üretilen PLLA/Kol-I yara örtülerinin PBS içerisindeki şişme oranları, n=3 62

Şekil 4.5: EDS verilerine göre PBS içerisinde 14 gün boyunca salınan altın (Au) nanoparçacıkların PLLA/Kol-I üzerinde kalan yüzde ağırlık miktarı 64

Şekil 4.6: PLLA/Kol-I, PLLA/Kol-I+AuNP ve Tegaderm yara örtülerinin oksijen geçirgenliğinin çözünmüş oksijen miktarı(ppm) cinsinden grafiği, hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir, n=3. 65

Şekil 4.7: PLLA/Kol-I yara örtülerinin nem geçirgenliği grafiği, hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir, n=3 66

Şekil 4.8: Kontrol, PLLA, PLLA/Kol-I, PLLA/Kol-I+AuNP ve PLLA/Kol-I+AuNP+EGF için 1.gün, 3.gün ve 7.gün 570-600 nm absorbans değerleri, hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir, n=3. * gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir ($p<0,05$)……..……..……66

Şekil 4.9: Temas açısının hidrofiliklik ve hidrofobiklik analizi üzerindeki etkisi……....76

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1: Elektroeğirme cihazı (sol), koaksiyel elektroeğirme düzeneği (sağ)……..36

Resim 3.2: Altın nanoparçacık sentezi: (a) Altın nanoparçacıkların kimyasal indirgeme yöntemiyle sentezlenmesi için çekirdeklenme işlemi; (b) Turkevich yöntemiyle elde edilen sitrat-stabilize parçacıkların şematik gösterimi…….37

Resim 4.1: Elektroeğirme işleminde dış katmanda (kabuk) HFIP içerisinde ağırlıkça 15% PLLA ve iç katmanda (çekirdek) %1'lik asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden fiber elde etmek üzere 25kV voltaj, 15cm mesafe ve 0,5 mL/saat akış hızı ile fotoğrafik görüntüsü……..……..45

Resim 4.2: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×..... 46

Resim 4.3: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 20 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×..... 47

Resim 4.4: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 15 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×..... 48

Resim 4.5: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 10 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×..... 49

Resim 4.6: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 20 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×..... 50

Resim 4.7: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,2 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×..... 51

Resim 4.8: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,7 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×..... 52

Resim 4.9: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 1 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000× 53

Resim 4.10: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %2 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×..... 54

Resim 4.11: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin altın nanoparçacık çözeltisiyle kaplandıktan sonraki SEM görüntüleri. Büyütmeler (a)1000 ×; (b) 10000×, (c) Elementlerin renk dağılımı ve (d) Elementlerin üründe bulunma yüzdesi (EDS analizi yapılacağından bu örnek için ayrıca bir Au-Pd kaplaması gerçekleştirilmemiştir.). C: Karbon, O: Oksijen, Au: Altın..... 55

Resim 4.12: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-fiberlerin altın nanoparçacık çözeltisiyle kaplandıktan sonraki EDS analizi. C: Karbon, O: Oksijen, Al: Alüminyum, Au: Altın 56

Resim 4.13: PLLA/Kol-I fiberin STEM ile alınan koaksiyel yapı görüntüleri. Büyütme;18000× 57

Resim 4.14: Altın nanoparçacık sentezi sonucu üretilmiş olan süspansiyonların renk dağılımı 57

Resim 4.15: Parçacık boyutlarının belirlenmesinde kullanılan Zeta sizer cihazı 58

Resim 4.16: PLLA/Kol-I yara örtüsü üzerinde biriktirilen altın nanoparçacıkların EDS haritalamaları a) 0.saat, b) 1.gün, c) 3.gün, d) 5.gün, e) 14.gün 63

Resim 4.17: Kontrol, PLLA/Kol-I ve PLLA/Kol-I+AuNP örneklerindeki hücrelerin floresan görüntüleri, mavi (DAPI). Gösterge çubuğu: 155,5 µm 68

Resim 4.18: Kontrol, PLLA/Kol-I ve PLLA/Kol-I+AuNP örneklerindeki hücrelerin floresan görüntüleri, yeşil (FITC). Gösterge çubuğu: 155,5 µm 69

Resim 4.19: Kontrol, PLLA/Kol-I ve PLLA/Kol-I+AuNP örneklerindeki hücrelerin birleştirilmiş floresan görüntüleri, mavi (DAPI), yeşil (FITC). Gösterge çubuğu: 124,4 µm 70

Resim 4.20: PLLA/Kol-I+AuNP+EGF örneğindeki hücrelerin floresan görüntüleri, mavi (DAPI), yeşil (FITC). Gösterge çubukları: 155,5 µm, 124,4 µm 71

Resim 4.21: PLLA fiberleri üzerinde büyüyen ve yayılan NIH/3T3 hücrelerinin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: a)20 µm, b)40 µm 72

Resim 4.22: PLLA/Kol-I fiberleri üzerinde büyüyen ve yayılan NIH/3T3 hücrelerinin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: a)5 µm, b)20 µm, c)40 µm 73

Resim 4.23: PLLA/Kol-I+AuNP fiberleri üzerinde büyüyen ve yayılan NIH/3T3 hücrelerinin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: a)10 µm, b)30 µm, c)40 µm 74

Resim 4.24: PLLA/Kol-I+AuNP+EGF fiberleri üzerinde büyüyen ve yayılan NIH/3T3 hücrelerinin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: a)20 µm, b-c)40 µm 75

Resim 4.25: Yüzey temas açıları (a) PLLA/Kol-I, (b) PLLA/Kol-I+AuNP+EGF……. 76

Resim 4.26: (a) PLLA/Kol-I ve (b) PLLA/Kol-I+AuNP üzerindeki *E.coli* bakterisinin karşılaştırmalı SEM görüntüleri. Fiberler üzerindeki koyu renkli alanlar bakteri hücrelerinin bulunduğu alanları göstermektedir. Büyütmeler; 2000×……..……..…77

Resim 4.27: PLLA/Kol-I numunesi üzerindeki *S.aureus* bakterisinin SEM görüntüleri. Fiberler üzerindeki koyu renkli alanlar bakteri hücrelerinin bulunduğu alanları göstermektedir. Büyütmeler (a) 2000×; (b) 5000×; (c) 10000×……..….78

Resim 4.28: PLLA/Kol-I+AuNP numunesi üzerindeki *E.coli* bakterisinin SEM görüntüleri. Bakteri hücreleri siyah ok ile işaretlenmiştir. Büyütmeler (a) 2000×; (b) 5000×; (c) 10000×……...…….79

Resim 4.29: PLLA/Kol-I+AuNP numunesi üzerindeki *S.aureus* bakterisinin SEM görüntüleri. Bakteri hücreleri siyah ok ile işaretlenmiştir. Büyütmeler (a) 2000×; (b) 5000×; (c) 10000×……..……..80

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATR: Zayıflatılmış Toplam Yansıma (Attenuated Total Reflection)

AuNP: Altın Nanoparçacık

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor)

DAPI: 4 6, 6-Diamidino-2-fenilindol

DFU: Diyabetik Ayak Ülseri (Diabetic Foot Ulcer)

ECM: Hücre Dışı Matris (Extracellular Matrix)

EDS: Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy)

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)

FDA: Food and Drug Administration

FTIR: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

HA: Hyaluronik Asit

HFIP: Hexafluoroisopropanol

Kol-I: Kolajen Tip I

LH: Langerhans Hücreleri

PBS: Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline)

PCL: Polikaprolakton

PDLA: Poli(D-laktik asit)

PEG: Poli(etilen glikol)

PGA: Poli(glikolik asit)

PLA: Poli(laktik asit)

PLGA: Poli(laktik asit-ko-glikolik asit)

PLLA: Poli(L-laktik asit)

PU: Poliüretan

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)

TEM: Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope)

DERİ DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN EGF VE ALTIN NANOPARÇACIK YÜKLÜ ELEKTROEĞRİLMİŞ PLLA/KOL-I DUAL-NANOFİBER ÜRETİMİ

ÖZET

Amaç: Bu tezde, hastalık ve kazalar sonucu oluşan deri kayıplarının onarımında kullanılabilecek, özgün biyomalzeme işleme yöntemleriyle çekirdek-kabuk yapılı fiberlerden oluşan bir yara örtüsü üretimi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Koaksiyel elektroeğirme tekniğiyle, iç kısmında kolajen tip I (Kol-I) içeren ve dış katmanı poli(L-laktik asit) (PLLA) olan fiber yara örtüsü oluşturulmuştur. Rejenerasyonun hızlanması amacıyla epidermal büyüme faktörü (EGF) kullanılmıştır. Altın nanoparçaçıklar (AuNP) üretilen yara örtüsünün yüzeyine entegre edilmiştir.

Bulgular: Çekirdek-kabuk fiberlerin boncuksuz üretilebildiği optimum elektroeğirme parametreleri, taramalı elektron mikroskobuyla (SEM) 25kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı olarak belirlenmiştir. Şişme deneylerinde PLLA/Kol-I fiberinin en yüksek şişme oranı %148 olarak bulunmuştur. Hem PLLA/Kol-I hem de PLLA/Kol-I+AuNP, ticari yara örtüsü Tegaderm™ filme kıyasla daha yüksek oksijen geçirgenliği sağlamıştır. PLLA/Kol-I yara örtüsünün nem geçirgenliği ortalama 860 g/m^2 bulunmuştur. NIH/3T3 fibroblast hücreleri, PLLA, PLLA/Kol-I, PLLA/Kol-I+AuNP ve PLLA/Kol-I+AuNP+EGF fiberleri üzerine ekilmiştir. PrestoBlue testiyle grupların kontrolle eşdeğer hücre çoğalmasını sağladığı belirlenmiştir. Hücrelerin floresan mikroskop ve SEM ile görüntüleri alınmıştır. Yüzey temas açısı testiyle çekirdek kısmına kolajen eklendiğinde PLLA fiberlerinin hidrofobik olduğu bilinen karakterinin değişerek hidrofilik ($\theta \approx 49°$) hale geldiği gösterilmiştir. Antibakteriyel aktivite analizinde, AuNP eklenmiş PLLA/Kol-I örneklerde bakterilerin tutunmasının ve çoğalmasının AuNP içermeyen örneklere göre daha az olduğu SEM görüntüleriyle gösterilmiştir.

Sonuç: PLLA/Kol-I çekirdek-kabuk yapıdaki fiberlerden oluşan yara örtülerinin düşükle orta seviyeli eksüdatif yara bölgesinde sıvı emici özellikte ve oksijen açısından geçirgen bir ortam sağlayabileceği, çalışma sonunda elde edilen değerlerle

öngörülmektedir. EGF'li ve AuNP'li PLLA/Kol-I yara örtüsü ticari ürünlerle kıyaslanabilir seviyededir. Bu çalışma, elektroeğrilmiş çekirdek-kabuk fiberlerin klinikteki yara yönetiminde oldukça yararlı sonuçlar verebileceğinin bir göstergesi olmuştur.

Anahtar Kelimeler: altın nanoparçacıklar; doku mühendisliği; elektroeğirme; PLLA; tip I Kolajen; yara örtüsü

PRODUCTION OF ELECTROSPUN PLLA/KOL-I DUAL-NANOFIBERS LOADED WITH EGF AND GOLD NANOPARTICLES FOR SKIN TISSUE ENGINEERING

ABSTRACT

Aim: In this thesis, it is aimed to produce a wound dressing consisting of core-shell fibers with unique biomaterial processing methods that can be used in the repair of skin losses caused by diseases and accidents.

Materials and Methods: With the coaxial electrospinning technique, a fiber wound dressing with an inner layer of collagen type I (Col-I) and an outer layer of poly(L-lactic acid) (PLLA) was formed. In order to accelerate regeneration, epidermal growth factor (EGF) was used. Gold nanoparticles (AuNP) were integrated into surface of the wound dressings.

Results: Optimum electrospinning parameters for producing core-shell fibers without beads were determined as 25kV voltage, 15 cm distance and 0,5 ml/hour flow rate by scanning electron microscopy (SEM). In swelling experiments, the highest swelling ratio of PLLA/Col-I fiber was found as 148%. Both PLLA/Col-I and PLLA/Col-I+AuNP provided higher oxygen permeability compared to commercial dressing Tegaderm™ film. The average moisture permeability of the PLLA/Col-I dressing was found to be 860 g/m^2. NIH/3T3 fibroblast cells were seeded on PLLA, PLLA/Col-I, PLLA/Col-I+AuNP and PLLA/Col-I+AuNP+EGF fibers. With the PrestoBlue assay, it was determined that the groups provided cell proliferation equivalent to the control. Images of cells were taken by fluorescent microscope and SEM. With the surface contact angle test, it was shown that when collagen is added to the core, the hydrophobic character of PLLA fibers changes and the surface becomes hydrophilic ($\theta \approx 49°$). In the antibacterial activity analysis, SEM images showed that the adhesion and proliferation of bacteria in PLLA/Col-I samples with AuNP were less than in samples without AuNP.

Conclusion: It is predicted by the values obtained at the end of the study that the wound dressings consisting of PLLA/Col-I core-shell fibers can provide a fluid absorbing and oxygen permeable environment in the low to moderate exudative

wound area. PLLA/Col-I wound dressing with EGF and AuNP is comparable to commercial products. This study demonstrated that electrospun core-shell fibers can yield very useful results in clinical wound management.

Keywords: gold nanoparticles; electrospinning; PLLA; tissue engineering; type I collagen; wound dressing

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dış çevre ile insan vücudu arasındaki ilk kalkan deridir. Bu doku, vücut korumasında çok önemli bir rol oynar ve büyük boyutta hasar görürse hayati tehlike oluşturur. Dünya Sağlık Örgütü'ne (World Health Organization, WHO) göre, her yıl 265.000 ölümün yanıklardan kaynaklandığı ve yılda yaklaşık 6 milyon kişinin tıbbi yardım gerektirecek şekilde yanığa maruz kaldığı tahmin edilmektedir. Hastanede ortalama kalış süresi 8,4 gündür ve bu nedenle dünya genelindeki sağlık sistemleri için ciddi bir sosyal ve ekonomik yük oluşturmaktadır. Bu nedenle, yara örtüleri ve doku mühendisliği tabanlı ürünlerdeki son gelişmelere rağmen, deri dokusunun yenilenmesini teşvik etmek için yenilikçi stratejiler gerekmektedir. Bu alanda özellikle elektroeğrilmiş matrisler, deri dokusu yenilenmesi için kullanılan yüksek potansiyelli materyallerin ve işleme stratejilerinin kombinasyonu yoluyla artan bir ilgi görmeye başlamıştır.

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp, gelişimsel biyoloji, yaşam bilimleri ve klinik problemleri ele almaya çalışan mühendislik girişimlerinin bir karışımıdır. Doku mühendisliği 1988 yılında, normal ve patolojik memeli dokularındaki yapı fonksiyon ilişkilerinin temel anlayışına yönelik mühendislik ve yaşam bilimlerinin ilke ve yöntemlerinin uygulanması ve doku fonksiyonunun geri kazanılması, sürdürülmesi veya iyileştirilmesi için biyolojik ikamelerin geliştirilmesi olarak tanımlanmıştır. Organ nakli ihtiyacını azaltma potansiyelinin olmasıyla çalışılmış ve çeşitli organlara uygulanmıştır. Kök hücreler, iskele oluşturma ve hücre dışı matris (ECM) etkileşimleriyle sinyalleşme konusunda artan bir anlayış bu doku mühendisliği geleceğini mümkün kılacaktır.

Deri doku mühendisliği, yanık tedavisi ve yara bakımında, özellikle büyük kusurların kapanması için otolog donör derinin sınırlı kullanılabilirliğini göz önüne alarak, önemli gelişmeler sağlamıştır. Deri doku mühendisliği genellikle yeni doku tekrardan üretildiğinde vücuda asimile edilebilecek bir biyomimetik ECM gerektirir.

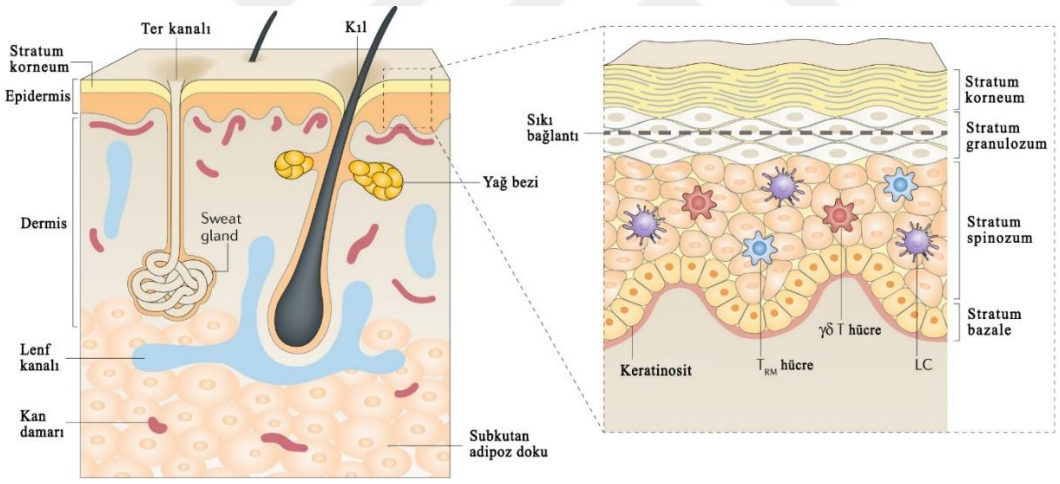
Böyle bir matris için biyomalzemeler, kolajen gibi doğal olarak oluşan maddeler olabilir veya biyolojik olarak parçalanabilir sentetik polimerlerden hazırlanabilir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, çok yönlülüğü ve düşük maliyeti nedeniyle doku mühendisliği alanında giderek öne çıkan ve özellikle mikro/nano fiber üretmek için yaygın olarak kullanılan bir teknik olan elektroeğirme yöntemi ile kayıp veya hasarlı deri dokusunun tedavisi için kullanılabilecek çift katmanlı (iç içe çekirdek kabuk yapıda) PLLA ve tip I kolajen mikro/nano-fiber matrisin oluşturulması hedeflenmiştir. Yapıya eklenecek altın nanoparçacıklar ile antibakteriyellik ve epidermal büyüme faktörüyle (EGF) deri doku onarımının tetiklenmesi amaçlanmıştır. Son yıllarda, doğal deri dokusunu taklit eden optimum özelliklerde elektroeğrilmiş bir yara örtüsü geliştirmek için farklı tasarım stratejileriyle, sentetik ve/veya doğal malzemeler, fiber oryantasyonları ve farklı maddelerin (örn., ilaçlar, peptidler, büyüme faktörleri veya diğer biyomoleküller) birleştirilmesi için çeşitli çabalar gösterilmektedir. Özellikle koaksiyel fiber eğirme teknolojisi uyarlanarak PLLA/Kol-I kompozit mikro/nano fiber bazlı membranlarının oluşturularak epidermis onarımında kullanılması ve antibakteriyel özellik sağlanması amaçlanmıştır. Yanıklarda ve diğer büyük deri kayıp ve yaralanmalarında oluşan bakteri ve mantar kaynaklı enfeksiyonların büyük oranda ölümlerden sorumlu olunduğu bilinmektedir. Ayrıca yaranın kapanması için doku rejenerasyonu önemli olmaktadır. Bu sorunların çözümü amacıyla, rejenerasyonu hızlandıran EGF ve antibakteriyel özellik sergileyebilecek altın nanoparçacıkları içeren PLLA/Kol-I mikro/nano-fiber membran tercih edilmiştir. Ayrıca, oluşturulan doku iskelesine deri hücreleri (fibroblast-NIH/3T3) ekildikten sonra *in vitro* yöntemlerle hücre-uyumluluğu testlerinin yapılması ile *in vivo* öncesi temel biyouyumluluk verilerinin elde edilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, yaygın patojenler olan *Staphylococcus aureus (S. aureus) ve Escherichia coli (E.coli)* ile yüzeyde bakteri tutunumu ve çoğalmasının değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DERİ

Tüm vücut ağırlığının %16'sını oluşturan, vücuttaki en büyük ve vücudun en dışındaki organı olduğu söylenir ve bu doğal örtü, neredeyse tüm cerrahların hastalarında ya da hastalarında ameliyat edeceği tek organdır, bu nedenle derinin anatomisi ve fizyolojisinin anlaşılması esastır (1, 2). Deri uzantıları (örneğin, kıl folikülleri ve ter bezleri) veya postkapiller venüller gibi immünolojik açıdan önemli anatomik bölgeler, bağışıklık hücreleri için özel portal alanlar olarak ve uyarılabilir deriyle ilişkili lenfoid doku dahil olmak üzere üçüncül lenfoid yapılar oluşturmak için işlev görür (2). Derinin yapısını gösteren bir resimleme Şekil 2.1'de sunulmuştur.



Şekil 2.1: Derinin fiziksel ve immünolojik bariyeri (2)

2.1.1. Epidermis

Epidermis, keratinositlerin morfolojisi ve yeri dikkate alınarak genellikle dört katmana ayrılır (Stratum bazale, Stratum spinozum, Stratum granulozum, Stratum korneum) ve doğrudan taban membran üzerinde dayanmayla, kısmen hızla çoğalan hücreler tarafından oluşturulan bazal tabakadır (3).

Epidermis derinin en dış tabakasıdır ve toplam kalınlıkta 0,5 mm (göz kapağı) ila 1,5 mm (avuç içi ve taban) arasında değişebilir ayrıca epidermis, Langerhans

hücreleri (LH'ler) ve Merkel hücreleri gibi bir dizi başka hücre popülasyonunu barındırır, ancak keratinositler en baskın hücre tipidir (4).

Bazal tabaka, taban membran bölgesine tutturulmuş kolon şeklindeki keratinositlerden oluşur ve bunlar, yanlarında bulunan melanositler tarafından transfer edilecek olan, melanin pigmenti içeren koyu lekeli oval çekirdeklere sahip tek bir hücre katmanı içerirler (5). Chadli ve ark., bazal tabakanın hem kök hücrelere yakın olan erken progenitör hücrelerini hem de keratinizasyon sürecini ayırabilen ve geçebilen geç progenitör hücreleri içerdiğini öne sürmüştür (6). Tek hücrelerin bazal tabakadan granüler tabakaya göç etmesi yaklaşık 26-42 gün sürer ve daha sonra kornifiye tabakadan geçiş için 14 gün daha gerektirir (4).

Desmozomlar, desmozomal kaderinleri sitoskeletal ağı oluşturan keratin ara filamanlarıyla bağlayarak bitişik hücreleri birbirine bağlayan yapışkan hücreler arası bağlantılardır (7). Bu kavşaklar, cildin ve diğer organların doğru çalışması için çok önemlidir; aslında, desmozomlarla ilişkili genlerdeki mutasyonlar kardiyomiyopatiye ve keratinizasyon bozukluklarına neden olur (8).

Stratum spinozum, gövde gibi ince bir kornifiye tabakası olan yerlerde, sadece bir ila üç hücre kalınlığında olabilirken, daha kalın bir kornifiye tabakası olan avuç içi ve tabanlar gibi yerlerde, 10 kattan daha kalın olabilir (9).

Stratum korneum, korneodesmozomlarla birbirine bağlanan ölü hücreler olan korneositler tarafından oluşturulur (4). Hücreler arası lipitler, korneositler, bazı amino asitler, ter ve yağ salgılarından kaynaklanan diğer tuzlar ve kornea proteinlerinin lipitlerin yanı sıra parçalanma ürünleri, genel bariyer etkisine katkıda bulunur, su kaybını önler ve cildin pH'ını optimum durumda tutar (10).

Kıl folikülleri, aşağı doğru çıkıntı yapan bir epitel tomurcuğu olarak epidermisten türetilen yapılardır. Kıl folikülleri üreten epidermisin bazal hücreleri, dermal papillaların oluştuğu dermal mezenkimal hücrelerin birikmesiyle yönlendirilir (11). Kıl kökleri avuç içleri ve ayak tabanları hariç tüm vücuda yayılır (4).

Epidermal bazal membran, epidermisi dermo-epidermal bileşkede bulunan dermal bağ dokusundan ayıran ince bir hücre dışı matristir ve dört ana bileşeni vardır: bazal hücre plazma zarı, lamina lucida, lamina densa ve sabitlenme fibrillerini içeren sublamina densa fibrillar bölgesi (12). Bir elektron mikroskobu altında şeffaf görünen

35-40 nm genişliğinde bir alan olan lamina lucida, dermal-epidermal bileşke içindeki en zayıf halkadır (13). Lamina densa, ana bileşeni hem keratinositler hem de fibrositler tarafından üretilen spesifik bir kolajen proteini, tip IV kolajen olan, 35 ila 60 nm kalınlığında elektronca yoğun bir bölgedir (10).

Epidermis ve dermis arasındaki arayüz, hücre ve sıvı değişimine izin veren ve iki tabakayı bir arada tutan gözenekli bir bazal membran bölgesi tarafından oluşturulur (14). Bazal keratinositler dermal-epidermal bağlantı yapılarının en önemli bileşenleridir; dermal fibroblastlar da dahil edilir ancak daha az ölçüdedir (15). Bazal lamina, esas olarak tip IV kolajenin yanı sıra sabitleme fibrilleri ve dermal mikrofibrillerden oluşan epidermisin bazal hücreleri tarafından sentezlenen bir tabakadır (16). Dermal-epidermal bağlantı epidermis için destek görevi görür, hücre polaritesi ve büyüme yönü belirler, bazal hücrelerde hücre iskeleti organizasyonunu yönlendirir, gelişimsel sinyaller sağlar ve katmanlar arasında yarı geçirgen bir bariyer görevi görür (17).

2.1.2. Dermis

Epidermisin altında, dermis adı verilen kalın bir lifli ve elastik doku tabakası, yapısal ve beslenme desteği sağlar ve iki katmandan oluşur: ince ve yüzeysel papiller dermis ve daha kalın ve daha derin bir retiküler dermis (3).

Dermis, fibroblastlar, fibrositler ve kan ve lenf damarlarının yapısal hücreleri gibi stromal hücreler içerir ve dermisin bileşenlerinin çoğu, melanositler gibi nöral tepeden türeyen sinirler hariç mezodermal kökenlidir (4). Dermis, kolajen ve elastik lifler tarafından bir arada tutulan bir mukopolisakkarit jelden oluşur ve kolajen lifleri dermisin % 70'ini oluşturarak güç ve dayanıklılık verirken, elastin normal elastikiyet ve esnekliği korur, proteoglikanlar ise viskozite ve hidrasyon sağlar (3).

Dermisin hücre dışı matrisi, matris metaloproteinazlar adı verilen proteolitik enzimler tarafından sürekli olarak bozunmakta ve yerini yeni matris bileşenleri almaktadır (3). Matris metaloproteinazlar esas olarak keratinositler, fibroblastlar, nötrofiller ve mast hücreleri tarafından üretilir (5). Matris metaloproteinazların üretimi, yara onarımı, deri yaşlanması veya tümöral invazyon gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde artar (3).

Kan ve lenfatik damarlar, cilde besin sağlama ve immünolojik süreçleri düzenleme gibi önemli homeostatik fonksiyonları yerine getirir(3). Kan mikrovaskülatürü epidermisin hemen altında bulunurken, lenfatik damarlar dermiste daha derinlerde bulunur (6).

Deri adneksası, gelişme sırasında epidermisten aşağı büyüme olarak ortaya çıkan ekrin ve apokrin bezleri ve kanallar dahil olmak üzere ektodermik olarak türetilen uzantıların bir grubudur (7). Yüz ve kafa derisi gibi alanlar çok miktarda pilosebaceous birimi içerdiğinden, bu alanlarda reepitelizasyon yaralanma sonrası sırt gibi daha az adneksiyal yapıya sahip alanlara göre daha hızlı gerçekleşir (8).

Hipodermis yedek bir enerji kaynağı olarak hizmet eder, deriyi korur ve altta yatan yapıların üzerinden kayarak hareketliliğe izin verir (3). Ek olarak, deri altı dokunun, androstenedionu aromataz enzimi tarafından estrona dönüştüren bir endokrin organ olduğu düşünülmektedir (8).

2.2. DERİDE BULUNAN HÜCRE TİPLERİ

Epidermisteki hücrelerin en az % 80'i ektodermik olarak türetilen keratinositlerdir (9). Keratin filamanlarının demetleri, desmozomlar olarak bilinen hücreler arası bağlanma plakalarını oluşturan plazma zarında birleşir ve sonlanır (8). Keratinizasyonun degradatif fazı sırasında, hücresel organeller kaybolur, hücrenin içeriği filamentler ve amorf hücre zarflarının bir karışımı halinde birleştirilir ve hücre sonunda korneosit olarak bilinir. Hücre ölümüyle sonuçlanan olgunlaşma süreci, korneositin terminal farklılaşması (keratinosit) olarak bilinir (7).

Kök hücreler, kendi köken dokularını karakterize eden farklı hücre soylarına kendini yenileme ve farklılaşma yetenekleri ile karakterize edilir (3). Epidermisin bazal tabakasındaki kök hücreler çok yavaş bölünme oranları (yılda 4-6 kez) ile karakterize edilir, uzun bir ömre sahiptir ve yüksek seviyelerde integrin alfa 6'yı eksprese ederken bazal tabakadaki progenitör hücreler, entukrin eksprese eder, çok daha hızlı bölünür (haftada bir kez) ve daha kısa bir ömre sahiptir (10).

Melanositler, gelişmekte olan embriyo yoluyla fetal vücuttaki belirli yerlere, çoğunlukla deriye ve kıl foliküllerine göç eden nöral tepeden türetilen hücrelerdir (11).

Epidermiste, ağırlıklı olarak bazal tabaka ile sınırlandırılırlar, burada sitoplazmik uzantılar (dendritler) yoluyla keratinositlerle temas ederler (3).

LH, birkaç T hücresi yanıtında yer alan antijen sunan dendritik hücrelerdir ve toplam epidermal hücre popülasyonunun % 2 ila % 8'ini oluşturan epidermiste, çoğu skuamöz ve granüler tabakalarda bulunur (3). Bu dendritik hücreler kemik darlığından türetilir ve melanositler gibi keratinositlerle hücreler arası birlikler oluşturmazlar ve LH'lerin fenotipik ayırt edici özelliği, langerin veya CD207 adı verilen C-tipi lektin reseptörünün ekspresyonudur (12).

Merkel hücreleri, epidermisin bazal tabakasında bulunurlar, oval şekildedir ve zarları sinaps benzeri yapılarla derideki sinir uçlarıyla etkileşir (3). Merkel hücreleri tip 1 mekanik reseptörler olarak işlev görür ve hafif dokunuşları algılayabilir (13).

Mast hücreleri, hem uyarlanabilir hem de doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinde önemli rol oynayan çok işlevli bağışıklık hücreleridir, sitokinleri ve kemokinleri salgılayarak bağışıklık sisteminin diğer önemli oyuncularını çekerler (3). Alerjik yanıtlardaki rollerine ek olarak, mast hücreleri diğer enflamatuar yanıtlarda, konakçı savunmasında, doğuştan gelen bağışıklığın yanı sıra hücre büyümesi ve adezyonunda rol oynar (14).

2.3. DERİDE YANIK VE DİĞER YARALAR

Akut travma, cerrahi müdahaleler, yanıklar, kronik yaralar, enfeksiyonlar ve genetik bozukluklar deri hasarının ortak nedenlerini temsil eder (15).

Dünya Sağlık Örgütü raporuyla ilgili olarak sıcak su, elektrik kimyasalları, radyasyon vb. olaylar ile meydana gelen yanıklar nedeniyle yılda 300.000'den fazla ölüm meydana gelir ve derin yaralar önemli ölçüde sıvı kaybı ve büyük doku hasarı ile sonuçlandığından, derinin çoklu yaşamsal fonksiyonları bozulmuştur (16).

Büyük yanık yaralanmalarında, şu anda kabul edilen tedavi taktiği, yara kapanmasının ardından derinin ısıyla denatüre olmuş proteinlerini uzaklaştırmak için oluşan kuru kabuğun alınmasını gerektirir (17). Toplam vücut yüzey alanına %20'den fazla zarar veren ciddi yanık yaralanmaları, hemen hemen her organ sistemini etkileyen ve önemli morbidite ve mortaliteye yol açabilecek en travmatik ve fiziksel olarak zayıflatıcı yaralanmalardır (18).

Deri kusurları, epidermal (sadece epidermal tabakayı etkiler), yüzeysel kısmi kalınlıkta (dermisin bir kısmı ile birlikte epidermal tabakayı etkiler), derin kısmi kalınlıkta (epidermise ve dermise zarar verir), ve tam kalınlıkta deri yaraları (her üç deri katmanına da zarar verir) olarak yara derinliklerine göre çeşitli kategorilerde sınıflandırılabilir (19). Çoğu deri yaraları doğal olarak iyileşebilir, ancak deride olan geniş(> 4 cm) veya geri dönüşü olmayan herhangi bir hasar (derin kısmi kalınlıkta veya tam kalınlıkta deri yaraları), iyileşmesi için genellikle daha uzun zaman alır ve ek ameliyat gerektirir (20). Tüm epidermal tabakayı ve dermal tabakanın marjinal kısmını içeren vücudun hasar görmemiş kısımlarından derinin toplanmasını kullanan split deri greftleri yaklaşımı, önemli miktarda gerekli derinin deri kusurlarının tedavisi için "altın standardı" temsil eder ancak donör bölge yetersizliği ve keloid oluşumu, tam kalınlıkta deri yaraları için split deri greftleri kullanımını daha da sınırlandırmaktadır (15).

Yanıklar ve sıcak su yanıkları (haşlanmalar) bazen yaygın tekniklerle başarılı bir şekilde tedavi edilemeyen ve ölüme yol açabilen hızlı, geniş ve derin yaralara neden olabilir (19).

Deri hasarının derecesine göre, deri yaralanmalarını şu şekilde ayrılabilir:

a. Epidermal yaralanmalar: Sadece epidermisi etkileyen küçük lezyonları temsil eden ve bu nedenle spesifik bir cerrahi tedavi gerektirmeyen yaralanmalardır ve bu tür yaralanmalar önemli bir iz bırakmadan hızlı bir şekilde yenilenir (21). Bu tür yaralanmalar, sadece epidermis etkilendiğinden ve sıyrık olmadan hızlı bir şekilde yeniden üretildiğinden, yara dokusuna katkıda bulunmak için hücre dışı matriks (ECM) birikimi oluşmadığından spesifik cerrahi tedavi gerektirmez (17).

b. Yüzeysel kısmi kalınlıktaki yaralar: Özellikle termal travma durumunda, bu tür yaralanmalara eşlik eden epidermal su toplama ve şiddetli ağrı ile dermisin epidermisini ve yüzeysel kısımlarını etkileyen yaralardır (22). Bu tür yaralar, bazal keratinositlerin çoğalmakta olan bir göçmen hücre tipine dönüştüğü ve hasarlı alanı kapladığı, yara kenarlarından kaynaklanan epitelizasyon yoluyla iyileşir (21).

c. Derin kısmi kalınlıktaki yaralanmalar: Daha az deri eklenmesiyle sonuçlanan daha fazla dermal hasar içeren ve iyileşmesi daha uzun süren yaralanmalardır ve bu tür yaralarda yüzeysel kısmi kalınlıktaki yaralarla karşılaştırıldığında skarlaşma daha belirgindir (21).

d. Tam kalınlıktaki yaralanmalar: Epitel-rejeneratif elementlerin tamamen imhası ile karakterize edilir ve çapı 1 cm'den fazla olan tüm tam kalınlıktaki deri yaraları daralma ile iyileşir, sadece yaranın kenarından epitelizasyon ile kozmetik ve fonksiyonel kusurlara yol açar (19).

18 yaş üstü nüfusun %9'undan fazlasını etkileyen artan bir sağlık sorunu olan diabetes mellitus, periferik arter hastalığı, nöropati, sınırlı eklem hareketliliği, anormal ayak basınçları, küçük travma ve ayak deformitesi gibi bazı ciddi sağlık sorunlarıyla ilişkilidir (23). Diyabetten zarar gören hastaların %15-25 oranında kronik bir yara gelişme şansı vardır ve diyabetle ilişkili kronik yaralar ayak, venöz ve basınç ülserlerini içerir (24). Diyabetik ayak ülserleri (DFU'ları), amacına ulaşmamış ve uzatılmış bir iyileşme süreciyle deride bozulma yaratan kronik, iyileşmeyen yaralar olarak sınıflandırılır ve küresel yaygınlığı %6,3 olan DFU'lar halk sağlığı üzerinde ağır bir yük oluşturmaktadır (25). Birkaç çalışma, ampütasyonların %85'inin ülserler tarafından yapıldığı sonucuna varmıştır ve yan yara bölgesinde yeni ülser oluşumu oranı %50'ye kadar çıkabilir (26). DFU'lar kronik olduğu için enfeksiyonu tedavi etmek zor olabilir ve bir ülser oluştuğunda, açık hava yaraları, sterilite eksikliği ve doğuştan gelen bariyer fonksiyonunun kaybı nedeniyle enfeksiyon oluşabilir ve yayılabilir (23). Ek olarak, hiperglisemi nedeniyle fagositoz azalır, fibroblast göçü engellenir, koruyucu bariyer ve onarım mekanizması yavaşlar. Normal yara eksüda seviyeleri iyileşme için optimize edilirken, kronik yaralarda eksüda seviyeleri daha yüksek matris metaloproteinaz konsantrasyonları içerir (27). DFU'larda bulunan patojenlerin çoğu *Staphylococcus aureus (S. aureus), Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa* ve anaerobik bakterilerdir (24). Bazı mühendislik ürünü örtüler, hidrojelleri, hidrokolloid filmleri, köpükleri, aljinatları vb. içerir ve bu pansumanların bazılarıyla ilişkili yaygın problemler ülser yatağını dehidre etmek, eksüda ile doygunluk ve/veya anjiyogenez ve granülasyon dokusunu teşvik etmek için gereken antibiyotik ve büyüme faktörlerini doğru şekilde uygulayamamaktır (23).

İltihaplı isilik (Empetigo), "*Streptococcus"* ve *"Staphylococcus"* türlerinin neden olduğu derinin çok yaygın ve oldukça bulaşıcı yüzeysel bir enfeksiyonudur, deride veya travmasız deride küçük aralarla deriye temas yoluyla yayılabilir (28). Dermal kolajen eksikliğine bağlı ince deri, Ehlers-Danlos sendromunun çeşitli formlarında, özellikle anormal kolajen tip III'e bağlı olarak EDS tip IV'te ortaya çıkar (29). Tinea dermatofitik

mantarların, özellikle *Trichophyton rubrum, T. tonsurans* ve *T. violaceum* gibi antropofilik türlerin neden olduğu bir mantar enfeksiyonudur (30).

Ichthyoses türü pullu bozukluklar, yüzeysel epidermisin (stratum korneum) kusurlu deskuamasyonundan kaynaklanır ve genellikle ichthyoses izole bir deri bozukluğudur, ancak bazı nadir tipler sinir sistemini veya iskeleti de etkiler (29).

2.4. YARA İYİLEŞMESİ

Yara iyileşme süreci, bir yaralanma ile başlayan ve aylarca yıllarca sürebilen karmaşık bir olay dizisidir ve üç aşamaya ayrılabilen dinamik bir süreçtir (Tablo 2.1) (31). Bağışıklık bileşenleri olarak fibroblastlar, keratinositler ve endotel hücreleri ve nötrofiller, monositler, makrofajlar, lenfositler ve dendritik hücreler gibi çeşitli hücreler yer alır (32).

Normal yara iyileşme sürecinde hemostaz, yara iyileşmesinden sonraki ilk dakikalarda ortaya çıkan yara iyileşmesinin ilk aşamasıdır ve bu işlem i)kan akışını azaltan vazokonstriksiyon; ii)bir trombosit (platelet) tıkacının oluşumu: trombositler reseptörleri eksprese eder ve iii)trombosit tıkacı çevresinde bir fibrin pıhtı oluşumu (33). Yapısal bütünlük kaybı, damar duvarlarının pıhtılaşma kaskadı ve daralmasını başlatır; ortaya çıkan pıhtı oluşumu ve trombosit agregasyonu daha fazla kan kaybını sınırlar ve pıhtıda hapsolmuş trombositler, hemostaz ve normal inflamatuar yanıt için gereklidir (34).

Enflamasyon da iyileşme sürecini başlatır ve enflamatuar döngünün sonuna doğru, yaradaki gelişen eikosanoid ortamı mevcut hücre tipleri ile etkileşime girerek kolajen ve öğütülmüş maddenin fibroblast sentezine yol açar (prostaglandin F2a'nın PGE2'ye artan oranından) (31). Monositler daha sonra yara yatağına girdikten sonra, fagositoza katılan, birkaç büyüme faktörü ve sitokin salgılayan, anjiyogenezi teşvik eden ve granülasyon dokusu oluşumunu dolaylı olarak uyaran ve yeniden epitelizasyona yol açan makrofajlara olgunlaşırlar (33).

Enflamatuar faz sona ermeden önce, makrofajlar tarafından salınan faktörler, göç etmeye ve çoğalmaya başlayan, yeni bir hücre dışı matris bırakan ve granülasyon dokusu oluşturan çevre dokulardan fibroblastları, endotel hücrelerini ve keratinositleri aktive eder, yavaş yavaş yara ve çevre arasında bir bariyer oluşturur ve yarayı kapatır (33).

Yetişkinlerde yara iyileşmesi her zaman fibroz ve daha sonraki skar oluşumu ile bağlantılıdır ve skar dokusu, değiştirilmiş bir hücre dışı matris bileşimi ile normal deriden daha zayıf kalır (35).

Neovaskülarizasyon, fibroblastların ilerleyen hattının yaraya doğru büyümesini kolaylaştırır ve onlara gerekli besinleri ve sitokinleri sağlar ayrıca fibrin, pıhtı ve geçici matrisin bozunması, yara kaplanana kadar devam eden granülasyon dokusunun (öğütülmüş madde, rasgele depolanmış kolajen, kılcal damarlar, fibroblastlar) birikmesine eşlik eder (31). Yaranın olgunlaşması yaralanmadan 3 gün sonra başlayabilir ve bu aşama sırasında, daha önce bırakılan kolajen matrisi yavaş yavaş yeniden modellenir (33). Granülasyon dokusunda rastgele biriktirilen yeni sentezlenmiş kolajen, yeni oluşturulan granülasyon dokusu için tipiktir (36). Daha sonra, kolajen, artan gerilme mukavemeti ile daha organize bir yapıya dönüştürülür ve yavaş yavaş, kolajen tip I, normal deri oranı 4:1 olana kadar tip III kolajenin yerini alır (31). Yeniden modelleme devam ettikçe, matris metaloproteinaz kolajenoliz, kolajen sentezi ile kararlı bir duruma ulaşır ve böylece yaralanmadan yaklaşık 1 yıl sonra orijinal gücün % 80'inde gerilme mukavemeti platoları olur (37). Tablo 2.1'de yara iyileşmesinin fazları gösterilmektedir.

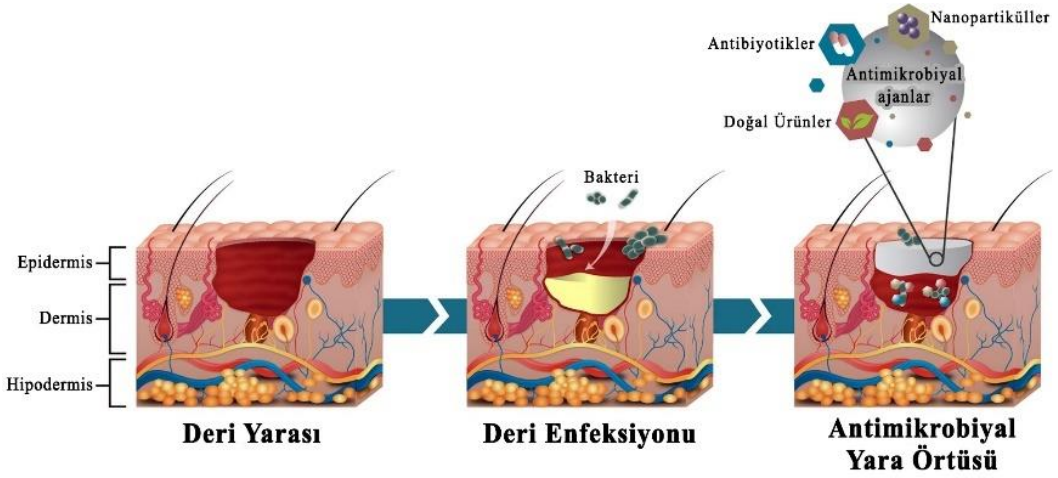
Tablo 2.1: Yara iyileşmesinin fazları (43)

Faz	**Zaman**	**Olaylar**
1.Enflamasyon Fazı	Anında	-Hemostaz *Vazokonstriksiyon *Trombosit Agregasyonu *Kanın Pıhtılaşması *İltihap -Vazodilatasyon *İnflamatuar Hücre Göçü *Fagositoz
2. Proliferatif Faz	Günlerden haftalara	-Granülasyon *Kusurları dolduran ve yeni kılcal damarların oluşumunu destekleyen fibroblastlar/kolajen (anjiyoneogenez) -Kasılma *Yara kenarları kusur yüzeyini azaltmak için birlikte çekilir. -Epitelizasyon *Nemli yüzey hücreleri, her yönden başlangıç noktasından yaklaşık 3 cm hareket eder.
3. Olgunlaşma Fazı	Haftalardan yıllara	-Yaralara çekme mukavemetini artıran yeni kolajen formları. -Skar dokusu orijinal doku kadar güçlüdür.

2.5. DERİ DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE DERİ İKAMELERİ

Doku mühendisliği 1988 yılında, normal ve patolojik memeli dokularındaki yapı fonksiyon ilişkilerinin temel anlayışına yönelik mühendislik ve yaşam bilimlerinin ilke ve yöntemlerinin uygulanması ve doku fonksiyonunun geri kazanılması, sürdürülmesi veya iyileştirilmesi için biyolojik ikamelerin geliştirilmesi olarak tanımlanmıştır (38). Prensipleri, otolog hücrelerin *in vitro* ekimi, bu hücrelerin ve bir taşıyıcı araç ve/veya matrisin kombinasyonu ve bu yeni oluşan dokunun *in vitro* veya *in vivo* farklılaşmasıdır ve bu kombinasyonların hepsinin ortak bir amacı vardır: normal anatomi ve fizyolojiye eşdeğer bir derinin üretilmesi (39).

3B yapıda bir deri ikamesi birden fazla deri katmanından oluşmalı ve bir iskele, ortalama 100-200 mm bir gözenek boyutu ve % 90'dan daha fazla gözeneklilik gibi uygun mikro yapılar gerektirmektedir (40). Deri doku mühendisliği genellikle yeni doku tekrardan üretildiğinde vücuda asimile edilebilecek bir biyomimetik ekstraselüler matriks (ECM) gerektirir ve böyle bir matris için biyomalzemeler, kolajen gibi doğal olarak oluşan maddeler olabilir veya biyolojik olarak parçalanabilir sentetik polimerlerden hazırlanabilir (41). Son zamanlarda, moleküler biyolojideki ana gelişmelerin bir kısmı yaranın iyileşmesi, gelişimi ve rejeneratif süreçleri anlamada uygulanmıştır (42). Şekil 2.2'de dermis takabasının hasarını da içeren deri hasarında kullanılabilecek antimikrobiyal yara örtüsü uygulamasının bir örneği verilmiştir.



Şekil 2.2: Deri hasarında yara örtüsü (43)

Deri doku mühendisliği, yanık tedavisi ve yara bakımında, özellikle büyük kusurların kapanması için otolog donör derinin sınırlı kullanılabilirliğini göz önüne alarak, önemli gelişmeler sağlamıştır (38). Doku mühendisliği ile tam kalınlıkta deri yenilenmesi, hem epidermal bariyer fonksiyonunu hem de esnekliğin ve mekanik stabilitenin dermal özelliklerini geri yükleyebilen bir malzeme gerektirir ve ideal olarak, deri ekleri de içermesi gerekir (39).

İdeal bir yara örtüsü, yara arayüzünde nemli bir ortam sağlamalı, gaz değişimine izin vermeli, mikroorganizmalara bir bariyer görevi görmelidir. Ayrıca toksik, alerjik ve yapışkan olmamalı ve travma olmadan kolayca çıkarılmalıdır. Minimal işleme gerektiren, antimikrobiyal özelliklere sahip olan ve yara iyileşmesini destekleyen hazır bir biyomalzemeden yapılmalıdır (44). İdeal doku mühendisliği ikameleri, yarayı protein kaybından korumalı, yara bölgesinin estetik görünümünü iyileştirmeli, eksojen mikroorganizma istilasını önlemeli ve doğal deri fonksiyonlarını mümkün olduğunca taklit etmelidir (45).

Bugüne kadar, geniş yanıklara veya travmatik deri kaybına sahip hastalar için altın standart tedavi, bir deri greftinin hastanın sağlıklı, hasarsız bir donör bölgesinden toplandığı ve yara bölgesine nakledildiği otolog deri greftlemesidir (46). Hastalar artık cerrahi tekniklerdeki ilerlemeler, yapay deri ikamelerin uygulanması ve gelişmiş yoğun bakım nedeniyle %90'ın üzerinde toplam vücut yüzey alanını etkileyen şiddetli yanıklardan sağ çıkabilmektedir (47). Ticari olarak temin edilebilen yara örtülerinin birçoğu Tablo 2.2'de verilmiştir. Yara örtülerinin özellikleri emicilik seviyesine göre değişir. Islak, emici bir pansuman sadece çok sızan yaralar için pratik olabilir, öte yandan bir tür tıkayıcı film sadece nemi muhafaza etmesi gereken yaralar için avantajlı olabilir (48).

Sonuç olarak, yapay deri oluşturmak için şu anda üç farklı yaklaşım kullanılmaktadır: epidermisi yeniden oluşturmak, dermisi yeniden oluşturmak ve iki katmanlı bir greft kullanarak hem dermisi hem de epidermisi yeniden oluşturmak (49). İdeal bir biyomalzeme en az derecede mekanik ve hal değişikliği olarak kayıp doku ile eşleşmeli, hücre büyümesi ve besinlerin akışı için dokuda vasküler destekleyici olmalı, yeni inşa edilen dokunun rekonstrüksiyonu ile birlikte bozunmalı ve bozunma ürünleri doku rejenerasyonunu ve yeniden modelleme işlemini etkilememelidir (50).

Tablo 2.2: Yaygın olarak kullanılan ticari yara örtüleri ve greftleri (41, 48, 51)

Ürün Adı	**Şirket Adı**	**Özellikleri**	**Uygulamalar**	**Örtünün Sürekliliği**
Alloderm	Lifecell Corporation	Tüm hücresel materyal çıkarılmış normal insan dermisi.	Yara bölgesinde deri yenilenmesi için kullanılan hücresiz dermal greft.	Kalıcı
MySkin	Altrika, Sheffield	Hastanın kendi derisinin biyopsi örneğinden kültürlenmiş canlı keratinositlerden oluşan kültürlü otogreft.	Kısmi kalınlıkta yanık, diyabetik nöropatik için deri grefti ve basınç ülseri.	Kalıcı
Apligraft	Organogenesis	Dermal fibroblast süspansiyonu ile karışmış sığır Tip I kolajen.	Epidermal ve dermal greft	Geçici
Integra	Integra LifeSciences Corporation	Dermal iskele üzerine yerleştirilen geçici aselüler silikon epidermal ikame, kolajen ve büyüme faktörlerinden oluşur.	Kısmi ve tam kalınlıkta yanık, diyabetik, venöz ve basınç ülserleri.	Yarı Kalıcı
BioSeed-S	BioTissue Technologies	Fibrin yapıştırıcıya gömülü otolog keratinositler.	Venöz bacak ülserleri	Kalıcı
Dermagraft	Advanced BioHealing	Biyolojik olarak bozunabilir poliglaktin mesh üzerine gömülü yenidoğan derisinden yaşayan allojenik fibroblastlar.	Diyabetik ayak ülseri, epidermolizis bülloza	Geçici
Hyalograft 3-D	Fidia Advanced Biopolymers	Otolog fibroblastlı esterleştirilmiş hyaluronik asit matrisi.	Tam ve kısmi kalınlıkta yara, skleroderma	Kalıcı
Laserskin	Fidia Advanced Biopolymers	Benzil hiyalüronatın lazer mikroperforasyonlu membranı üzerinde insan keratinositleri.	Hücresiz dermal greft	Kalıcı

Tablo 2.2: (devam)

Aquacel	Conva Tec	Esas olarak aljinatlardan oluşan ince film, tabaka veya kompozit örtü.	Basınç yaraları, küçük yanıklar ve travmatik yaralanmalar gibi hafif ve orta derecede eksüdasyonlu yaralar.	Geçici
Tegasorb	3M Healthcare	İnce film veya tabaka şeklinde hidrokolloid yara örtüsü.	Küçük yanıklar ve travmatik yaralanmalar gibi nemli yaralar	Geçici
Flexigel	Smith and Nephew	Hidrojel esnek tabaka	Alt meme bölgesi ve yumuşak dokuların iyileşmeyen yarası	Geçici
Cica Care	Smith and Nephew	Silikon levha	Hipertrofik yara izi	Geçici
Regranex	Healthpoint Biotherapeutics	Hidrojel içeren büyüme faktörlerinden türetilen trombositler	Sakral dekübitus ülseri	Geçici
Biobrane	Dow Hickham/Berek Pharmaceuticals	Silikon, naylon mesh, kolajen	Yeni cildin rejenerasyonu için biyosentetik ikame	Geçici
Epicel	Genzyme Corporation	Canlı keratinositten yapılmış, dermal bileşen içermeyen kültürlü otogreft	Derin dermal ve tam kalınlıkta yanık	Kalıcı

2.6. DOĞAL BİYOMALZEMELER

2.6.1. Kolajen

Kolajen ECM'nin biyolojik ve yapısal bütünlüğünün korunmasında baskın bir rol oynar ve hücresel davranışı ve doku fonksiyonunu iyileştirmek için sürekli bir değişiklikten geçen dinamik ve esnek bir malzemedir (52).

Kolajen vücudun hemen hemen tüm bölgelerinde bulunabilir, örneğin, deri ağırlıklı olarak kolajen tip I ve III'ten oluşurken, kolajen tip II kıkırdağın ana bileşenidir

(53). Kolajen, insan proteininin yaklaşık üçte birini ve derinin kuru ağırlığının üçte ikisini oluşturur ve bir kolajen üçlü sarmalındaki her bir polipeptit zinciri, bin kadar ya da daha çok amino asit kalıntısından oluşur (52).

Dünyadaki en bol protein olan kolajen, neredeyse tüm canlı hayvanlardan toplanabilir. Sığır derisi ve tendon, sıçan kuyruğu ve domuz derisi, doku mühendisliğinde en sık kullanılan kolajen kaynaklarıdır (54). Rekombinant kolajen, bitkiler, bakteriler, böcek hücreleri ve maya dahil rekombinant sistemde üretilen daha yeni bir kolajen kaynağıdır (55). Rekombinant insan kolajeni patojen iletimi ve gruptan gruba varyasyon riskini ortadan kaldırır, ancak daha maliyetlidir (53).

Doğal dokularda, tip I kolajen fibrilleri 50 ila 500nm çapındadır ve çok düzgün boyuttadır ve tip I kolajenin fibriler yapısının uzun zamandır doku kültüründe farklılaşmış fonksiyon, hücre bağlanması ve proliferasyonu için önemli olduğu bilinmektedir (56). Doğal ECM'de, kolajen nanofiber ölçekte (50-500 nm) multi fibrillerden oluşan üç boyutlu bir ağ yapısında bulunmaktadır (57).

Kolajen son derece esnektir (58). Kolajen, doku mühendisliği iskeleleri üretimi için, hücrelere yapısal destek sağladığı ve hücre davranışını ve doku oluşumunu tanımlayan hem biyolojik hem de mekanik ipuçları sağladığı için yaygın olarak kullanılmaktadır (53). Kolajen tabakalar, tüpler, köpükler, süngerler, nanofiberler, polarlar, tozlar, enjekte edilebilir viskoz çözeltiler ve dispersiyonlar şeklinde kullanılmıştır (58). Şu anda, sadece kolajen tip I, II, III ve IV elektroeğrilmiştir ve elektroeğirme, çeşitli amaçlar için hem hizalanmış hem de rastgele kolajen nanofiberleri üretebilir (53). Fibril oluşturan kolajenler, geniş homolog sekans bölümlerine sahiptir ayrıca yara iyileşmesi ve doku mühendisliği amaçları için en yaygın kullanılan kolajen bazlı biyomalzeme formlarını oluşturur (52). Nanofiberlerden oluşan dokunmamış tip bir matris, elektroeğirme yoluyla kolayca üretilir ve mimari olarak ECM'nin kolajen yapısına benzer (56).

Kolajen yapı iskeleleri çoğunlukla liyofilizasyon, elektroeğirme ve biyoyazıcı ile yapılır, ayrıca kolajen, kimyasal, UV ışığı ve enzim bazlı çapraz bağlama yöntemleriyle üretilen iskele yapılarının bütünlüğünü ve kararlılığını arttırmak için kullanılır (59).

Elektroeğrilmiş kolajen mikro/nano-fiberleri, çeşitli açılardan diğer polimer mikro/nano-fiberlerinden üstündür: i) kolajen vücuttaki birçok dokunun ana ECM proteinidir, ii) kolajenin zayıf immünojenisitesi vardır ve kolajen mikro/nano-fiberlerin

implantasyonunun konakçı immün yanıtını aktive etmesi muhtemel değildir, iii) kolajen mükemmel biyouyumluluğa sahiptir. Hemen hemen tüm hücreler kolajeni sever (53). Kolajen bazlı iskelelerin etkisini tehlikeye atan sorun, düşük mekanik mukavemettir (60).

Çekirdek-kabuk yapısına sahip fiberler üreten koaksiyel elektroeğirme, kompozit kolajen fiberleri üretmek için başka bir yöntemdir ve kolajen iç (çekirdek) veya dış (kabuk) tabaka olarak elektroeğrilebilir (61). Bununla birlikte, mükemmel biyolojik aktivitesi nedeniyle, kolajenin mekanik mukavemetini arttırmak için iç tabaka olarak sentetik bir polimer ile dış tabaka olarak elektroeğrilebilir (62).

Özet olarak, kolajen iyi bir yara iyileşme tepkisi (minimal yara kasılması, hızlı doku entegrasyonu ve vasküler yatakların oluşumu) olan iskeleler için temel olarak tercih edilebilir ve çoklu imalat yöntemlerinde kullanılabilir (59).

2.6.2. Jelatin

Jelatin, kolajenin üçlü sarmal yapısının tek tür moleküllerine bölünmesiyle elde edilen, kısmen denatüre lifli çözünmeyen protein kolajen türevidir ve jelatinin makrofajların aktivasyonunu arttırdığı ve hemostatik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (63).

Bitkilerden elde edilen hidrokolloidlerin aksine, jelatin, kolajen adı verilen bir hayvan proteininden elde edilen özel bir hidrokolloid türüdür (64). Tıbbi uygulamalarda ve özellikle yara iyileştirme uygulamalarında, hidrokolloidin kapsülleme özelliği en yüksek kullanıma sahiptir (65). Farklı yapısal jelleşmeye sahip farklı tipteki hidrokolloid jeller, hidrokolloid yara örtülerine ilaç salımının kontrolünü sağlama fırsatı verir (66).

Çoklu meta-analiz, yaralar için hidrokolloid yara örtülerinin gazlı bezden çok daha iyi olduğunu ortaya koymaktadır ve bu tür yara örtülerinin iyileştirme oranları, diğer nemli iyileştirici örtülere benzer şekilde yüksektir (67).

Özet olarak, jelatin, kolajen ile benzer biyouyumluluk ve işlem esnekliğine sahiptir, ancak yüksek çözünürlüğü ve düşük maliyeti nedeniyle artan ekonomik uygulanabilirliğe sahiptir (59).

2.6.3. Elastin

Yaklaşık 64-66 kDa moleküler kütleye sahip olan elastin, birçok omurgalı dokunun geri çekilme kapasitesi için kritik olan önemli bir ECM proteinidir ve derinin kuru ağırlığının yaklaşık % 2-5'ini oluşturur (59). Dermiste harici bir kuvvet uygulandıktan sonra pasif olarak etki ederek deriyi orijinal haline döndürür (68). Elastinin yarı ömrünün yaklaşık 70 yıl olduğu tahmin edilmektedir ve bu nedenle konağın ömrü boyunca devam ettiği düşünülmektedir (69).

Elastin, esnekliğin büyük önem taşıdığı organlarda, yaşam boyunca bir milyardan fazla kez gerilen ve gevşeyen kan damarlarında, elastik bağlarda, akciğerde ve deride bol miktarda bulunur (70).

Elastin, bir biyomalzeme olarak kullanıldığında, bazı durumlarda çeşitli problemler ortaya çıkabilir. Bunlardan biri, biyomalzeme biliminde iyi anlaşılmamış bir olgu olan ve sıklıkla kardiyovasküler protez implantlarda (örn. Biyoprotez kalp kapakçıkları ve aort homogreftleri) meydana gelen kireçlenmedir (kalsifikasyon) (71).

Elastik lifler cildin önemli bileşenleridir, ancak üretimi genellikle doku mühendisliği yapılarında sınırlıdır (72). Bununla birlikte, sadece birkaç araştırmacı deri yerine elastin içeren maddelerin kullanımını araştırmıştır. Bunlar, yaklaşık %70 kolajen ve %30 çözünmez elastin ve az miktarda glikosaminoglikandan oluşan hücresizleştirilmiş domuz membranını, %3 α-elastin ile kaplanmış tip I kolajen iskelelerini, aljinat örtülere kovalent olarak bağlı elastinin hibrit peptitlerini ve enjekte edilmiş α-elastini içerir (71).

2.6.4. Fibrin

Fibrin, kan pıhtılaşmasında rol oynayan proteaz trombininin etkisi ile fibrinojenden türetilmiş lifli, nonglobular bir proteindir, yara iyileşmesi için doğal bir iskele olarak ve hücre nakli için bir taşıyıcı olarak kullanılır (73). Başlangıçta cerrahi prosedürlerde hemostaz sağlaması amaçlanan fibrin yapıştırıcılar, deri grefti yapışması ve yara iyileşmesi gibi diğer klinik uygulamalara kadar genişletilmiştir (74). Bununla birlikte, deri doku mühendisliğinde fibrin yapıştırıcılarının iskeleler olarak kullanılması, hücre sağkalımı için uygun olmayan oldukça yoğun yapıları nedeniyle bir sorun olmaya devam etmektedir (75). Fibrin yapıştırıcılar ve fibrin jeller, homeostazı geliştirmek, doku kullanımını iyileştirmek ve hızlı yara iyileşmesini sağlamak için yoğun bir şekilde

kullanılmıştır ve AcuDress, Allox ve ICX-PRO, fibrin bazlı biyomalzemelerin yaygın örnekleridir (74). *In vitro* olarak oluşturulan fibrin hidrojelleri, *in vivo* fibrin pıhtılarına benzer yapı ve mekanik özellikler sergiler (76). İskele olarak fibrin hidrojelleri kullanan farklı ko-kültür deri modellerinin (keratinositler/fibroblastlar) vasküler büyümeyi ve epidermis rejenerasyonunu, çıplak farelere *in vivo* implantasyondan sonra biyo-entegrasyonu ve şiddetli yanık alanlarının kaplanmasını arttırdığı bildirilmiştir (75). Bununla birlikte, fibrin esaslı iskelelerinin deri doku mühendisliğindeki uygulamaları, zayıf mekanik özellikleri ve hızlı biyobozunurlukları nedeniyle sınırlıdır (77). Son zamanlarda, fibrin, iç içe geçen polimer ağı mimarisinde, polivinil alkol ve serum albüminin biyobozunur bir ortak ağına birleştirilmiştir ve sonuçlar, kompozit biyomalzemelerin sadece büzülmeyi önlemekle kalmayıp aynı zamanda gelişmiş mekanik özellikler sergilediğini göstermiştir (78).

2.6.5. Hyaluronik Asit

Hyaluronik asit (HA), vücudun birçok yerinde hücre dışı dokuda bulunan bir glikozaminoglikandır ve doku kültürü iskelelerinden kozmetik malzemelere kadar çeşitli alanlarda uygulamalar bulmaktadır (79). İnsanlarda, toplam vücut HA'nın %50'sini derideki HA oluşturur ve HA öncelikle mezenkimal hücreler tarafından değil, aynı zamanda diğer hücre tipleri tarafından da üretilir (80). HA sentezi doku yaralanması ve yara iyileşmesi sırasında artar ve HA, bağışıklık tepkisini arttırmak için enflamatuar hücrelerin aktivasyonu, fibroblastların ve epitel hücrelerinin hasarına yanıtı içeren doku onarımının çeşitli yönlerini düzenler (80). HA ayrıca, tümör ilerlemesinde rol oynayabilecek kan damarı oluşumu ve fibroblast göçü için yapı sağlar (81).

Genellikle 1,000 kDa'dan fazla olan yüksek moleküler boyutlu HA, sağlam dokularda bulunur ve antianjiyojenik ve immüno baskılayıcıdır, oysa HA'nın daha küçük polimerleri, acı sinyalleri ve enflamasyon ve anjiyogenezin güçlü indükleyicisidir (82). HA'nın kanda 3 ila 5 dakika, deride bir günden az ve kıkırdakta 1 ila 3 hafta arasında bir yarılanma ömrü vardır (80).

HA, yara iyileşme sürecindeki her adımın bir parçası olduğundan dışsal HA, daha hızlı iyileşme sağlama potansiyeline sahiptir ve hücre infiltrasyonu için elverişli hidratlı bir ortam sağlama kabiliyeti nedeniyle, HA bazlı hidrojeller, diyabetik hastalar gibi

iyileşme bozukluğu olan hastalarda kronik yaraları veya yaraları tedavi etmek için yara greftleri olarak idealdir (79).

2.6.6. Kitin ve Kitosan

Kitin, omurgasız iskeletinden ve mantarların hücre duvarından elde edilen, kolayca ulaşılabilir olan ve ucuz bir biyolojik materyaldir (44). Kitinler, karides, yengeç ve ıstakoz gibi kabuklu deniz ürünlerinin kabuklarının ana bileşenidir, ayrıca yumuşakçaların ve böceklerin dış iskeletlerinde ve ayrıca bazı mantarların hücre duvarlarında bulunur (83). Genellikle ticari olarak deasetilasyon veya asetil gruplarının kitin polimerden alkali ile işlenerek uzaklaştırılmasıyla üretilir (84).

Biyopolimer kitosan, doğada en bol bulunan polisakkaritlerden biri olan kitinin bazik deasetilasyonu ile elde edilir ve ilaç taşıyıcılar, cerrahi iplikler ve yara örtüsü malzemeleri gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmıştır (63). Birçok araştırmacı tarafından da kitosanın çok yönlü biyolojik, kimyasal ve fiziksel özellikleri nedeniyle geniş bir kullanım alanı için büyük bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (85). Hemostaz ve hızlanan kolajen sentezi gibi yara iyileşmesi için birçok avantajı nedeniyle, deri dokusu mühendisliğinde kitosan kullanımı yaygın olarak rapor edilmiştir (63).

Kitosanın biyouyumluluğu, biyolojik olarak bozunabilirliği, toksik olmaması ve antimikrobiyal aktivitesi son yıllarda araştırmacıların dikkatini çekmekte ve biyomedikal mühendisliği alanında büyük ilgi görmektedir (86).

Kitin ve kitosandaki amin gruplarının varlığı, büyük bir avantaj sağlar çünkü farklı biyolojik fonksiyonların yanı sıra modifikasyon reaksiyonlarının uygulanmasını mümkün kılar (87). Bu polisakkaritlerin biyouyumluluk, biyobozunurluk, biyoaktivite, biyo-emicilik, toksik olmama ve iyi adsorpsiyon özellikleri gibi mükemmel özellikleri, bu materyalleri çok uygun ve temel biyomalzemeler haline getirir ve sentetik polimerlere olası alternatifler olarak büyük ölçüde endüstriyel ilgi çeker (88). Bu özellikler nedeniyle, iyi biyouyumluluk ve yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkiler gösterirler ve önceki çalışmalar, kitin bazlı pansumanların farklı dokuların onarımını hızlandırabildiğini, yaraların daralmasını kolaylaştırdığını ve interlökin 8, prostaglandin E, interlökin 1 β ve

diğerleri gibi enflamatuar aracıların salgılanmasını düzenlediğini göstermiştir (44). Kitosan, daha hızlı yara iyileşmesi ve yara izinin önlenmesine yardımcı olur (89).

2.6.7. İpek Fibroin

Genellikle *Bombyx mori* ipek böceğinin kozasından türetilmiş lifli bir protein olan ipek fibroin, doku mühendisliği ve rejenerasyon uygulamaları için umut verici bir biyomalzeme olarak yoğun bir şekilde uygulanmıştır (90). İpek fibroin, benzersiz özellikleri nedeniyle yara örtüleri için kullanılır: biyouyumluluk, biyobozunurluk, esneklik, yapışma, sızan maddelerin emilimi, minimal inflamatuar reaksiyon (73). Çeşitli çalışmalar, hidrojeller, süngerler, filmler, elektroeğrilmiş nanofiber matlar ve hidrokolloid yara örtüleri gibi farklı formlardaki ipek fibroinin, iyileşme sürecini desteklemek üzere tedavi edici kullanımı için başarıyla uygulandığını bildirmiştir (90).

İpek bazlı hidrojelin, yara iyileşmesi üzerinde potansiyel etkileri olduğu gösterilmiştir (91). Bir çalışmada, ipek ve L-prolin ile yüklenen biyomimetik hidrojel, *in vitro* yara iyileşmesini önemli ölçüde geliştirmiştir (92).

Hyung ve ark.'nın elde ettiği veriler, üretilen ipek fibroin nanomatrislerinin, ticari olarak temin edilebilen örtüler (örn. Mediofoam® ve tıbbi gazlı bez) kıyasla daha yüksek oranda epitelizasyonu ve kolajen üretimini uyarabildiğini ortaya koymaktadır (93).

2.7. SENTETİK BİYOMALZEMELER

Sentetik biyomalzemeler genellikle daha az immünojenik olarak kabul edilir, çünkü sentetik biyomalzemelerin hayvan kaynaklarından türetilmesi gerekmez ve sentetik malzemelerin yan ürünleri normal olarak atıldığından kronik bir bağışıklık tepkisine neden olmaz (94).

Biyobozunmayan sentetik polimerlerin ortak bir özelliği biyolojik olarak stabil olmalarıdır. Bu malzemeler biyomalzemeye karşı konak tepkisini en aza indirgemek için geliştirilmiştir ve dikiş malzemeleri, ortopedik implantlar, kırık fiksasyon cihazları, kateterler ve diyaliz tüpleri gibi çok çeşitli tıbbi cihazların temelini oluşturur (95).

Biyomalzeme çevresinde enfeksiyon ve kapsül oluşumu ile ilgili sorunlar, emilemeyen biyomalzemelerin kullanımını dezavantajlı kılmaktadır ve ayrıca,

bozunamayan bir iskelenin kullanılması, malzemenin çıkarılması için ikinci bir ameliyatın gerekliliğine neden olur (94).

Biyobozunur sentetik polimerlerin spesifik avantajlar arasında mekanik özellikleri ve degradasyon kinetiklerini çeşitli uygulamalara uyacak şekilde uyarlama yeteneği bulunur, biyobozunur sentetik polimerler için klinik uygulamalar çok çeşitlidir ve geleneksel olarak emilebilir ipleri, ilaç taşıma sistemlerini ve iğnelerler, çubuklar ve vidalar gibi ortopedik sabitleme cihazlarını içerir (95). Temel olarak, fiziksel özellikleri doğal dokunun iyileşme oranlarını göstermek için kolayca değiştirilebilir, düşük maliyetlidir ve *in vivo* implante edildiğinde bağışıklık komplikasyonları açısından çok az risk taşırlar (94).

2.7.1. Poli (Laktik Asit) (PLA)

Poli (Laktik Asit) (PLA) muazzam klinik kullanıma sahip bir polyesterdir. Hem l- hem de d-izomerlerden oluşan polimerler kristalleşemez, bu PLA *in vivo* bozulma süresini önemli ölçüde azaltır ve iskele bozulmasını uyarlarken önemli bir husustur (94).

PLLA, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Yenilenebilir kaynaklardan elde edilir ve uygun mekanik özelliklere sahiptir, ancak yüksek hidrofobik doğası nedeniyle biyouyumluluğu azalır (16).

Monomer birimlerinin [D (L) -laktik asit ve D, L-laktik asit] farklı konfigürasyonu PLA'nın termo-mekanik özellikleri üzerinde büyük bir etkiye sahiptir yani PLA homopolimerleri izotaktik yapıya sahiptir ve 55-60^{o}C aralığında camsı geçiş sıcaklığı (T_g) ve erime sıcaklığı (T_m) yaklaşık 175°C yarı kristal poliesterlerdir (96).

PLLA ve PDLA'nın yüksek erime sıcaklığı değeri, polimer ürünlerinin termal sterilizasyonu ve eczacılık, ilaç ve gıda endüstrisindeki uygulamaları için büyük önem taşımaktadır. Yarı kristal PLLA iyi mekanik özelliklere sahipken amorf PDLLA daha düşük gerilme mukavemetine ve kopmada daha uzun uzamaya sahiptir (96).

PLLA, iyi biyouyumluluk, iyi biyobozunurluk ve biyomedikal uygulamalarda kullanıma uygun iyi mekanik özellikler gösterir (97). PLLA, daha yüksek bozunma hızına ve yüksek erime noktasına sahipken zayıf mekanik özellikleri vardır (98). Elektroeğrilmiş PLLA fiberlerinin çekme testi sonuçları, daha yüksek alma hızının, işlem boyunca

geliştirilen sıralı yapı nedeniyle daha yüksek gerilme modülü ve mukavemetine neden olduğunu göstermiştir (99).

2.7.2. Poli (Laktik Asit-Ko-Glikolik Asit) (PLGA)

PLGA, PLA ve poliglikolik asitin (PGA) bir kopolimeridir, parçalanabilir ve biyouyumlu bir polimerdir, ilaç salımındaki klinik kullanımı, insanlardaki cerrahi dikiş ipi uygulamaları FDA tarafından onaylanmıştır (100). Mekanik dayanıklılık gösterir ve çok sayıda işleme tipine izin veren çeşitli şekillere uyum sağlayabilir (64). Laktit birimleri büyüdükçe, polimer bozulmadan önce daha uzun süre dayanır (101). Zheng ve ark., bir PLGA ve selüloz nanokristal nanofiber membranın sadece avantajlı hücre-uyumluluğu göstermekle kalmayıp aynı zamanda uyarılmış fibroblast yapışmasını, yayılmasını ve çoğalmasını da göstermiştir (102).

Kumbar ve diğ. daha sonra yüzeyde insan derisi fibroblastları ile tohumlanan PLGA nanofiberler üretmiştir ve elde edilen sonuçlar, hücrelerin kültürde 28 günden sonra çok katmanlı yayılabildiğini, yapışabildiğini ve oluşturduğunu göstermiştir (93).

2.7.3. Poli (ε-Kaprolakton) (PCL)

Birçok çözücüye dirençli, biyouyumlu, biyolojik olarak çözünebilen bir polimer olan PCL, PLGA'ya benzer ve çok işlevli özelliklere izin veren birçok şekil ve formda üretilebilir, FDA tarafından onaylanmıştır, yavaş bozunma ve biyouyumluluk özellikleri vardır (103). Özellikle, PCL fiberleri yaraları tedavi etmek için kullanılır, çünkü lifli yapısı ECM'ninkine benzerdir ve yara eksüdasını yakalayan mükemmel su tutma kapasitelerine sahiptir (23).

Duan ve ark., PCL/Jelatin elektroeğrilmiş membranların tasarlanmış epidermal deri greftleri olarak kullanılmasının uygunluğunu araştırmıştır. Yapılan *in vivo* analizler, PCL/Jelatin membranlarla tedavi edilen grupların, iyileşmenin daha kısa bir sürede gerçekleştiği için gelişmiş bir iyileşme süreci sergilediğini göstermiştir (93).

2.7.4. Poli (Etilen Glikol) (PEG)

PEG, yara örtüleri için tercih edilen bir başka sentetik polimerdir, hidrofilikliğe, esnekliğe ve uyumlu özelliklere sahip benzersiz bir malzemedir (64). Ayrıca, temas tabakasında daha iyi kavrama sağlayan kompozit yara örtüleri için yüzey niteleyici olarak da kullanılabilir. Lee ve ark., PLGA-PEG-PLGA'nın bir tri-blok polimerini üretmişlerdir ve bu polimer daha yüksek bir yara kapanma oranına ek olarak gelişmiş epitelyum göçü ve kolajen birikimini göstermiştir (104). Benzer bir çalışmada, potansiyel bir yara iyileştirici ajan olarak rekombinant insan insülini dağıtmak için kullanılan PLGA nanoparçacıkları ile serpiştirilmiş değişen miktarlarda PEG kullanılmıştır. Araştırmacılar, PEG/PLGA aracı tarafından 6 gün boyunca devam eden insülin iletiminin, hücre çoğalmasının artmasına neden olduğu sonucuna varmışlardır (105). Huang ve ark., diyabetik yara iyileşmesinde rekombinant insan asit fibroblast büyüme faktörünün PEGilasyonunu analiz etmiştir ve sonuç olarak keratinosit spesifik genlerin daha yüksek ekspresyonunu gözlemişlerdir ve yara iyileşme oranı önemli ölçüde artmıştır (106).

2.7.5. Poliüretan (PU)

PU, mükemmel mekanik özelliklere ve iyi biyouyumluluğa sahip büyük bir sentetik elastomer sınıfını temsil eder ve özellikle uzun süreli implantlar için çeşitli tıbbi cihazlar ve implantlar için değerlendirilmiştir (95).

PU, yapıları ve özellik çeşitlilikleri nedeniyle yara pansumanı için en biyouyumlu ve kan uyumlu materyal olarak kabul edilmiştir (107). Ayrıca koruyucu tekstil, doku mühendisliği, yara örtüsü, sensör ve filtre uygulamalarındaki kullanımı için poliüretan çözeltilerinin başarılı şekilde elektroeğrilmesi üzerine bir dizi çalışma rapor edilmiştir (108).

2003 yılında ilk kez Khilet ve ark., deri ikameleri olarak uygulanacak nanofibröz membranları üretmek için PU kullanılmıştır ve sonuçları, PU membranların su buharı iletim hızını kontrol edebildiğini, mükemmel bir oksijen geçirgenliği gösterdiğini ve sıvı süzme kabiliyeti sunduğunu ortaya koymuştur (93).

PU, iyi bariyer özellikleri ve oksijen geçirgenliği nedeniyle yara örtülerinde düzenli olarak kullanılır ve birçok araştırmacı ayrıca PU'dan yapılmış yarı geçirgen yara örtülerinin yara iyileşmesini desteklediğini bildirmiştir (62).

Antibakteriyel bir bileşen olarak gümüş nanoparçacıklar veya iyonlar, PU nanofiber membranlara birleştirilerek veya yüzeyler üzerine kaplanarak yara örtüleri gibi çeşitli biyomedikal malzemelerin hazırlanmasında uygulanmıştır (107).

2.8. DERİ DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Liyofilizasyon, elektroeğirme, katı serbest formlu imalatlar, fotolitografi dahil olmak üzere çeşitli üretim teknolojilerinde çok sayıda sentetik ve doğal biyomalzemeler kullanılmıştır (40).

2.8.1. Elektroeğirme Yöntemi ile Deri İkamesi Üretimi

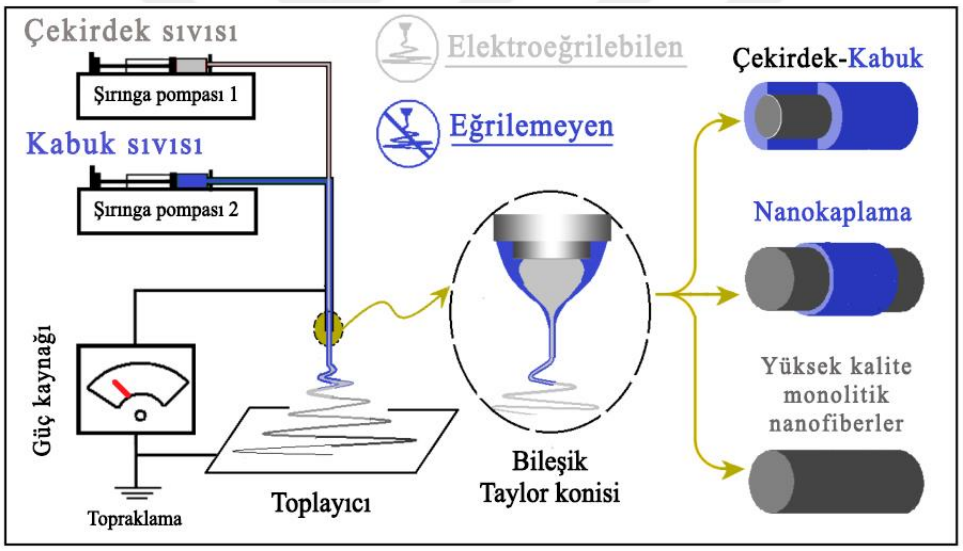
Elektroeğirme, son yıllarda, yalnızca çok çeşitli polimerik fiberlerin eğrilmesindeki çok yönlülüğü nedeniyle değil, aynı zamanda mikro ve nano düzeyde fiber üretme konusundaki tutarlılığı nedeniyle de büyük ilgi görmüştür (109).

Elektroeğirme, bir jet üretmek için bir sıvı damlacıklarının elektriklendirildiği bir elektrohidrodinamik işlemidir, ardından fiber(ler) üretmek için gerilmeyi ve uzamayı içerir (110). Elektroeğirme için kullanılan aparatlar, pozitif veya negatif polariteye sahip yüksek voltajlı bir elektrik kaynağından, çözeltiyi şırıngadan veya pipetten kolektöre götürmek için kapilerli veya tüplü bir şırınga pompasından ve alüminyum gibi iletken bir kolektörden oluşur, yapımı oldukça basittir. Elektroeğirme işleminin bir şeması, Şekil 4'de gösterilmiştir (109).

Jet daha ince çaplara gerildiğinde, hızlıca katılaşır ve topraklanmış kolektörde katı fiberlerin birikmesine yol açar. Genel olarak, elektroeğirme işlemi arka arkaya gelen dört aşamaya ayrılabilir: i)sıvı damlacıklarının doldurulması ve Taylor konisinin veya koni şeklindeki jetin oluşturulması, ii)yüklü jetin düz bir çizgi boyunca uzatılması, iii)bir elektrik alanı varlığında jetin incelmesi ve elektriksel bükülme dengesizliğinin büyümesi ve iv)topraklanmış bir kolektörde jetin katı fiberler olarak katılaştırılması ve toplanması (111, 112). Elektroeğirme işlemindeki son adım, fiberlerin topraklanmış bir toplayıcı üzerine birikmesidir ve biriktirmeden sonra, lifler üzerindeki yüklerin çoğu hızlı bir şekilde topraklanmış toplayıcıdan dağıtılır (113).

Elektrik alanını oluşturmak için genellikle iğne ucuna statik DC yüksek voltaj uygulanır ve bazı malzemeler, özellikle elektrolitler için, elektroeğirme kapasiteleri uygulanan voltajın polaritesine bağlıdır (114). Uygulanan voltaj, jet tarafından taşınan yük miktarını ve yükler arasındaki elektrostatik itme büyüklüğünü ayrıca jet ve harici elektrik alanı arasındaki etkileşimlerin gücünü doğrudan belirler (110).

Karışım elektroeğirmesinin çok yönlülüğüne rağmen, bu metodoloji ile üretilen fiberlerin önemli bir dezavantajı, sistemin terapötik etkinliğini tehlikeye atan, dahil edilen biyomoleküllerin işlev ve aktivitesinin kaybıdır ve bu eksikliğin üstesinden gelmek için, çekirdek-kabuk fiberleri koaksiyal ve emülsiyon elektroeğirmesiyle üretilmiştir (93). Bu tür mikro/nano-fiberler, biyolojik ajanların biyolojik aktivitelerini sürdürmeleri için temel olan biyomoleküllerin dış çevre ile doğrudan temasını önler.



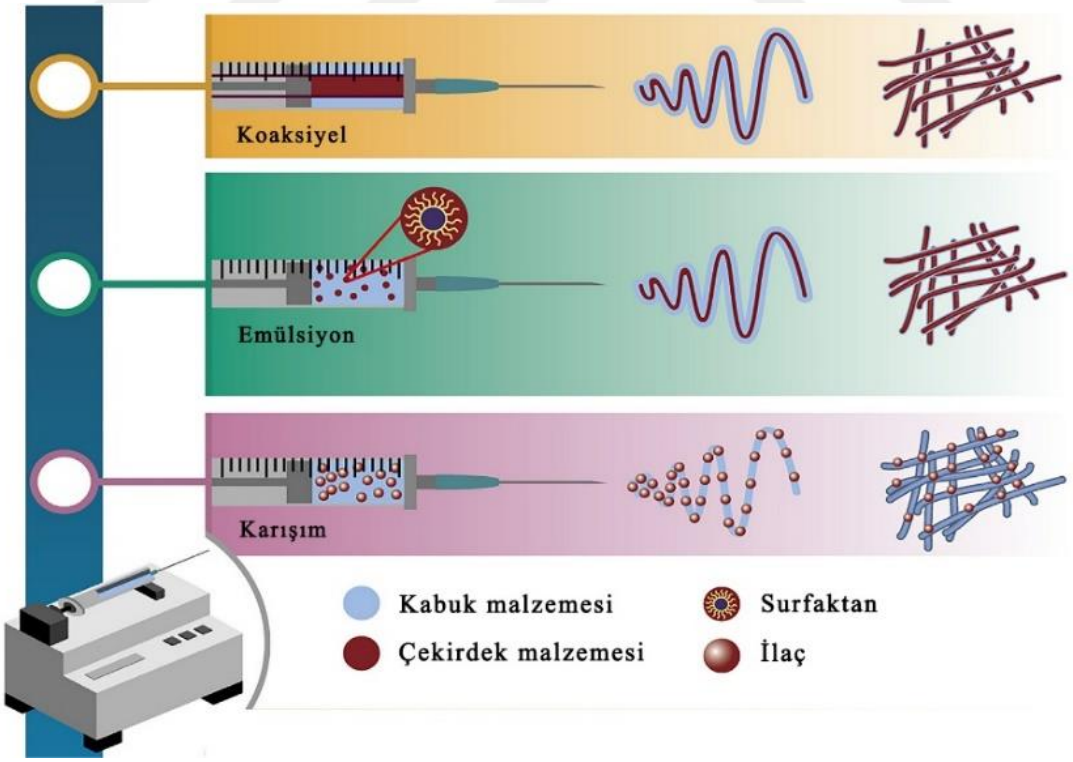
Şekil 2.3: Genel bir koaksiyel elektroeğirme prosesinin şematik gösterimi (115)

Elektroeğirme, bir koaksiyel aparatı kullanıldığında koaksiyel ve içi boş fiber üretebilir (Şekil 2.3). Koaksiyel aparat, koaksiyel fiberleri üretmek için karıştırılmadan kabuk ile çevrelenen, bir çekirdek olarak aynı anda iki polimerik çözeltinin eğrilmesine izin verir (116). Bu teknik, daha az eğrilebilir polimerlerin (örn., Sınırlı çözünürlük, düşük molekül ağırlıklı ve kompakt moleküler konformasyona sahip polimer), destek kabuğu olarak kolayca eğrilebilen bir polimer kullanarak fiberler oluşturmasına izin verir (53).

Koaksiyel elektroeğirme sırasında, oluşmuş nano fiberlerin çekirdeği içindeki ikincil bir sıvı tabakasını (değişken ilaçlar, antibiyotikler, proteinler, DNA ve büyüme

faktörleri) yakalamak için özelleştirilmiş bir şırınga kullanılır (117). Bu teknik, daha az eğrilebilir polimerlerin (örn., düşük çözünürlük, düşük molekül ağırlıklı ve kompakt moleküler konformasyona sahip polimer), destek kabuğu olarak kolayca eğrilebilen bir polimer kullanarak fiberler oluşturmasına izin verir (53). Bu nedenle, ko-elektroeğirme düzenekleri, tek bir şırınga ve pompa içeren tekli elektroeğirme düzeneklerine göre daha karmaşıktır (118).

Koaksiyel elektroeğirmenin jet stabilitesi ve fiber morfolojisi sadece işleme, çözücü ve çevresel parametrelerden değil, aynı zamanda çözücü karışabilirliğinden de etkilenir (53). Yaşam biliminde, koaksiyel elektroeğirme (Şekil 2.4), doku mühendisliği uygulamaları için fiber iskeleler üretmek için sırasıyla polimerin mükemmel mekanik mukavemeti ve biyolojik aktivitesinden faydalanarak, çekirdek olarak sentetik polimer ve kabuk olarak doğal polimer ile koaksiyel fiber üretmek için kullanılmıştır (119). Ayrıca, koaksiyal fiberler biyoaktif moleküllerin kontrollü salınımı için test edilmiştir (120). Çekirdeğe ve kabuğa sırasıyla farklı moleküller yüklenebilir, bu da moleküllerin farklı zaman aralıklarında kontrollü salınımına izin verir (53).



Şekil 2.4: Çeşitli elektroeğirme yöntemleri (93)

Elektroeğrilmiş fiberlerin özellikleri, çözelti bileşimi, polimer çözelti besleme hızı, uygulanan voltaj ve damla yüksekliği gibi birçok farklı parametre ile belirlenir ve bu parametrelerin optimizasyonu, istenen uzunluk ve çapta daha uzun sürekli fiberlerin üretilmesine yol açabilir (124). Tablo 2.3'te elektroeğirme parametreleri verilmiştir.

Tablo 2.3: Elektroeğirme süreç parametreleri (121–123)

Parametreler	**Fiber Morfolojisi Üzerine Etkisi**
Viskozite	Düşük boncuk üretimi, fiber çapında yüksek artış, boncukların kaybolması.
Polimer Konsantrasyonu	Konsantrasyon artışı ile lif çapındaki artış.
Polimerin Moleküler Ağırlığı	Molekül ağırlığının artmasıyla boncuk ve damlacık sayısında azalma.
Kondüktivite	İletkenlik artışı ile fiber çapında azalma.
Yüzey Gerilimi	Fiber morfolojisi ile kesin bir bağlantı yoktur, yüksek yüzey gerilimi jetlerin kararsızlığına neden olur.
Uygulanan Voltaj	Gerilim artışı ile fiber çapında azalma.
İğne Ucu ve Toplayıcı Arasındaki Uzaklık	Çok küçük ve çok büyük mesafeli boncukların üretimi, düzgün lifler için gereken minimum mesafe.
Akış Hızı	Akış hızında azalma ile fiber çapında azalma, çok yüksek akış hızında boncuk oluşumu.
Nem	Yüksek nem fiberler üzerinde dairesel gözenekler oluşturur.
Sıcaklık	Sıcaklıktaki artış fiber çapının azalmasına neden olur.

Elektroeğirme sisteminin yetersiz optimizasyonu, fiber oluşumunun azalmasına ve damlacıkların veya boncukların, devam etmeyen fiberlerin ve düzensiz çaplı fiberlerin oluşumuna neden olabilir ve bu yüzden fiber çapı, uç ve toplayıcı arasındaki mesafe, çözelti akış hızı ve uygulanan voltaj gibi işleme parametreleri ayarlanarak düzenlenebilir (53). Ayrıca, viskozite, yüzey gerilimi, iletkenlik ve polimer molekül ağırlığı gibi çözelti parametrelerindeki değişiklikler ve sıcaklık, nem ve hava hızı gibi çevresel parametreler

de üretilen fiberlerin morfolojisini ve çapını etkileyecektir (53, 121). Tablo 2.4'te çeşitli malzemeler ve eğirme yöntemleri ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır.

Tablo 2.4: Elektroeğirme yöntemi ile yapılmış uygulamalar

Kullanılan Malzemeler	**Üretim Yöntemi**	**Amaç**	**Sonuçlar**
PLA/PCL-Tetrasiklin (125)	Karışım Elektroeğirme	*Staphylococcus aureus* bakterisinin bulunduğu yaralar	Bu aktif yara örtülerinin sürekli ve uygun ilaç salım hızı, yeterli su alımı ve su geçirgenliği ve antibakteriyel aktiviteler açısından performansı, ticari yara örtüsü (Comfeel Plus) ile karşılaştırıldı. Sonuçlar, PLA/PCL karışımlarından yapılan pansumanların ticari yara pansuman örneğine kıyasla daha iyi performans gösterdiğini göstermektedir.
PLA-Mupirosin (126)	Karışım Elektroeğirme	*Staphylococcus aureus* bakterisinin bulunduğu yaralar	Veriler, matristeki ilaçların hücre proliferasyonunu inhibe etmediğini ve pansumanın profilaktik etki ve ağrının giderilmesinin yanı sıra iyileşmeyi destekleyebildiğini göstermektedir.
PLA/Kolajen-Gentamisin (127)	Çekirdek /kabuk	*Escherichia coli, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin bulunduğu yaralar	Sonuçlar, bu tür ilaç yüklü liflerin güçlü ve zamanla kontrol edilebilen antibakteriyel özelliklere sahip gelişmiş iletim platformları olarak kullanılabileceğini göstermiştir.
PLLACL-Tetrasiklin Hidroklorid (128)	Çekirdek /kabuk	*Escherichia coli* bakterisinin bulunduğu yaralar	Bu nanofiberlerin antibakteriyel özellikleri, *Escherichia coli* büyümesini önleyici testlerle tespit edilmiştir. Sonuçlar, koaksiyel-elektroeğirme ile hazırlanan nanofiberlerin istenen ve kontrol edilebilir Tetrasiklin Hidroklorid kapsülleme/bırakma profiline sahip olduğunu göstermiştir.

Tablo 2.4: (devam)

Polimetil metakrilat/naylon 6-Ampisillin (129)	Koaksiyel Elektroeğirme	*Listeria innocua* bakterisinin bulunduğu yaralar	Sistemin antibakteriyel aktivitesi Gram-pozitif *L. innocua*'ya karşı optik yoğunluk (OD) ölçümleri ile doğrulanmıştır.
PAA/PCL-Kuaternize Kitosan (130)	Çekirdek/Kabuk	*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* bakterisinin bulunduğu yaralar	Antibakteriyel nanofibröz materyallerin hazırlanması için umut verici bir stratejidir.
PLA-Kitosan (131)	Koaksiyel Elektroeğirme	*Escherichia coli* bakterisinin bulunduğu yaralar	PLA/Kitosan çekirdek / kabuk kompozit nanofiberleri, *Escherichia coli*'ye karşı antibakteriyel aktivite gösterdi; bu nedenle biyomedikal ve filtrasyon alanları gibi alanlarda antibakteriyel malzeme olarak kullanılabilir.
PLLA-Lidokain, mupirosin (126)	Koaksiyel	Ağrı yönetimi ve antibakteriyel özellik gerektiren yaralar	İlk saat içinde lidokainin bir patlama salımı (PBS içinde %80 salımı) gözlenirken, mupirosin ilk bir saat içinde sadece %5'lik bir salım gösterdi. Bu sonuçlardan, aynı polimerde iki tip ilacın varlığı, en az bir ilacın salım kinetiğini değiştirebilir.
HA/kolajen/jelatin-vasküler endotelyal büyüme faktörü (132)	Çift kaynaklı çift güç elektroeğirme	Anjiyogenez sağlanması gereken yaralar	Birden fazla anjiyojenik faktörün aşamalı salım modeline sahip elektroeğrilmiş Kol-HA-Jelatin kompozit nanofibröz deri ikamesi, deri dokusu rejenerasyonunda kronik yara iyileşmesi için umut verici bir biyomühendislik yapı olabilir.

Tablo 2.4: (devam)

Kolajen (133)	Emülsiyon Elektroeğirmesi	Diyabetik yaralar	Azalmış yara kasılması göstermiştir.
PCL- Gentamisin (134)	Koaksiyel	İlaç kapsülleme	Herhangi bir lif oluşturucu katkı maddesi içermeyen ilaç çözeltilerinin PCL ultra ince lifleri içinde kapsüllenebildiği bulunmuştur.
PLLCL/Epidermal indüksiyon faktörleri (135)	Karışım ve Koaksiyel	Büyüme faktörleri kapsülleme	Bu çalışma, epidermal indüksiyon faktörleri kapsüllenmiş çekirdek-kabuk nanofiberlerinin deri yenilenmesi için umut verici bir doku mühendisliği grefti olarak işlev görebileceğini göstermiştir.
Kolajen (136)	Karışım Elektroeğirmesi	Erken evre yara iyileşmesi	Elektroeğrilmiş kolajen nanofibröz membranlar üretilmiştir ve yara örtüsü olarak kullanılması amaçlanmıştır.
Gelatin/PLLA (137)	Karışım Elektroeğirmesi	Yara örtüsü	Elektroeğrilmiş jelatin/PLLA membranları kontrollü su kaybı, sıvı drenaj kabiliyeti ve mükemmel bir biyouyumluluk sergilemiştir.

Tablo 2.4: (devam)

PCL/kolajen (138)	Koaksiyel Elektroeğirmesi	Yüzey biyouyumluluğu karakterizasyonu	Çekirdek-kabuk kompozit nanofiberler hücre-iskele etkileşimlerini geliştirmiştir.
PLGA/ kolajen (56)	Karışım Elektroeğirmesi	Erken evre yara iyileşmesi	PLGA/kolajen nanofiber ağlar, yara iyileşme sürecini erken bir aşamada iyileştirmiştir.
Kolajen/Zein (139)	Karışım Elektroeğirmesi	Yara iyileşmesi	Zein, karışım ve fiber gerilme mukavemetinin elektroeğirme yeteneğini geliştirirken, kolajen hücre yapışmasını arttırmıştır.
Kolajen (57)	Karışım Elektroeğirmesi	Deri yara örtüsü	Bu kültürlenmiş deri ikamelerinin *in vivo* aşılanması, elektroeğrilmiş kolajen nanofiberlerin daha yüksek alma hızına ve daha düşük yara kasılmasına sahip olduğunu göstermiştir.
PLLA – kolajen (60)	PLLA dokuma örgünün bir tarafında huni benzeri kolajen süngerleri	Tam kalınlıkta deri kusurlarının yara iyileşmesi	Dermal doku ve epidermisin yenilenmesini desteklediğini ve yeni doku oluşumu sırasında kasılmanın azaldığını göstermiştir.
PLLA – jelatin (60)	PLLA dokuma örgünün bir tarafında huni benzeri sulu jelatin çözeltisi	Tam kalınlıkta deri kusurlarının yara iyileşmesi	Dermal doku ve epidermisin yenilenmesini desteklediğini ve yeni doku oluşumu sırasında kasılmanın azaldığını göstermiştir.
PLLA-Gallik asit (140)	Karışım Elektroeğirmesi	Salım sürelerinin farklı ortamlarda incelenmesi	Gallik asit içeren elektroeğrilmiş PLLA liflerinden üç tip ortama (yani asetat tamponu, sitrat-fosfat tamponu ve normal salin) salım özelliklerini incelemişlerdir. Bu fiber matlarından salınan toplam gallik asit miktarı, normal salin içinde en yüksek çıkmıştır.

Tablo 2.4: (devam)

Kolajen, elastin ve PCL (47)	Karışım Elektroeğirmesi	Hücresel etkileşimini destelemek, esnekliğini ve mekanik mukavemetini arttırmak için kullanılmasının *in vitro* ve *in vivo* faydalarını araştırmak	Elastin'in dahil edilmesinin, iskelenin sertliğini azalttığı, aynı zamanda esnekliği arttırdığı ortaya çıkmıştır. Elektroeğrilmiş kolajen-elastin-PCL iskelelerinin, ciddi yanık yaralanmasından sonra deri hücresi büyümesini ve doku rejenerasyonunu teşvik etmek için potansiyel olarak bir deri yerine kullanılabileceğini göstermektedir.
PLLA (141)	Karışım Elektroeğirmesi	Fibröz malzeme morfolojisinin endotel hücrelerinin mat içine göçü üzerindeki etkisini incelemek	Hizalanmış nanofiberlerin endotel hücrelerinin iskelelere sızmasını teşvik ettiğini bulmuşlardır.
Polietilen oksit/Kitosan (142)	Koaksiyel Elektroeğirme	Araştırma	Bu nanofiberler, hemodiyalizde ve yara pansumanlarında kanın saflaştırılması gibi biyomedikal alanda ilginç potansiyel uygulamalara sahiptir.
PCL/PEG (143)	Koaksiyel Elektroeğirme	Diyabetik Ülser Tedavisi	Nanofibröz matris, yara oluşumunu azaltırken yara iyileşme oranlarını artırabilecek umut verici bir yara örtü malzemesi olarak görülmüştür.
P(LLA-CL) ve jelatin/epidermal indüksiyon faktörleri (135, 144)	Koaksiyel Elektroeğirme	Deri Rejenerasyonu	Çekirdek/kabuk yapısı sayesinde epidermal indüksiyon faktörlerinin salımı 15 günden fazla sürmüştür.
PCL–Gümüş/Polivinil Alkol (145)	Koaksiyel Elektroeğirme	*Staphylococcus aureus, Escherichia coli* bakterisinin bulunduğu yaralar	Çekirdek-kabuk fiberleri gümüşün patlama salınımını azaltmıştır ve *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerinin büyümesini başarılı bir şekilde engellemiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

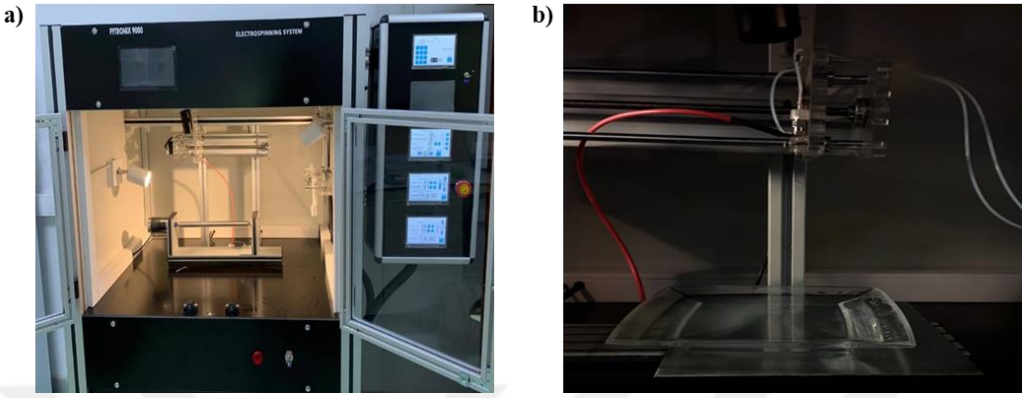
3.1. MALZEMELER

PLLA polimeri (ortalama Mn 40,000, Sigma, ABD) ve sıçan kuyruğu tip I kolajen Sigma, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya'dan temin edilmiştir. Çözücü olarak, asetik asit (saflık oranı ≥%99, Isolab GmbH, Almanya) ve 1,1,1,3,3,3-hekzafluoro-2-propanol (HFIP, saflık oranı ≥%99, Sigma, ABD) kullanılmıştır. TegaDermTM (1624W, 3M Health Care, Almanya) oksijen geçirgenliğinde kullanılmıştır. Trisodyum sitrat dihidrat ($HOC(COONa)(CH_2COONa)_2 \bullet 2H_2O$, Isolab GmbH, Almanya), Altın(III) klorid trihidrat ($HAuCl_4 \bullet 3H_2O$, ACS reagent, saflık oranı ≥49.0% Au basis, Sigma, ABD) olarak temin edilmiştir. NIH/3T3 fibroblast hücreleri (NIH/3T3, ATCC® CRL-1658™, ABD), insan epidermal büyüme faktörü (hEGF, Genscript, Singapur), Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri hücre kültür ortamı (DMEM, Gibco, Almanya), fetal sığır serumu (FBS, Gibco, Almanya), gluteraldehit çözeltisi (Biobasic, Kanada), PrestoBlue çözeltisi (Thermo Fisher Scientific, ABD) hücre çalışmalarında kullanılmıştır. Hücre çalışmaları sonrası floresan boyama için 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Abcam Almanya), FITC-Phalloidin (Sigma, ABD) tercih edilmiştir. Bakteri çalışmalarında Mueller-Hinton Agar (Sigma, ABD), Nutrient Broth (No 3, Sigma, ABD), *Staphylococcus aureus (*ATCC® 33591™, ABD), *Escherichia coli* (ATCC® BAA-2471™, ABD).

3.2. ELEKTROEĞİRME DÜZENEĞİ

Elektroeğirme yöntemi, yukarıda bahsedildiği gibi polimer esaslı mikro ve nano-liflerin üretimi için en etkin yöntemlerden biridir. Çekirdek-kabuk yapıda fiberler oluşturmak için, koaksiyel (iç-içe geçmiş) akış sağlayan ve iç çapı 22g ve dış çapı 17g olan iğnenin pozitif uç olarak kullanıldığı bir elektroeğirme cihazı (Fytronix 9000, Türkiye) kullanılmıştır. Cihaz kontrollü akımı sağlayabileceği iki şırınga kapasitesine sahip olduğundan koaksiyel elektroeğirme yapılabilmektedir. Cihaz 30 kV ye kadar gerilim uygulayabilmektedir. Bu çalışmada soğuk etanol (%70) üzerine koaksiyel elektroeğirme yapıldığından döner toplayıcı hedef kullanılmamıştır. Metal plaka üzerine

alkol bulunan kap yerleştirilmiştir. Resim 3.1, bu tez çalışmasında kullanılan Elektroeğirme cihazını ve koaksiyel düzeneği göstermektedir.



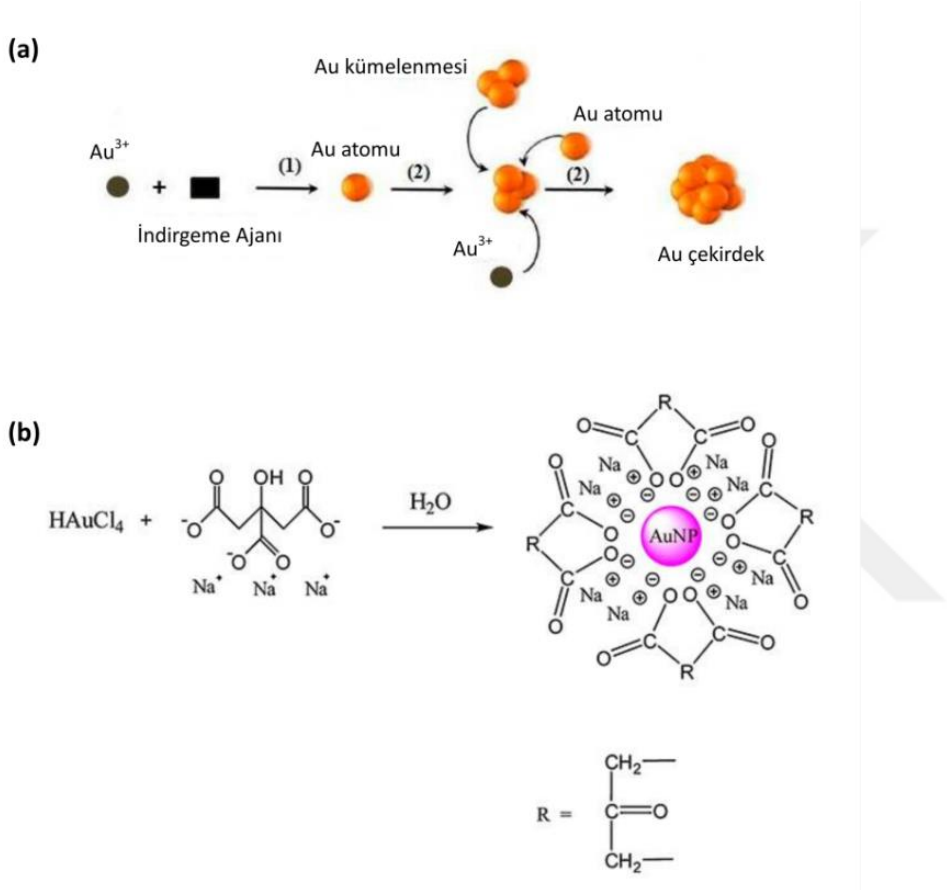
Resim 3.1: Elektroeğirme cihazı (a), koaksiyel elektroeğirme düzeneği (b)

Elektroeğirme sisteminde, voltaj, çözeltinin pompalanma hızı (akış hızı), iğne ile hedef arasındaki mesafe değiştirilerek farklı fiber morfolojileri ve fiber çapları oluşturulmaya çalışılmıştır. Ortam sıcaklığı ve havadaki nem endeksi, oda koşullarında ortalama 25°C ve %50 olarak raporlanmıştır.

3.3. ALTIN NANO PARÇACIK SENTEZİ

Farklı boyutlarda altın nano parçacıkları sitrat indirgeme yöntemi olarak da bilinen Turkevich yöntemi kullanarak sentezlenmiştir. Kısaca, deneysel adımlar şu şekildedir. Altın (III) klorid trihidrat ($HAuCl_4.3H_2O$) ile 10 mM stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltisi, distile su ile seyreltilerek 1 mM solüsyon elde edilmiştir. Bu çözeltiden, 20 ml bir Erlenmeyer şişesine alınmış ve bir ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda yüksek hızda (800 rpm) karıştırılarak kaynatılmıştır. Kaynama noktasında, önceden hazırlanmış %1 trisodyum sitrat dihidrat ($Na_2C_6H_5O_7.2H_2O$) çözeltisi, agregat oluşumunu önlemek için yavaş yavaş farklı hacimlerde (1-4 ml) eklenmiştir. AuNP'lerin farklı boyutları (küresel varsayıldığında partikül çapları), altın tuzunun ($HAuCl_4.3H_2O$) indirgeme maddesine ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) hacimsel oranın değişmesi ile elde edilir. Soluk mavi (çekirdeklenme) ile derin kırmızı arasında solüsyonun renginde değişiklik, altının (III) indirgenip altın nanoparçacıkların oluştuğunun bir göstergesidir.

AuNP sentezinde, parçacıkların boyutu sitrat/Au (III) molar oranının değiştirilmesiyle ayarlanabilir. Yüksek oran değerlerinde çekirdeklenme daha hızlı, baskın ve daha küçük nanoparçacıkların oluşumuna yol açarken, 150 nm'ye kadar daha büyük parçacıklar daha düşük oranlarda elde edilebilir. Altın tuzunun sitrat ile indirgenmesine dayanan tek fazlı sulu yöntem Resim 3.2'de şema olarak ifade edilmiştir.



Resim 3.2: Altın nanoparçacık sentezi: (a) Altın nanoparçacıkların kimyasal indirgeme yöntemiyle sentezlenmesi için çekirdeklenme işlemi; (b) Turkevich yöntemi ile elde edilen sitrat-stabilize parçacıkların şematik gösterimi (146)

3.4. ÇÖZELTİ HAZIRLANMASI VE OLUŞTURULAN DENEY GRUPLARI

PLLA/Kol-I'de oluşturulan ve çekirdek/kabuk yapıdaki fiberlerin çeşitli elektroeğirme parametrelerinde değişimleri gözlenmiştir. Bunun için uygulanan voltaj, kolektör ile iğne arasındaki mesafe, akış hızı ve konsantrasyon parametrelerinde değişiklikler ile üretim gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki tabloda optimizasyon için üzerinde

değişiklik yapılan parametreler ve bu parametreler ile oluşturulan deney grupları bulunmaktadır.

Çözelti oluşturulmasında, PLLA polimeri, öncelikle ağırlık/hacim oranı %15 (w/v) olacak şekilde HFIP içerisinde çözülmüştür (147). Bunun için, 0,75 g PLLA tartılmıştır ve 5 ml HFIP içinde cam şişede 800 rpm de oda sıcaklığında 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Aynı şekilde kolajen solüsyonun hazırlanması için, ağırlık/hacim oranı %15 (w/v) olacak şekilde %1'lik asetik asit içerisinde çözülmüştür. Bunun için, 0,2 g kolajen tartılmıştır ve 5 ml %1'lik asetik asit içinde cam şişede 800rpm de oda sıcaklığında 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Elde edilen çözeltiler ile çekirdek/kabuk yapısında fiber elde etmek üzere oluşturulan deney grupları ve elektroeğirmede kullanılan parametreler Tablo 3.1'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1: Elektroeğirmede çalışılan deney grupları ve isimlendirmesi

Sıra No	Örnek İsmi	Konsantrasyonlar (ağırlık/hacim %)	Uygulanan voltaj (kv)	Hedef-İğne Mesafesi (cm)	Akış hızı (ml/saat)
1	0.5F25Ö15K1	%4 kolajen ve %15 PLLA	25	15	0,5
2	0.5F20Ö15K1	%4 kolajen ve %15 PLLA	20	15	0,5
3	0.5F15Ö15K1	%4 kolajen ve %15 PLLA	15	15	0,5
4	0.5F25Ö10K1	%4 kolajen ve %15 PLLA	25	10	0,5
5	0.5F25Ö20K1	%4 kolajen ve %15 PLLA	25	20	0,5
6	0.2F25Ö15K1	%4 kolajen ve %15 PLLA	25	15	0,2
7	0.7F25Ö15K1	%4 kolajen ve %15 PLLA	25	15	0,7
8	1F25Ö15K1	%4 kolajen ve %15 PLLA	25	15	1
9	0.5F25Ö15K2	%2 kolajen ve %15 PLLA	25	15	0,5
10	0.5F25Ö15K3	%6 kolajen ve %15 PLLA	25	15	0,5

Koaksiyel elektroeğirme, "Taylor" konisinin morfolojik stabilitesi ile yakından ilişkili olan çekirdek kabuk mikro/nano-fiberlerini üretmek için etkili bir yöntemdir. Bununla birlikte, nozül yapısı "Taylor" konisinin oluşumunu etkiler. Koaksiyel elektroeğirme sırasında, kabuk çözeltisi ve çekirdek çözeltisi önce koaksiyel nozülün ucunda koaksiyel "Taylor" konisi oluşturur ve daha sonra elektrik kuvveti altında

çekirdek-kabuk jeti meydana gelir (148). Bu nedenle stabil bir "Taylor" konisi oluşumu, iğne ile hedef arasında ağaç dalı şeklinde polimer birikiminin oluşmaması takip edilmiştir.

Fiber yapıların oluşturulmasında kullanılacak çözeltiler içerisine üretilen altın nanoparçacıkların veya EGF'nin eklenmesi tercih edilmemiştir. Burada bu bileşenlerin hem elektroeğirme sürecine olan etkileri hem de EGF içeren örneklerin uzun süreli bekletilmemesi (taze kullanılması) için *in vitro* testler öncesi EGF'nin çekirdek kısımda kolajen ile birlikte elektroeğrilmesinin tercih edilmesi sebebiyle optimizasyon parametrelerinin denenmesi sırasında çözelti içerisine eklenmemiştir.

Üretim sonrasında altın nanoparçacıkların fiziksel adsorpsiyonla fiber yapıya eklenmesi tercih edilmiştir. Bunun için etil alkol içeren bir banyoda toplanan PLLA/Kol-I fiber mat numuneler, altın nanoparçacıkların üretilmiş olduğu yoğun çözelti içerisinde 24 saat boyunca bekletildikten sonra, fiber yapının mor renk almasını takiben numuneler distile suyla yıkanıp, laminar akış altında gece boyunca kurutularak PLLA/Kol-I+AuNP örnek grubu oluşturulmuştur. *In vitro* testler öncesinde ise EGF ve 10 mM asetik asit ile 1 mg/ml olacak şekilde stok çözelti hazırlanmıştır. Düşük pH değerinde uzun süre tutulmaması için EGF, 500 $\mu g \bullet mL^{-1}$ son konsantrasyon değerinde olacak şekilde stok çözeltisinden kolajen karışımına eklenmiştir ve çekirdek kısmında elektroeğrilmiştir, böylelikle PLLA/Kol-I+AuNP+EGF deney grubu oluşturulmuştur.

3.5. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOPİSİ (SEM)

Elektroeğirme süreci boyunca denenen parametrelerin arasında en iyi fiber yapısının elde edilmesine izin veren üretim parametrelerinin tespit edilmesi için SEM (Zeiss EVO® LS 10, Almanya) ile yüzey karakterizasyon ve fiber morfolojisinin belirlenmesi sağlanmıştır. Bunun için, elektroeğirme işlemi sonunda folyo hedeften ayrılmış ve fiber mat, elektrik iletkenliği sağlanabilmesi amacıyla püskürtmeli kaplama (sputter) yöntemi ile altın/paladyum (Au/Pd) kaplanarak 12kV hızlandırma voltajında incelenmiştir.

Enerji dağılımı X-ışını spektroskopisi (EDS), SEM ve geçirimli elektron mikroskopları (TEM) için çok farklı uygulamalarda kullanılmak üzere üretilmiş, malzemenin farklı bölgelerinde elemental analiz, çizgi analizi, faz tespiti ve haritalaması,

renkli kompozisyon görüntülemesi gibi tekniklere olanak sağlayan bir yöntemdir. Üretilen fiberlerdeki altın nanoparçacıkların miktarının saptanmasında ve yüzeyde parçacık dağılımının haritalamasında kullanılmıştır. AuNP salımının belirlenmesi için EDS taraması yapılan örnekler, *in vitro* çalışmalardaki sterilizasyon prosedürü ile uygun şekilde eş koşullarda hazırlanmıştır ve örneklerin kendi Au içeriklerinin değiştirmemesi için ayrıca bir Au/Pd veya Au kaplama uygulanmamıştır.

3.6. FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR)

FTIR analizleri zayıflatılmış toplam yansıma (attenuated total reflection, ATR) tekniği yapılarak yara örtüsünde kullanılan polimerlerin transmisyon bandlarındaki değişiklikler incelenmiştir. Yapısında PLLA ve kolajen bulunan numunelerde kimyasal bağlara ait kızılötesi spektrum bantları ve polimerik fiberlere ait bantlar, FTIR (Spectrum 100, Perkin-Elmer Inc., Norwalk, CT, ABD) ile incelenmiştir. Kullanılan cihaz üzerinde entegre ATR ünitesi bulunmaktadır. ATR modunda, saf ve kompozit fiberlerin kızılötesi spektrumları 650-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında kaydedilmiştir.

3.7. YARA ÖRTÜLERİNİN PBS İÇERİSİNDEKİ ŞİŞME DAVRANIŞININ BELİRLENMESİ

Fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi bir tampon çözeltidir. Laboratuvar ortamında insan vücut sıvılarının iyon konsantrasyonunu, ozmolarite ve pH açısından benzer ortam oluşturulması açısından oldukça değerlidir. 1 litre 1×PBS hazırlamak için, sırasıyla şu adımlar izlenmiştir: 1) 800 ml damıtılmış su, 1 litrelik bir behere koyulmuştur ve manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. 2) 8 g NaCl eklenmiştir. 3) 0,2 g KCI eklenmiştir. 4) 1,44 g Na_2HPO_4 eklenmiştir. 5) 0,24 g KH_2PO_4 eklenmiştir. 6) HCl ile çözeltinin pH'si 7,4 olacak ayarlanmıştır. 7) Toplam hacim 1 litreye tamamlanacak şekilde çözeltiye distile su eklenmiştir.

Üretilen deri ikamelerinin şişme davranışı, dairesel numunelerde gravimetrik yöntemle belirlenmiştir. Her numune, farklı zaman aralıkları için bir fanlı fırın içerisinde 37°C'de sabit tutulan PBS (pH = 7,4) içerisine daldırılmıştır (149). Her zaman noktasında, numunelerin üzerinden fazla tampon çözeltisi bir filtre kağıdıyla alındıktan

sonra hassas terazide (Axis, Gdańsk, Polonya) ağırlıkları ölçülmüştür. Şişme derecesi (%) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\text{Şişme}(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \qquad \text{(Eş. 3.1)}$$

burada W_s numunenin PBS'ye daldırıldıktan sonra şişmiş (swollen) haldeki ağırlığını ve W_d ise kuru haldeki numunenin ağırlığını belirtir (149).

3.8. OKSİJEN GEÇİRGENLİK TESTİ

Numunelerin oksijen geçirgenliği Winkler yöntemi kullanılarak belirlenmiştir ve sonuçlar çözünmüş oksijen miktarı (mg / L) olarak ifade edilmiştir (150). Örnek grupları olarak PLLA/Kol-I ve PLLA/Kol-I+AuNP, karşılaştırma ürünü olarak poliüretandan üretilmiş TegaDerm™ (1624W, 3M Health Care, Almanya) transparan film tercih edilmiştir. Örneklerin her biri 1 cm çapında kesilmiştir. Her biri eşit olacak şekilde şişelerin kapakları da 1 cm çapında oyulmuştur. Numuneler kapaklardaki boşluklara sabitlenmiştir ve (numuneye temas etmeyecek şekilde) kapakların etrafı hava geçirmeyecek şekilde sıkıca parafilm ile sarılmıştır. Tüm şişelerin içerisine 100 ml olacak şekilde kaynatılmış ve oksijenden arındırılmış distile su konulmuştur. 1., 3., 5. ve 7. günde oksijen ölçümleri yapılmıştır. Bu testte hava (oksijen) geçirmez şişe ve ağzı tamamen açık şişe kontrol grupları olarak kullanılmıştır.

3.9. NEM GEÇİRGENLİK TESTİ

Nem (su buharı) geçirgenlik testleri, ASTM E 96-80 (Desiccant Method) standardına uygun olarak yapılmıştır (149). Doymuş magnezyum klorür hava almayan büyük bir dış kaptaki nemi %55±5 değerinde sabit tutmak için kullanılmıştır. Ortamdaki nemin sabitliği dış kabın içerisinde bulunan nem ölçer ile takip edilmiştir. Numunelerin yerleştirildiği buharlaştırma kaplarının (plastik test şişeleri) kapağına ise 1 cm çapında delikler açılmıştır. Test şişeleri 20 g damıtılmış su ile doldurulmuştur. PLLA/Kol-I numunesi kenarlarından yapıştırıcı kullanılarak kapağa tutturulmuştur. Numuneler ve buharlaştırma kapları hassas terazi kullanılarak tartılmıştır. Dış kap sıcaklığın 37ºC'de 14 gün boyunca sabit tutulduğu bir fanlı fırına yerleştirilmiştir. Daha sonra 1.gün, 3.gün,

5.gün, 7.gün ve 14. gün hassas terazide örneğin toplam ağırlığı ölçülmüştür. Numunenin ne kadar su kaybettiği tespit edilerek su buharı geçirgenliği tespit edilmiştir.

3.10. *IN VITRO* HÜCRE-UYUMLULUK TESTLERİ

Hücre uyumluluğunun tespit edilmesi için NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™) fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Fibroblast hücreleri 37°C sıcaklıktaki kültür ortamıyla (L-glutamin içeren DMEM, %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin) inkübatörde %5 CO_2-%95 hava ile nemlendirilmiş atmosferde inkübe edilmiştir ve kültür ortamı her iki günde bir yenilenmiştir. Hücreler en azından %80-90 yoğunluğa ulaştığında, 1:3 oranlarında pasajlar yapılmıştır (151). Yara örtülerinin üzerine hücre ekiminden önce, numuneler sterilizasyon için öncelikle %70 etanol içerisinde 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra alkol uzaklaştırılarak numunelerin kuruması için laminar akış altında bırakılmıştır. Daha sonra örneklerin iki yüzü de 20 dk boyunca ultraviyole ışık ile steril edilmiştir (152). EGF'li deney grupları, kolajen ile birlikte EGF'nin çekirdek kısımda elektroeğrilmesiyle oluşturulmuştur. Hücre sayısı, tripan mavisi ile boyanarak ve daha sonra bir hemositometre ile sayılarak belirlenmiştir (153). Daha sonra hücreler, 24 kuyucuklu plakada 10^4/1cm^2 alan yoğunlukta yara örtüleri üzerine ekilmiştir (136, 154). Örnek olarak saf PLLA, PLLA/Kol-I, PLLA/Kol-I+AuNP ve PLLA/Kol-I+AuNP+EGF, kontrol grubu olarak ise hücre kullanılmıştır. Ekilmiş NIH/3T3 hücreli numuneler, 37°C'de ve %5 $C0_2$'de kültürlenmiştir. Hücre toksisitesi testleri, ISO 10993-5 protokollerine göre gerçekleştirilmiştir.

3.10.1. Hücre Proliferasyon Testi

Hücre ekiminden 1, 3, 5 ve 7. gün sonra örneklere ve kontrollere PrestoBlue ile hücre proliferasyon testi üreticinin protokolüne göre uygulanmıştır. Hücre kültürü hacminin %10'u olacak şekilde Prestoblue eklenmiştir (155). 37°C'de plakalar 4 saat daha inkübe edilmiştir ve ardından renk kompleksinin absorbansı, PrestoBlue için 600 nm'ye ayarlanmış bir referans dalga boyu ile 570 nm'de okunmuştur (156).

3.10.2. İmmunofloresan Boyama

Hücre dağılımları, 7 günlük kültivasyondan sonra falloidin-FITC (Sigma, ABD) ve DAPI (Abcam, Almanya) boyama ile değerlendirilmiştir (157). Kültür ortamının çıkarılmasından sonra hücreli örnekler, PBS ile yıkanmıştır ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında %2,5 glutaraldehit içeren tamponda sabitlenmiştir (154, 158). Daha sonra 5 dakika %0,1 Triton X-100 içine daldırılmış, ardından tekrar PBS içinde iki kez yıkanmıştır. Bu prosedürden sonra hücre yapıları, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca falloidin-FITC ile işaretlenmiştir. Hücre yapıları tekrardan iki kez PBS ile yıkanmıştır. Ardından hücre çekirdekleri 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Abcam Almanya) (konsantrasyon 1: 2000 olacak şekilde) ile boyanmıştır. Örneklere ekilen hücrelere DAPI solüsyonu ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Bağlanmamış DAPI, PBS ile üç kez yıkanarak uzaklaştırılmıştır (16). Ardından, uyarma ve emisyon dalga boyları 492/518 nm ve 358/461 nm olan boyalar için floresan mikroskop kullanılarak (Thunder Imager, Leica, Almanya) görüntüleme yapılmıştır.

3.10.3. Hücre Yayılması ve Morfolojisi

Hücre yayılması ve morfolojisinin incelenmesi için, her gruptan en az 2 numune PBS solüsyonu ile yıkanmıştır ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında %2,5 glutaraldehit içeren tamponda sabitlenmiştir (154, 158). Kalıntı glutaraldehiti uzaklaştırmak için PBS tamponuyla iki kez yıkandıktan sonra, hücre yüklü yapı iskeleleri sulu etanol serilerinde ıslatılarak dehidre edilmiştir (%50, %70, %80, %96) (158). Örnekler tamamen kurutulduktan ve ultra ince (5nm) altın/paladyum bir tabaka püskürtmesiyle kaplandıktan sonra SEM (Hitachi SU7000, Japonya) ile görüntülenmiştir (154, 159).

3.14. YÜZEY TEMAS AÇISI TESTİ

Yüzey temas açısı ölçümleri ile yara örtülerinin hidrofilik-hidrofobik karakteristikleri belirlenmiştir. Temas açısını analiz etmek için en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri, durağan damla yöntemi kullanılarak üç fazlı denge ara yüzey noktasında teğet açısının doğrudan ölçülmesidir (160). Düz yüzeyler için ıslatma özelliği, damla profiline bakılarak temas açısının doğrudan ölçülmesiyle belirlenmektedir. Yazılım kontrollü ölçüm ve analizler bir video tabanlı temas açısı ölçüm

cihazı ile gerçekleştirilmiştir (OCA 15 LJ, DataPhysics Instruments GmbnH, Almanya). Analiz, 25°C oda sıcaklığında %60 bağıl nem koşullarında 5'er µl su (161) PLLA/Kol-I ve PLLA/Kol-I+AuNP+EGF numuneleri üzerine damlatılarak gerçekleştirilmiştir.

3.15. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE TESTİ

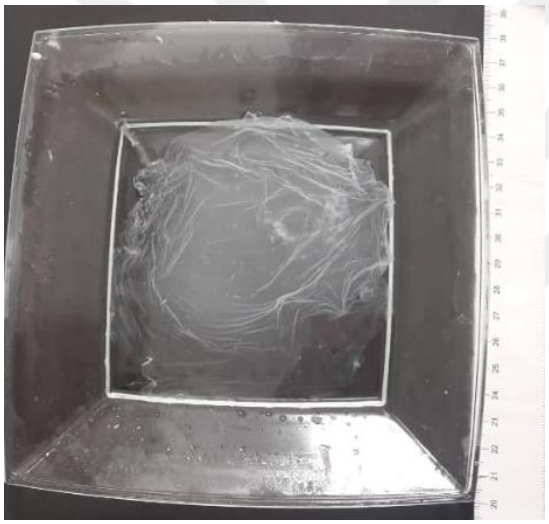
Örnek grupları olarak PLLA/Kol-I ve PLLA/Kol-I+AuNP olarak belirlenmiştir. Numuneler 10 mm çapında daireler halinde hazırlanmıştır. Sterilizasyon için öncelikle her numune %70 etanol içerisinde 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra alkol uzaklaştırılarak numunelerin kuruması için laminar akış altında bırakılmıştır. Numuneler kuruduktan sonra her iki yüzeyi de UV ile 20 dk steril edilmiştir. Bakteri kültürü için Mueller-Hinton Agar (Sigma, ABD) %3,8 oranında hazırlanmıştır ve otoklavlanarak petrilere aynı kalınlıklarda dökülmüştür (174, 175). Çalışılacak bakteri suşları için, Gram-pozitif bakteri olarak *S. aureus,* Gram-negatif bakteri olarak *E. coli* seçilmiştir (174, 176). Bakteriler otoklavlanmış %1,3 Nutrient Broth (No 3, Sigma, ABD) içerisinde süspanse edilmiştir. Homojen bir karışım elde edebilmek için her iki tüp 1 dakika boyunca vortekslenmiştir. Süspansiyona steril bir pamuklu çubuk kısaca batırılmıştır. Kültürü içeren tüp duvarına bastırarak çubuktaki fazla sıvı çıkarılmıştır (177). Plakaların yüzeyinin, bakteriler ile kaplandığından emin olunmuştur ve 5 dakika kurumaya bırakılmıştır. Cımbız %96 etanol içeren bir beher içine daldırılarak ve ardından Bunzen bek alevi ile sterilize edilmiştir. Test edilecek numune diskleri, steril cımbız kullanılarak Mueller-Hinton Agar plakalarının ortasına yerleştirilmiştir. Mueller-Hinton Agar plakaları, ters konumda 37°C'de 24 saat boyunca aerobik olarak inkübe edilmiştir (174, 175). İnkübasyondan sonra örnekler toplanmıştır ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında %2,5 paraformaldehit içeren tamponda sabitlenmiştir (166, 170). Daha sonra bakteri yüklü yara örtüleri sulu etanol serisinde dehidre edilmiştir (%50, %70, %80, %96) (170). Örnekler tamamen kurutulduktan ve ultra ince (5nm) altın/paladyum kaplandıktan sonra SEM (Hitachi SU7000, Japonya) ile görüntülenmiştir (166, 171).

4. BULGULAR

4.1. ÜRETİLEN DERİ İKAMELERİNİN GÖRÜNÜMÜ

Elektroeğirme yöntemi ile üretilmiş deri ikamelerinden seçilen birer örneğin, kollektörde toplanması sonunda etil alkol üzerindeki görüntüleri aşağıdaki şekilde verilmiştir.

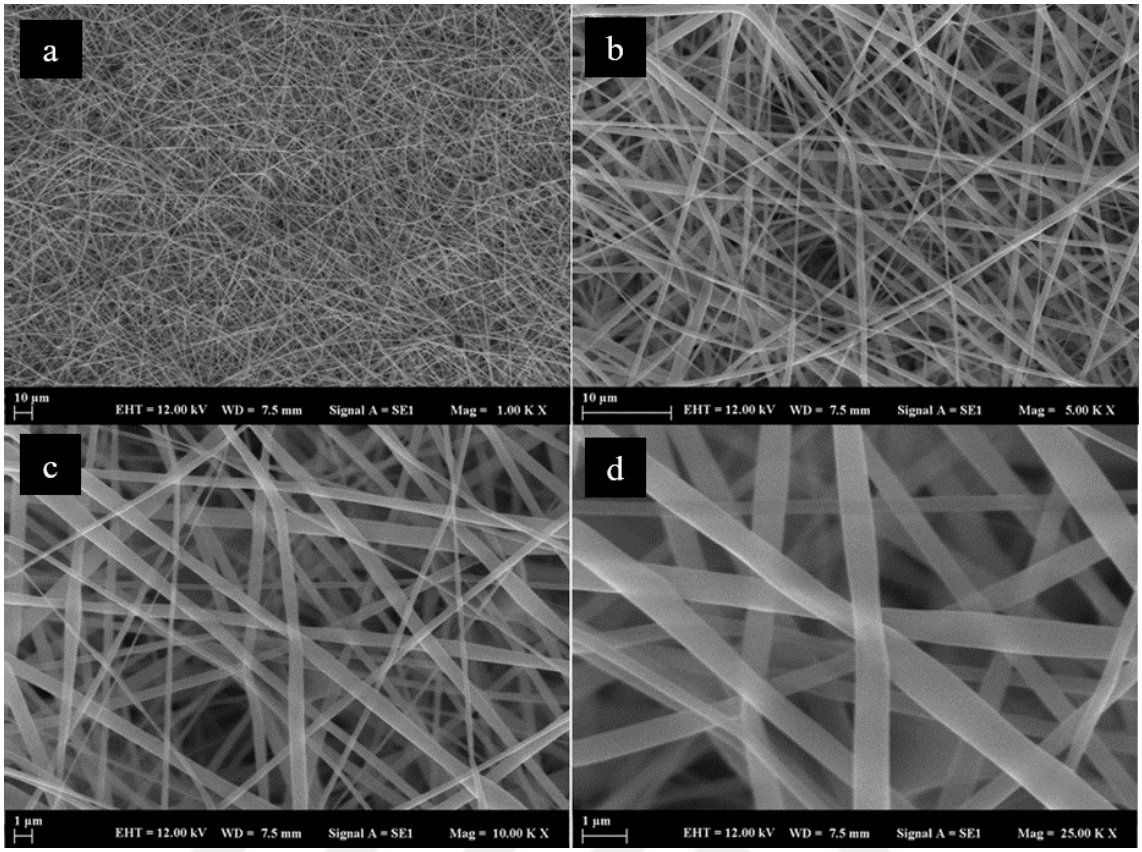
Resim 4.1'de koaksiyel elektroeğirme işleminde hedeflenen alkolde biriken fiber matın fotoğrafik görüntüsü verilmiştir.



Resim 4.1: Elektroeğirme işleminde dış katmanda (kabuk) HFIP içerisinde ağırlıkça 15% PLLA ve iç katmanda (çekirdek) %1'lik asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden fiber elde etmek üzere 25kV voltaj, 15cm mesafe ve 0,5 mL/saat akış hızı ile fotoğrafik görüntüsü

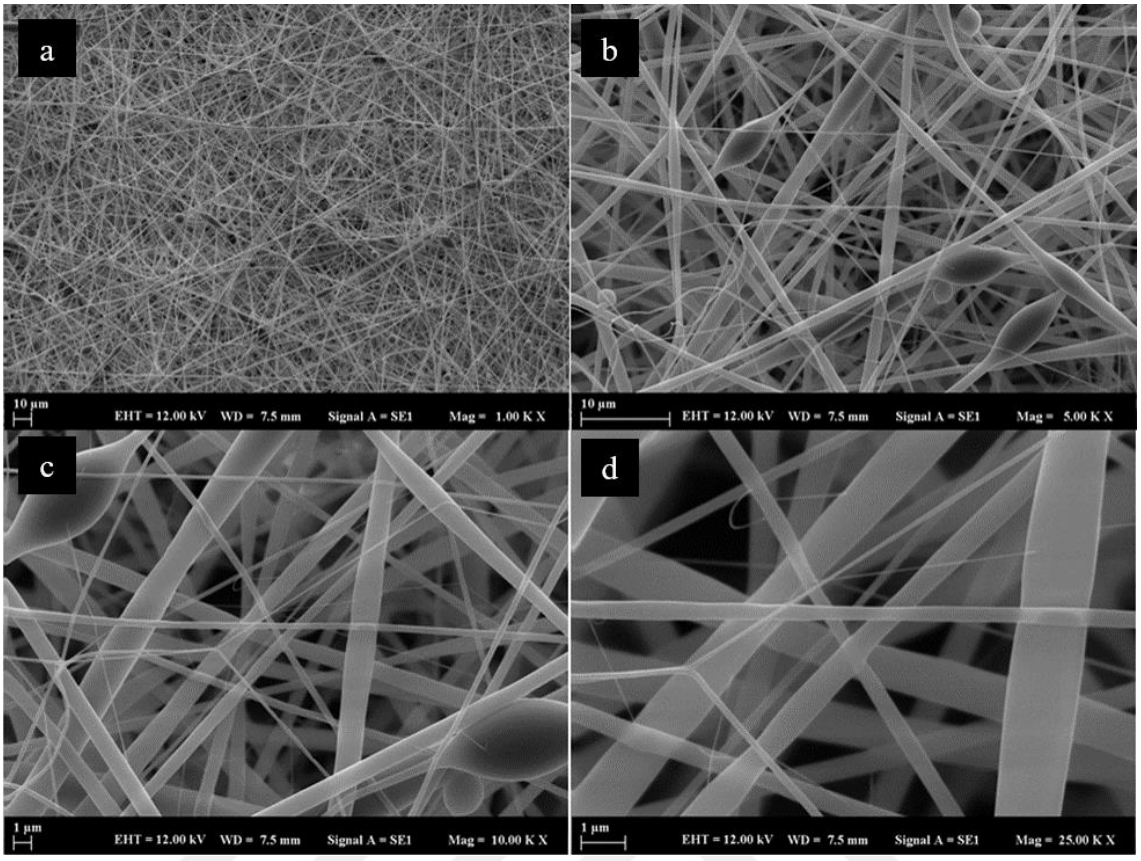
4.2. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOPİSİ (SEM)

Resim 4.2'de HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiberlerin görüntüleri bulunmaktadır. Fiber morfolojisinin düz ve homojen bir görünüme sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bu parametrelerin fiberlerde boncuk şekilli fiber oluşumuna yol açmadığı görülmüştür. "ImageJ" programı ile 100 rastgele noktadan alınan fiber çapı ölçümünün ortalaması Φ=0,581 µm bulunmuştur.



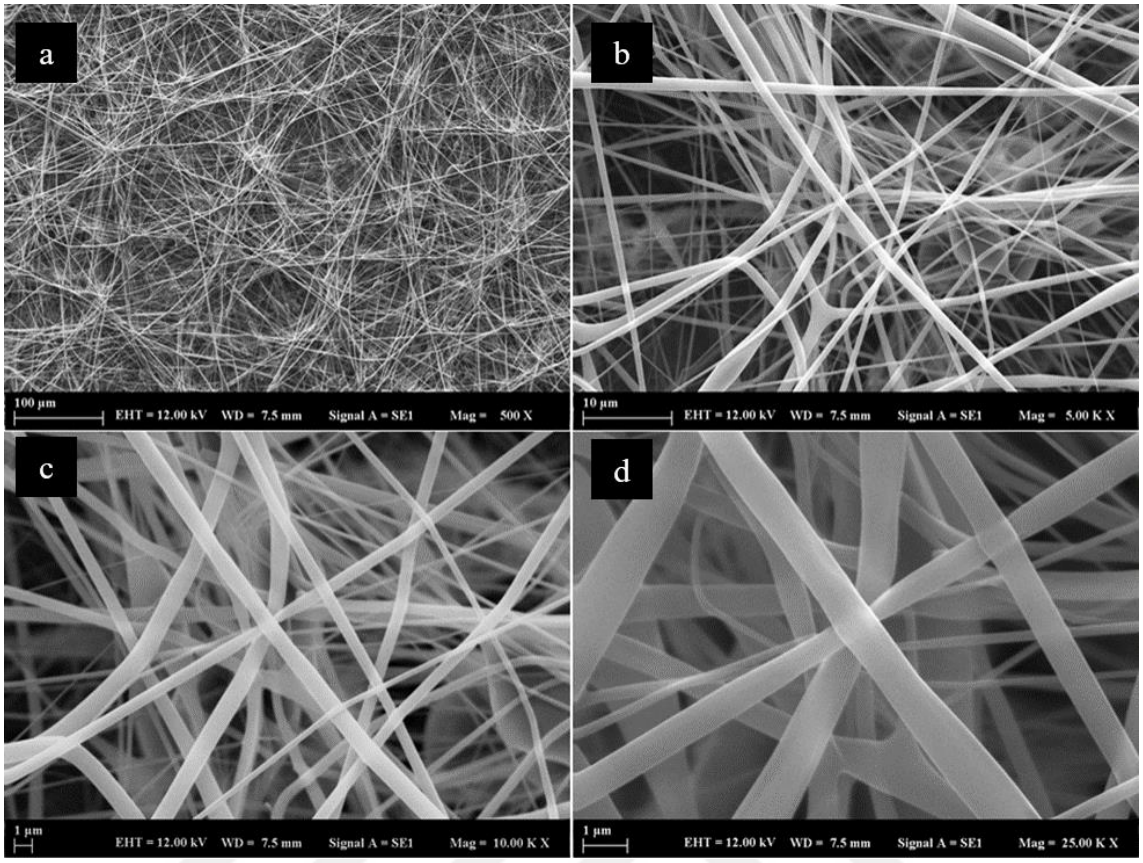
Resim 4.2: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×

En iyi fiber yapısını elde edebilmek için öncelikle voltaj parametresi üzerinde değişiklik yapılmıştır. Resim 4.3'te elektroeğirme voltajı 20 kV'ye ayarlanmıştır ve diğer parametreler sabit tutulmuştur. Bu parametreler kullanılarak üretilen fiberlerin görüntüleri bulunmaktadır. Fiber morfolojisinin düz ve homojen bir görünüme sahip olmadığı anlaşılmaktadır. Bu parametrelerin fiberlerde az miktarda da olsa boncuk (bead) şekilli fiber oluşumuna yol açtığı görülmüştür.



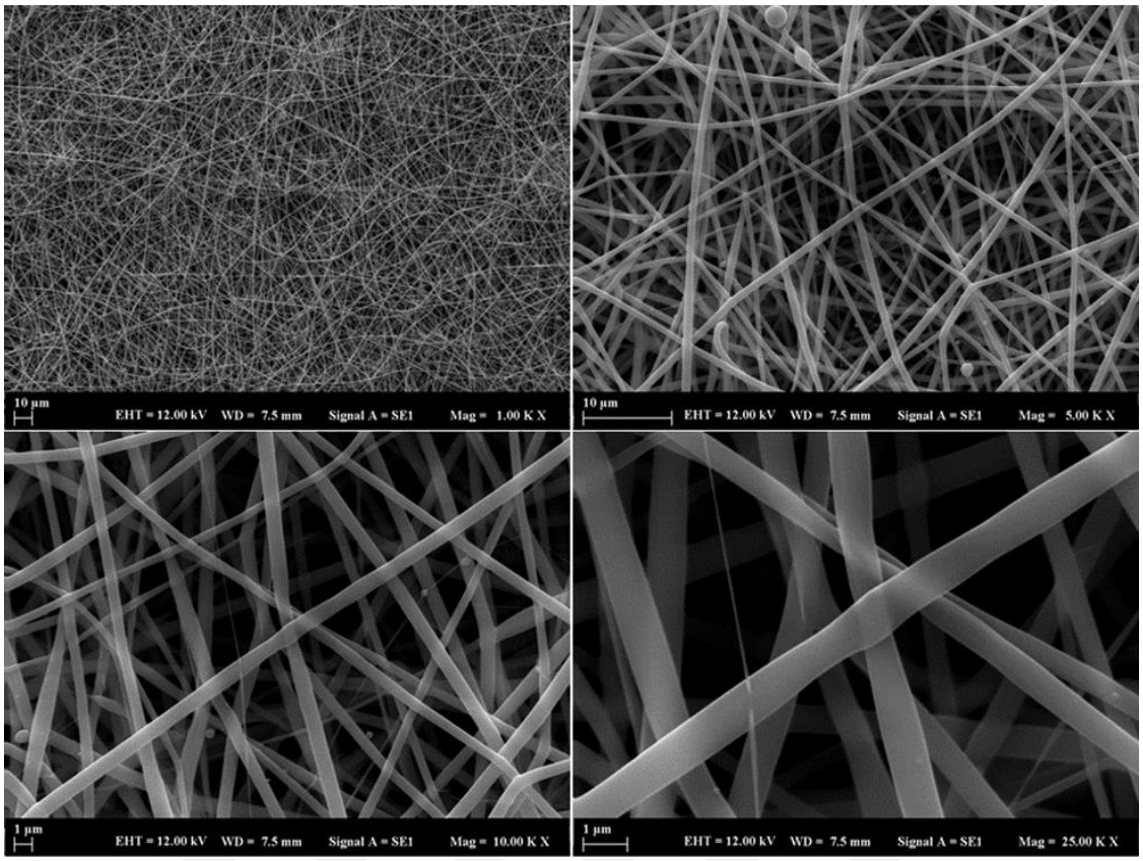
Resim 4.3: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 20 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×

Resim 4.4'te verilen fiber matın üretiminde elektroeğirme voltajı 15 kV'ye ayarlanmıştır ve diğer parametreler sabit tutulmuştur. Bu parametreler kullanılarak üretilen fiberlerin görüntüleri bulunmaktadır. Fiber morfolojisinin düz ve homojen bir görünüme sahip olmadığı anlaşılmaktadır. Bazı kısımlarda düzgün homojen görüntüleri de elde edilmiş olmasına rağmen boncuk şeklinde fiberler de gözlenmiştir. Ayrıca bazı fiberlerin dallanmış olduğu görülmektedir.



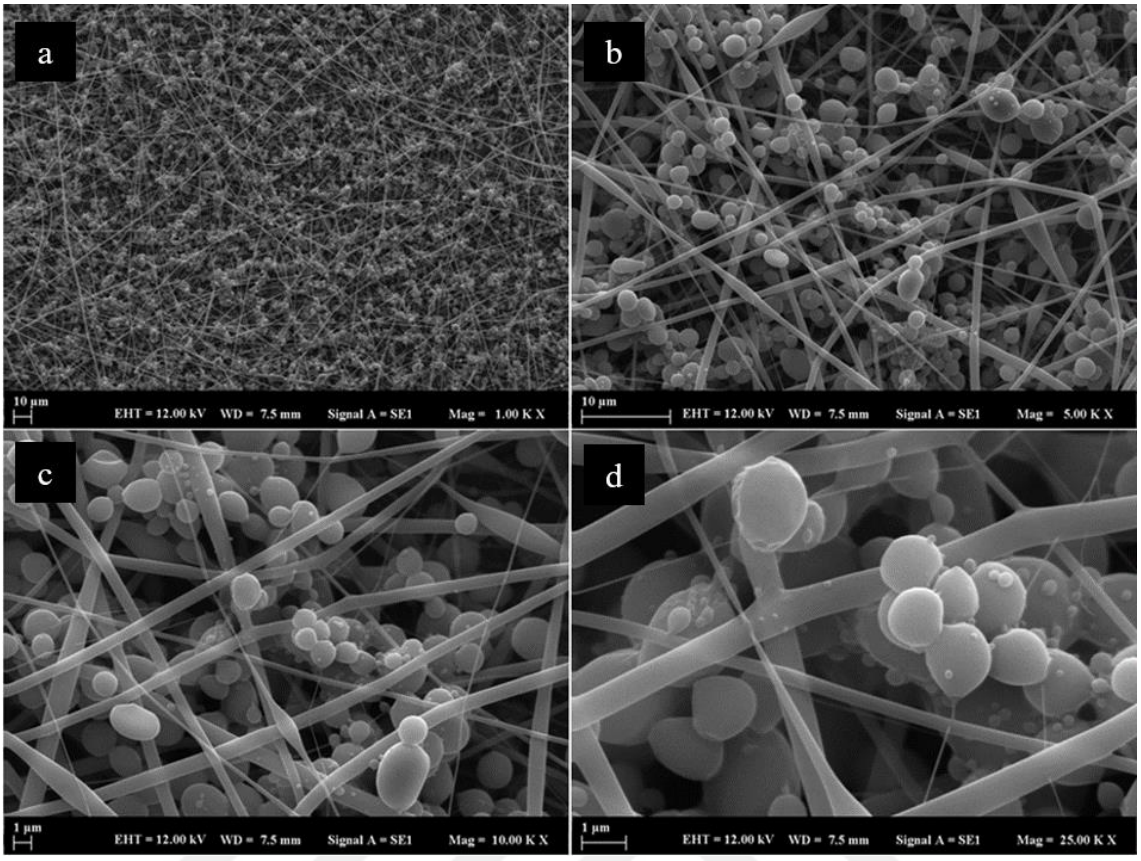
Resim 4.4: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 15 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×

En iyi fiber yapısını elde edebilmek için ikinci olarak mesafe parametresi üzerinde değişiklik yapılmıştır. Resim 4.5'te verilen SEM mikrografilerinde görüntülenen fiberlerin üretiminde kolektörün (hedef) iğne ucuna olan mesafesi 10 cm'ye ayarlanmıştır ve diğer parametreler sabit tutulmuştur. Bu parametreler kullanılarak üretilen fiberlerin görüntüleri bulunmaktadır. Fiber morfolojisinin bazı noktalarda düz ve bazı noktalarda ise boncuklu bir görünüme sahip olduğu anlaşılmaktadır. Nispeten homojen bir fiber görüntüsü bu parametrelerle elde edilmiştir.



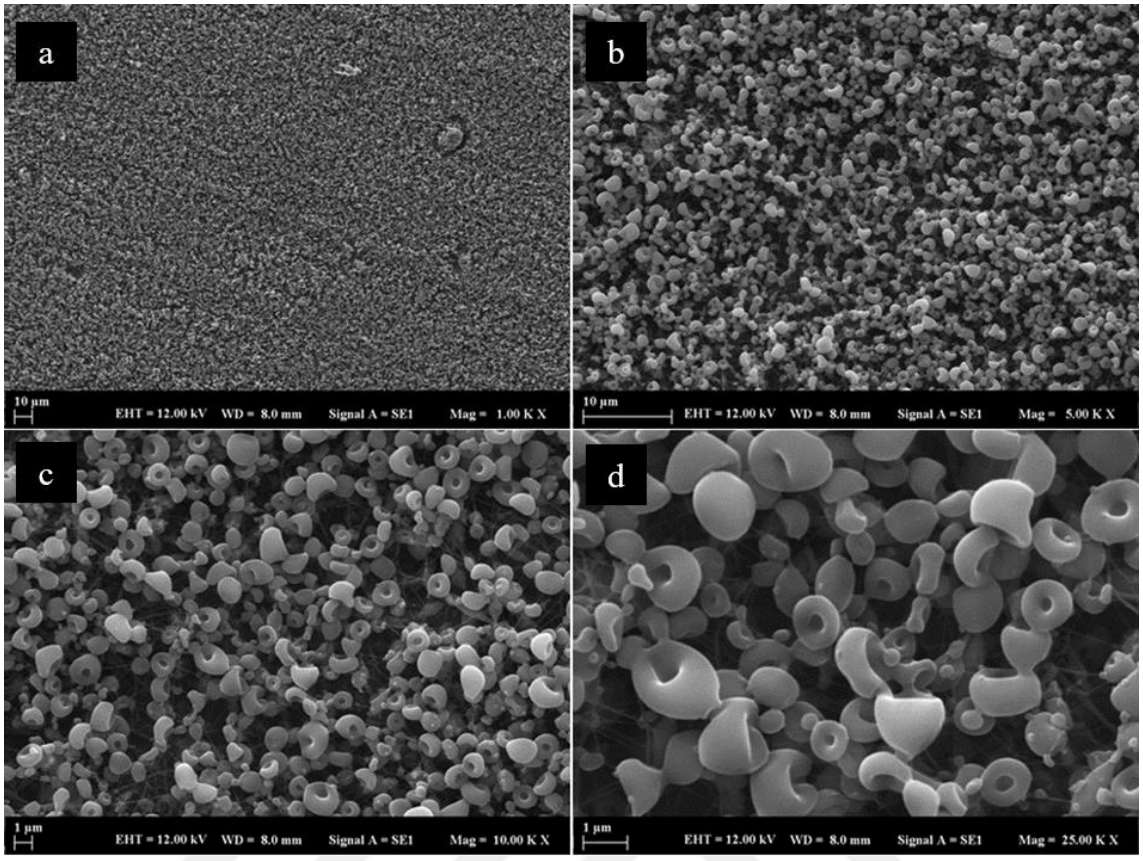
Resim 4.5: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 10 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×

Resim 4.6'da verilen SEM mikrografilerinde görüntülenen fiberlerin üretiminde kolektörün iğne ucuna olan mesafesi 20 cm'ye ayarlanmıştır ve diğer parametreler sabit tutulmuştur. Bu parametreler kullanılarak üretilen fiberlerin görüntüleri şekilde bulunmaktadır. Fiber morfolojisinin bazı noktalarda düz olmasına rağmen çoğu noktada boncuklu bir görünüme sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bazı fiber yapıları iğ benzeri formda görülmektedir. Homojen bir fiber görüntüsü bu parametrelerle de elde edilememiştir.



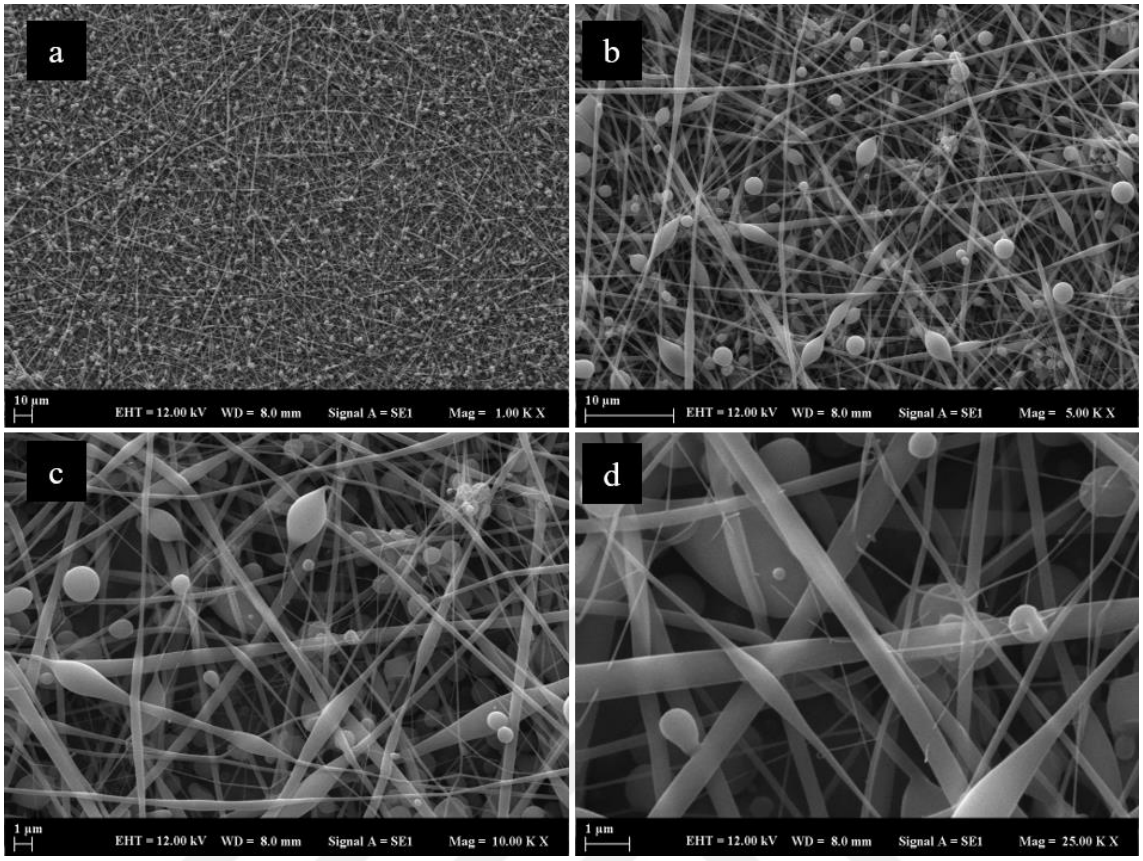
Resim 4.6: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 20 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×

En iyi fiber yapısını elde edebilmek için üçüncü olarak akış hızı parametresi üzerinde değişiklik yapılmıştır. Resim 4.7'de verilen fiberlerin üretiminde çözelti akış hızı 0,2 ml/saat olarak ayarlanmıştır ve diğer parametreler sabit tutulmuştur. Bu parametreler kullanılarak üretilen fiberlerin görüntüleri yukarıdaki şekilde bulunmaktadır. Eritrosit benzeri yapılar oluştuğu görülmektedir. Görüntünün iç kısımlarında bir miktar fiber bulunmaktadır ancak bu parametrelerle düzgün fiber yapısı sağlanamamıştır. Ancak, elde edilen partiküller, çoğu donut şeklinde 2µm'den küçük boyutlardadır. Bu yapı şekil ve boyut açısından oldukça ilgi çekicidir ve elektroeğirme yerine elektrosprey sebebi ile oluşmuştur.



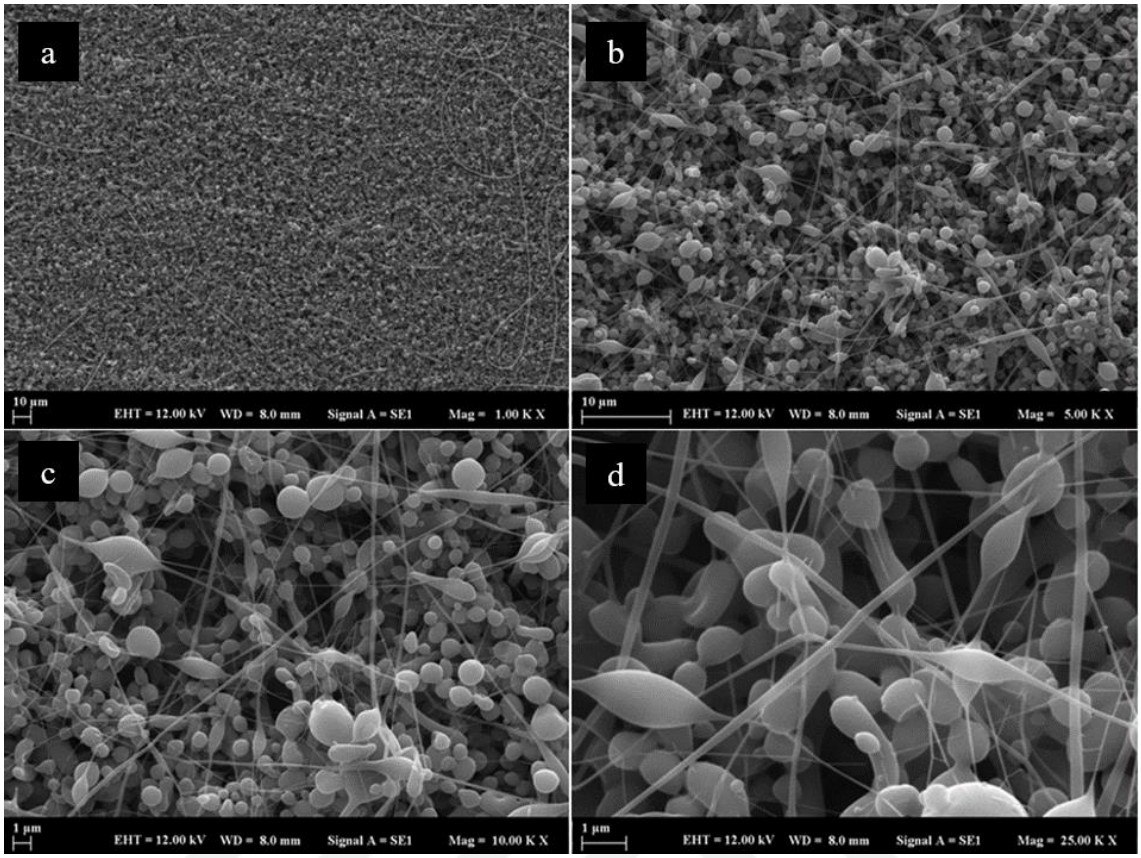
Resim 4.7: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,2 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×

Çift kapiler ile elektrospreyleme, elektrik alanda koaksiyal jetler üretir. Koaksiyel elektrospreylemede son yıllarda öncelikle parçacıkların kapsüllenmesine odaklanılmaktadır. Koaksiyel sıvı elektrosprey yoluyla mikro/nano kapsülleme, gıda katkı maddeleri, hedeflenmiş ilaç salımı ve özel amaçlı bazı prosesler için oldukça önemlidir (162). Bu tez çalışmasında elde edilen elektrospreylenmiş 2µm'den küçük parçacıkların gelecek çalışmalarda aynı parametrelerin kullanılmasıyla tekrar elde edilmesi sayesinde, ilaç salım ve yüzey kaplama gibi farklı uygulamalarda yer bularak yeni çalışmaların oluşturulmasına izin verebilecektir.



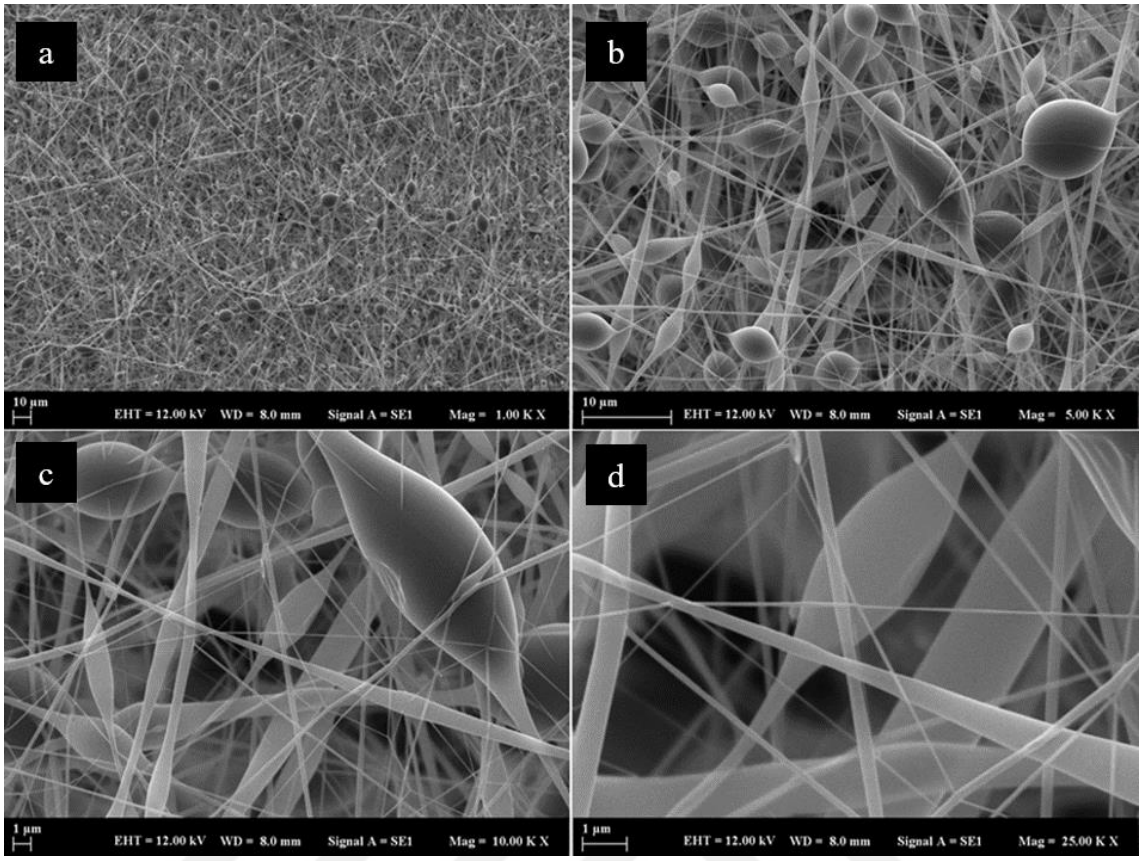
Resim 4.8: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,7 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×

Resim 4.8'de verilen SEM mikrografilerinde görüntülenen fiberlerin üretiminde akış hızı 0,7 ml/saat olarak ayarlanmıştır ve diğer parametreler sabit tutulmuştur. Bu parametreler kullanılarak üretilen fiberlerin görüntüleri yukarıdaki şekilde bulunmaktadır. Fiber morfolojisinin çok çeşitli olduğu görülmüştür. Bazı fiberler düz, bazı fiberler ise boncuklu ve iğ benzeri yapılara sahip olarak gözlenmiştir. Bu parametrelerle homojen görüntü sağlanamamıştır. Diğer parametrelerin sabit tutularak akış hızını arttırmak fiber morfolojisinde düzensizliğe neden olmuştur.



Resim 4.9: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 1 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×

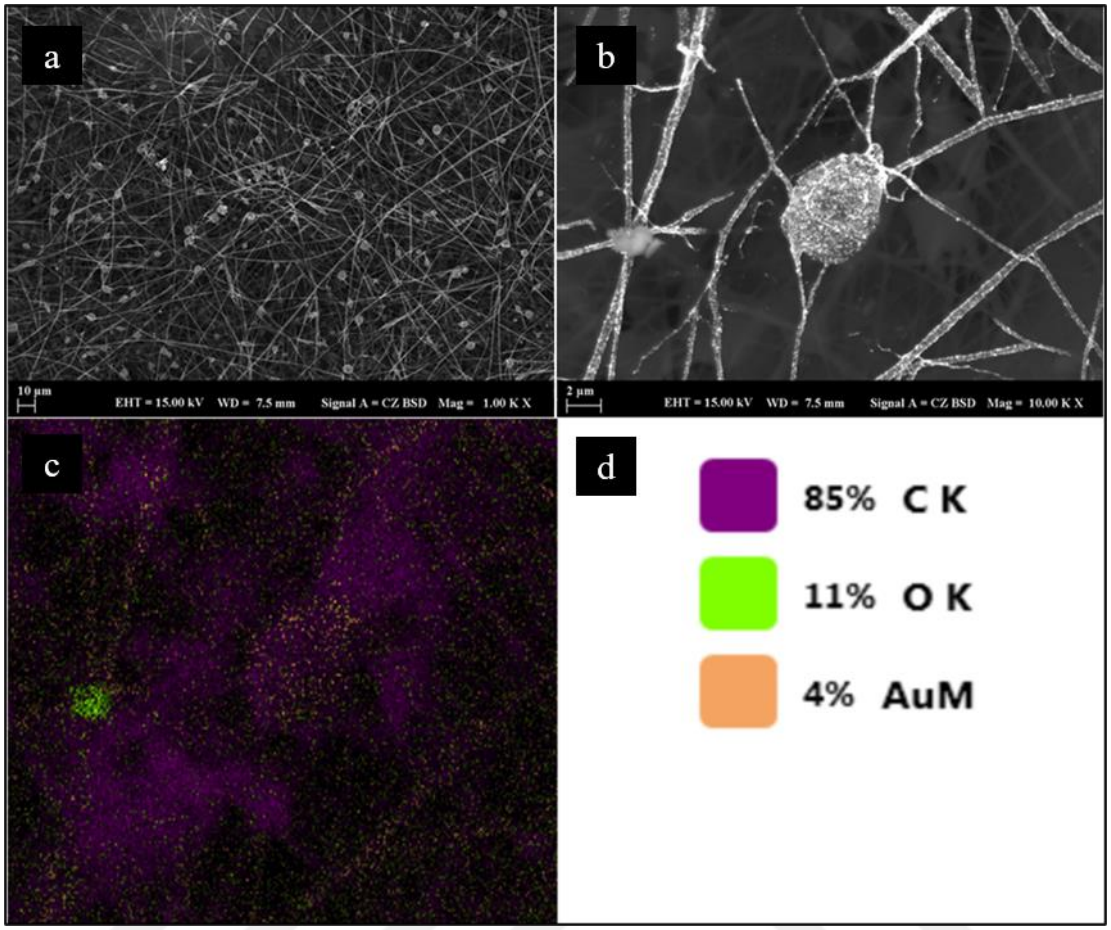
Resim 4.9'da verilen SEM mikrografilerinde görüntülenen fiberlerin üretiminde akış hızı 1 ml/saat olarak ayarlanmıştır ve diğer parametreler sabit tutulmuştur. Bu parametreler kullanılarak üretilen fiberlerin görüntüleri yukarıdaki şekilde bulunmaktadır. Resim 4.9'da olduğu gibi fiber morfolojisinin çok çeşitli olduğu görülmüştür. Bazı fiberler düz, bazı fiberler ise boncuklu ve iğ benzeri yapılara sahip olarak gözlenmiştir. Çok sayıda dallanma gösteren fiber oluşmuştur. Bu parametrelerle homojen fiber morfolojisi sağlanamamıştır. Akış hızını arttırmak düzensizliğe neden olmuştur.



Resim 4.10: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %2 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin SEM görüntüleri. Büyütmeler (a) 1000 ×; (b) 5000×; (c) 10000× ve (d) 25000×

Optimum fiber yapısını elde etmek için yapılan denemelerde dördüncü olarak kolajen konsantrasyonu üzerinde değişiklik yapılmıştır. Resim 4.10'da verilen SEM mikrografilerinde görüntülenen fiberlerin üretiminde kolajen konsantrasyonu %2 olarak hazırlanmıştır ve diğer parametreler sabit tutularak üretim yapılmıştır. Bu parametreler kullanılarak üretilen fiberlerin görüntüleri aşağıdaki şekilde bulunmaktadır. Boncuklu yapılardan çok iğ benzeri yapılar gözlenmiştir. Birbirine yakın fiber çapları da elde edilememiştir ve fiberler kalın veya ince formdadır. Bu parametrelerle homojen fiber yapısı sağlanamamıştır.

Kolajen miktarı %6'ya çıkartılarak da üretim yapılmıştır. Ancak fiber oluşumu gözlenmediği ve sprey şekilde üretim yapıldığı için işlem süresi kısa tutulmuştur. Bu yüzden SEM görüntüsü sunulmamıştır.

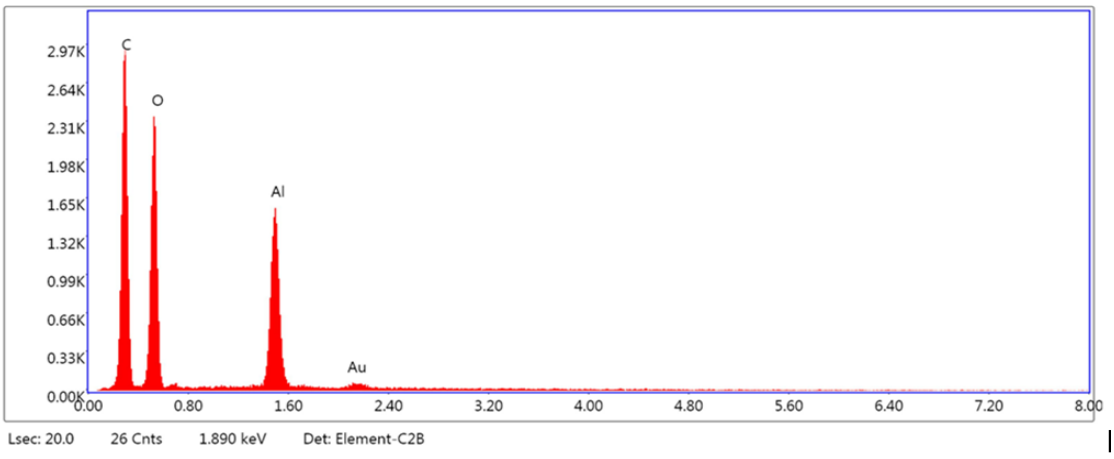


Resim 4.11: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-mikro/nano-fiberlerin altın nanoparçacık çözeltisiyle kaplandıktan sonraki SEM görüntüleri. Büyütmeler (a)1000 ×; (b) 10000×, (c) Elementlerin renk dağılımı ve (d) Elementlerin üründe bulunma yüzdesi (EDS analizi yapılacağından bu örnek için ayrıca bir Au-Pd kaplaması gerçekleştirilmemiştir.). C: Karbon, O: Oksijen, Au: Altın

Resim 4.2'deki örneğe ait parametrelerle üretilen örnek üzerine altın nanoparçacık kaplanması yapılmıştır. Örnekte altın bulunduğundan görüntüleme yapılırken Au-Pd kaplaması gerçekleştirilmemiştir. Altın nanoparçacıklar sayesinde kaplama olmadan da iletkenlik sağlanmış ve SEM görüntüsü elde edilmiştir. Resim 4.11'de altın nanoparçacık kaplı fiberlerden görüntüler bulunmaktadır. Resim 4.11(b)'de fiberler üzerinde AuNP'ler parlak noktacıklar olarak görünmektedir.

Aynı örnekte altının varlığını gösterebilmek için EDS ile elemental analiz yapılmıştır (Resim 4.11(d)). Resim 4.12'de başka bir çekimde alınan elementlerin pikleri verilmiştir. Burada alüminyum oranının fazla olması örneğin alüminyum folyo üzerindeki

analizinden kaynaklanmaktadır. Etanolde bekletilerek sterilizasyon uygulanmamış örnek yüzeyindeki analizde ağırlıkça %4 oranında altın bulunmuştur (Resim 4.11(d)). Bu sonuç, kaplama yoluyla altın nanoparçacıklarını yara örtüsü yapımında kullanılabileceğini göstermektedir. İstenildiği gibi altın tüm yüzeye düzgün homojen dağılım sağlamıştır. Nanoparçacıkların agregasyon yapmadığı gözlenmiştir. Analiz sonucu gözlenen altın oranının yara örtüsüne yeterli antibakteriyel özellik sağlayacağı düşünülmüştür.



Resim 4.12: HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen dual-fiberlerin altın nanoparçacık çözeltisiyle kaplandıktan sonraki EDS analizi. C: Karbon, O: Oksijen, Al: Alüminyum, Au: Altın

Sonuç olarak, koaksiyal elektroeğirme ile üretilen çekirdek-kabuk yapıdaki fiberlerden oluşan matın elde edilmesinde kullanılan voltaj, mesafe, akış hızı ve çözelti konsantrasyonu parametrelerinin değiştirilmesinin fiber morfolojisi üzerine etkisi aktarılmıştır ve değişkenlerin etkileri SEM görüntüleri ile desteklenmiştir.

Resim 4.2'deki örnekte kullanılan HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri, yara örtüsü yapımında kullanacak en ideal parametreler olarak bulunmuştur. Altın nanoparçacıkların kaplama yoluyla kullanılabileceği EDS analizi ile desteklenmiştir.

Üretilen PLLA/Kol-I yara örtülerinin koaksiyel yapıda olduğu Resim 4.13'te taramalı geçirimli elektron mikroskopu (STEM) detektörüyle, bir TEM gridi üzerine toplanan numuneden alınan görüntüde görülmektedir.



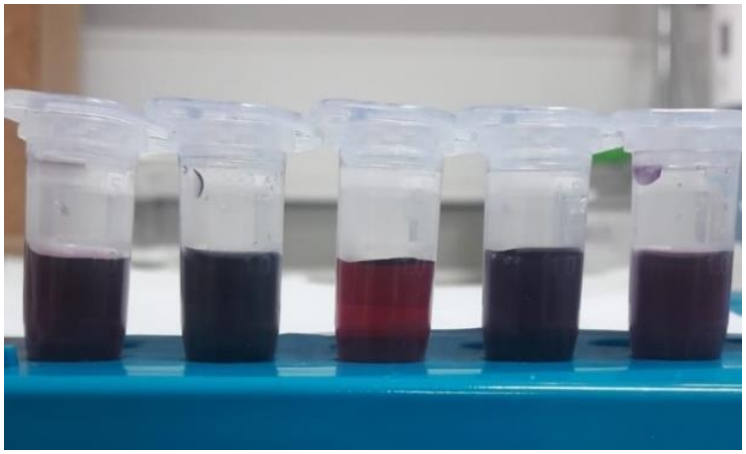
Resim 4.13: PLLA/Kol-I fiberin STEM ile alınan koaksiyel yapı görüntüleri. Büyütme;18000×

4.3. ALTIN NANOPARÇACIK KARAKTERİZASYONU

Altın nanoparçacıkların oluşmasında elde edilen süspansiyonda renk skalasına bakılarak ön değerlendirme yapılmıştır ve oluşan atın süspansiyonları Resim 4.14'te gösterilmiştir. Bu süspansiyonlar, üretim metodunda 2 ml sitrat dihidrat, 2,5 ml sitrat dihidrat, 3 ml sitrat dihidrat, 3,5 ml sitrat dihidrat ve 4 ml sitrat dihidrat kullanılarak oluşturulmuştur.

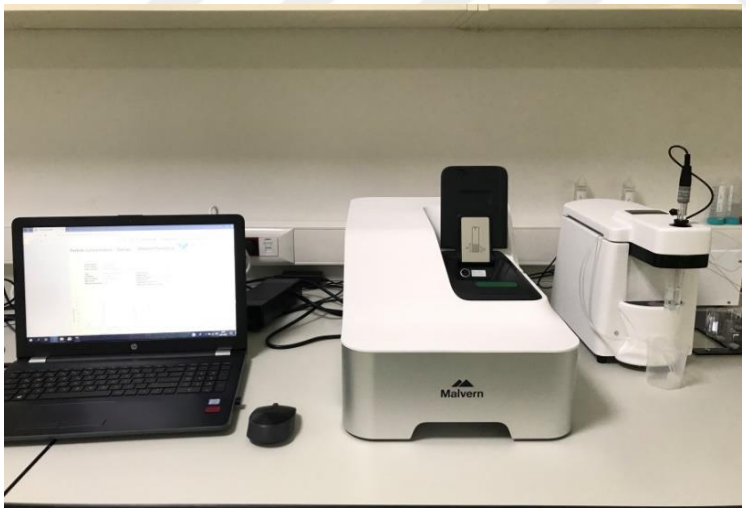
Bu metotta, altın (III) klorid trihidrat çözeltisine, farklı oranlarda eklenen trisodyum sitrat dihidrat ($Na_2C_6H_5O_7.2H_2O$) çözeltisi eklenmesiyle reaksiyon sonucunda oluşan renk skalasının kahverenginden kırmızıya doğru yaklaştıkça örneklerdeki altın parçacıkların boyutunun küçüldüğünü göstermektedir.

200 nm gibi nispeten büyük sayılabilecek altın nanoparçacık boyutları antibakteriyal etkinin sağlanması açısından uygun sayılmamaktadır. Bu sebeple, parçacık boyutunun belirlenmesi gerekmektedir.



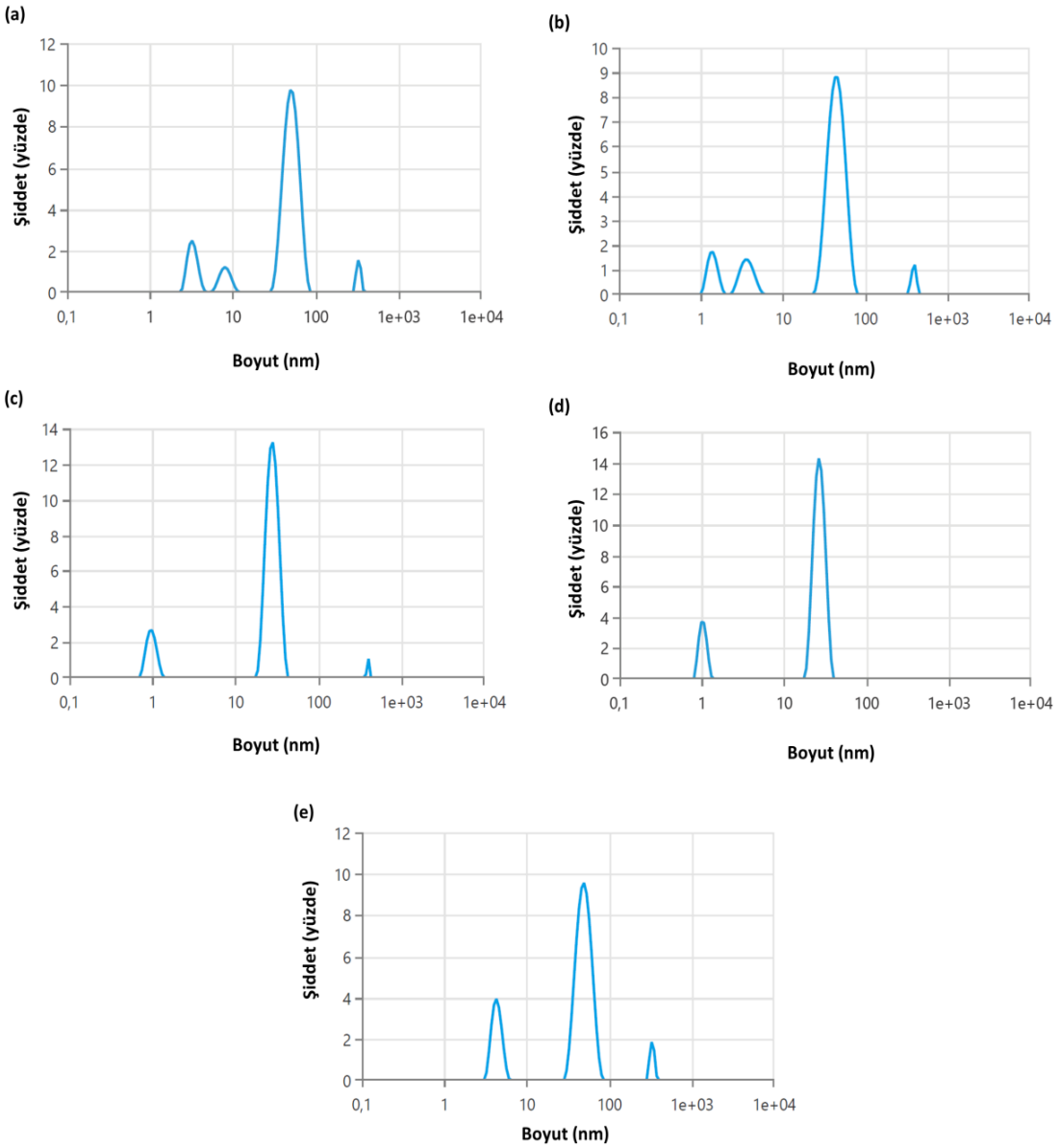
Resim 4.14: Altın nanoparçacık sentezi sonucu üretilmiş olan süspansiyonların renk dağılımı

Partikül boyut ve dağılımı için Zeta sizer cihazı ile (Malvern ZS, İngiltere) ile sentezlenen altın çözeltileri analiz edilmiştir (Resim 4.15).



Resim 4.15: Parçacık boyutlarının belirlenmesinde kullanılan Zeta sizer cihazı

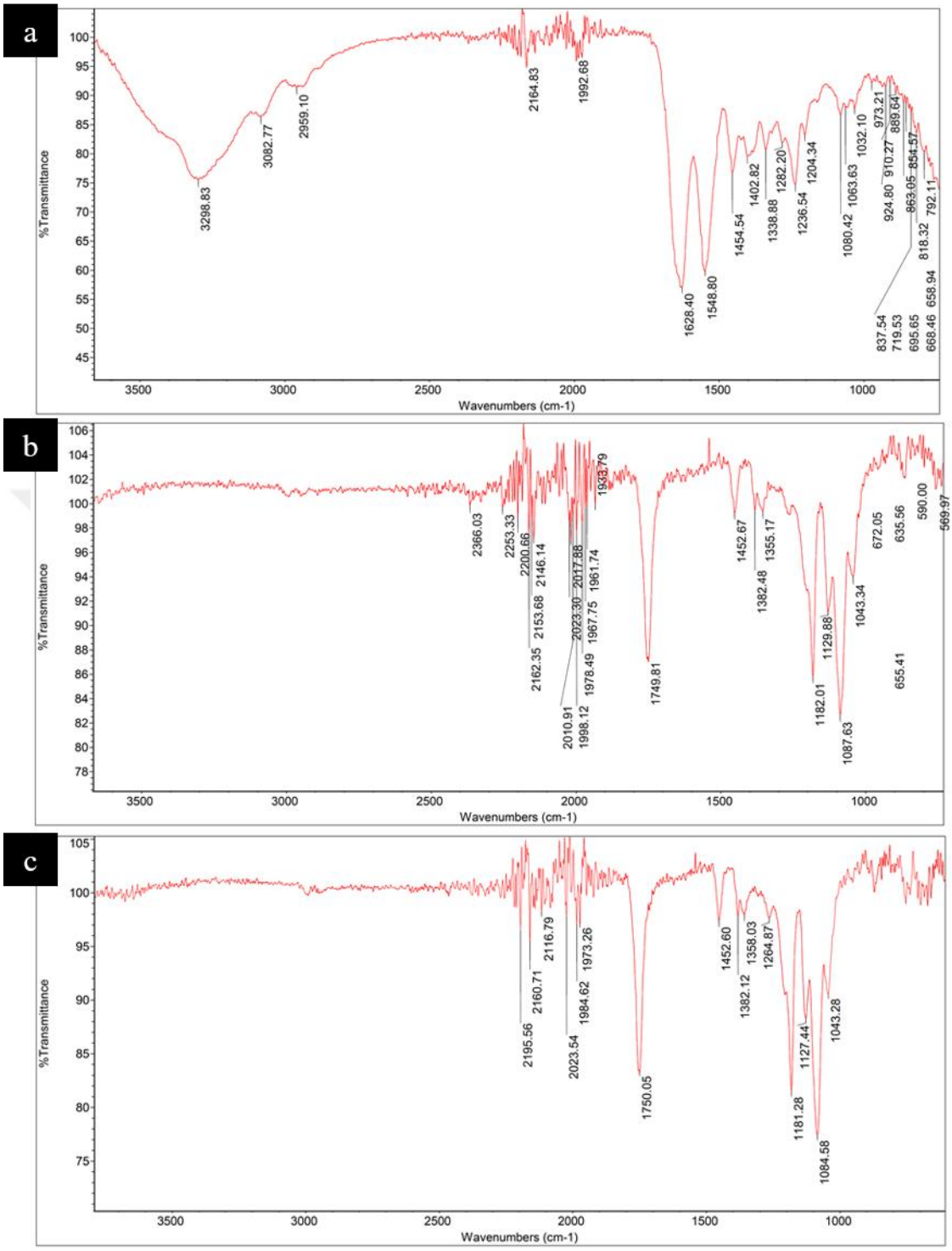
Üretilen altın parçacıkların boyutuna göre şiddet grafikleri Şekil 4.1'de verilmiştir. Grafikten elde edilen sonuçlara göre tüm altın parçacık içeren grupların ortalama partikül boyutlarının 100nm'nin altında olduğu belirlenmiştir. AuNP eklenmiş gruplarda 3,5 ml sitrat dihidrat eklenmesiyle hazırlanan süspansiyonun kullanılması uygun bulunmuştur.



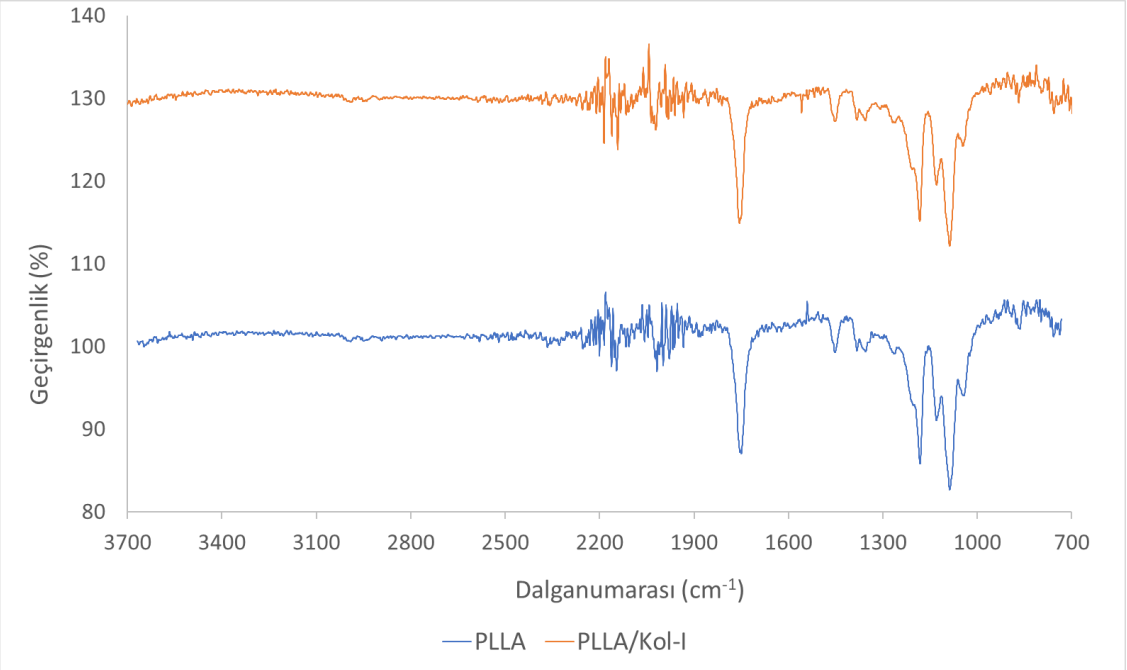
Şekil 4.1: Elde edilen altın nanoparçacıkların zetasizer şiddet (%) partikül boyut grafikleri: (a) 2 ml sitrat dihidrat, (b) 2,5 ml sitrat dihidrat, (c) 3 ml sitrat dihidrat, (d) 3,5 ml sitrat dihidrat, (e) 4 ml sitrat dihidrat kullanılarak oluşturulan altın süspansiyonları.

4.4. FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR)

Deri ikamelerindeki fonksiyonel grupların belirlenmesi için, saf PLLA, saf kolajen ve PLLA/Kol-I çekirdek-kabuk yapıdaki fiber mat FTIR spektrometresi kullanılarak karakterize edilmiştir. Bu 3 gruba ait FTIR spektrumları Şekil 4.2'de ve karşılaştırmalı olarak Şekil 4.3'te gösterilmektedir.



Şekil 4.2: FTIR spektrumları: (a) kolajen tip I; (b) saf PLLA; (c) PLLA/Kol-I kompozit fiber

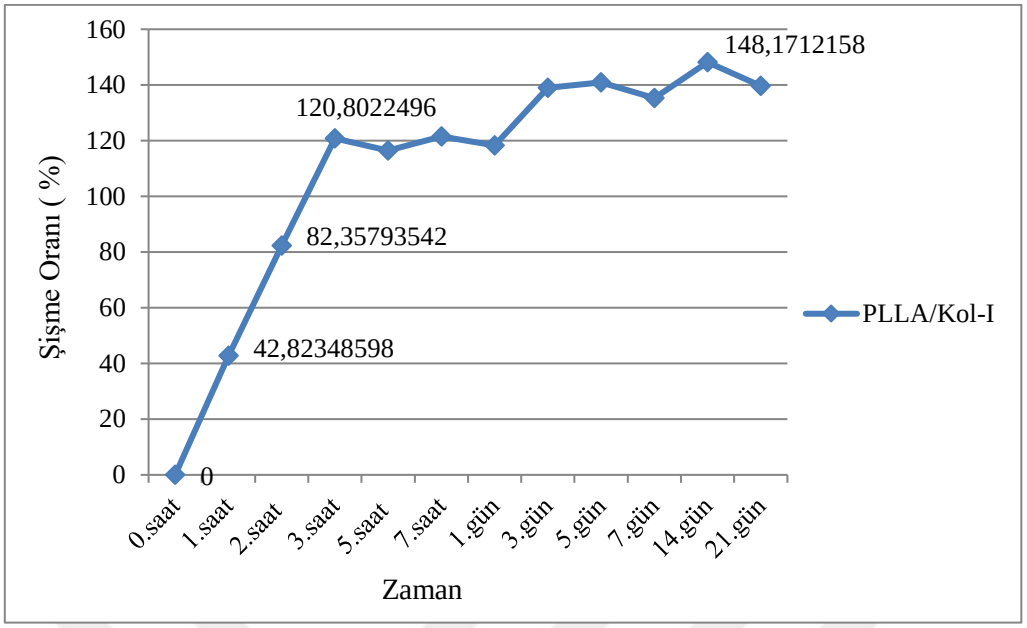


Şekil 4.3: Saf PLLA ve PLLA/Kol-I çekirdek-kabuk yapıdaki fiberlerin karşılaştırmalı FTIR spektrumları

Şekil 4.2'den ana bantlara ait kızılötesi dalga numaralarında (wavenumber) kolajen eklenmesi ile gözle görünür önemli değişiklikler gözlemlenmemiştir. FTIR spektrumlarında PLLA'nın karakteristik karbonil bandı (1,749 cm^{-1}), C–O esneme (stretching) (1,087 cm^{-1}) ve −CH− esneme titreşimleri (3,000 cm^{-1}) görülmüştür. PLLA/Kol-I fiberlere ait FTIR spektrumunda Şekil 4.2(a)'da verilen kolajene ait 1,628 cm^{-1} ve 1,548 cm^{-1}'de karakteristik amid 1 ve amid 2 bantları belirgin değildir bunun sebebi olarak PLLA'nın karakteristik bantları tarafından perdelenmesi olarak ifade edilebilir.

4.5. YARA ÖRTÜLERİNİN PBS İÇERİSİNDE ŞİŞME DAVRANIŞININ BELİRLENMESİ

Üretilen yara örtülerine ait PLLA/Kol-1 koaksiyel numunelerinin 37°C'de sabit tutulan PBS (pH = 7,4) içerisinde şişme yüzdeleri aşağıdaki grafikte verilmiştir. Kuru ağırlıklarına göre yüzde şişme hesaplandığından, grafikte deneyin başlatıldığı anda (0. saat) şişme oranı sıfırdan başlamaktadır. Analiz tüm örneklerde eşit ağırlık ile başlatılmıştır.

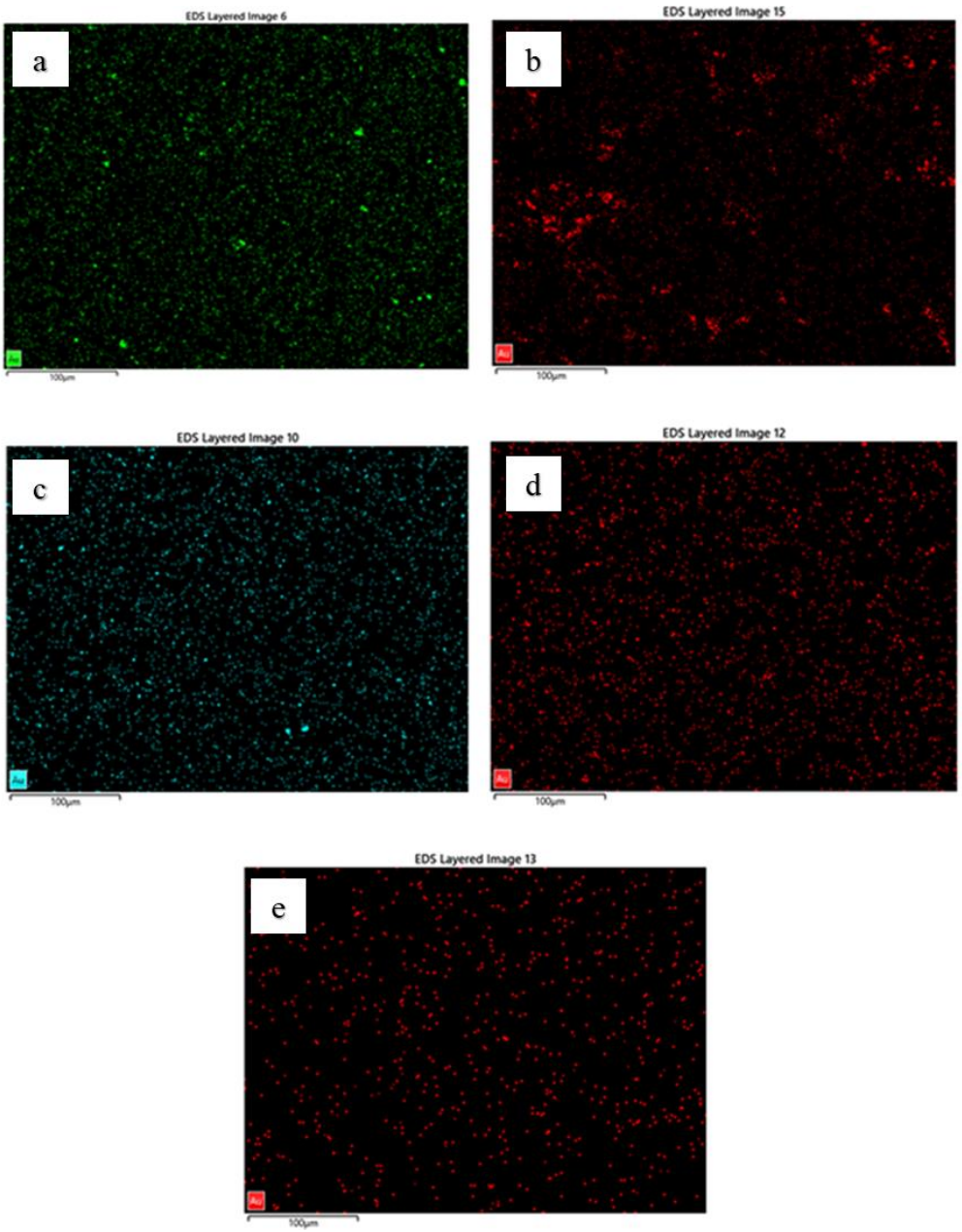


Şekil 4.4: Üretilen PLLA/Kol-I yara örtülerinin PBS içerisindeki şişme oranları, *n=3*

Şekil 4.4'te, %15 PLLA ve %4 tip 1 kolajen oranında farklı zamanlarda koaksiyel olarak üretilen yara örtülerinin sulu ortamda şişme oranlarının farklı olduğu ve şişme hızının da değişebildiği görülmektedir. PBS içerisinde en yüksek şişme oranı %148 ile 14.gün sonunda kaydedilmiştir. Ancak, deney süresince örneklerin bozunması sebebiyle fazla ağırlık kaybı ortaya çıkmamış ve örnekler bozunma deneyinin sonuna kadar, yani 21 gün boyunca su alımı nedeniyle ağırlık kazanmaya devam etmiştir. Örneklerde bozunma olmasına rağmen deney sonuna kadar şişme davranışı devam etmiş olup 21.günden sonra ağırlıkta örneklerin biyobozunmasına bağlı düşme eğilimi görülmüştür.

4.6. ALTIN NANOPARÇACIKLARIN FİBER YAPIDAN SALINMA MİKTARI

Optimize parametreler ile üretilmiş PLLA/Kol-I yara örtüsü altın nanoparçacıklar ile yöntem bölümünde verildiği gibi kaplanmıştır. Sonrasında 37ºC'de sabit tutulan PBS (pH = 7,4) içerisinde bekletilmiştir. Burada amaç zamanla numunelerin üzerinde ne kadar miktar altın nanoparçacık kaldığının gözlenmesidir. Yüzeydeki altın nanoparçacıkların dağılımı ve miktarının tespiti için sırasıyla 0.saat, 1.gün, 3.gün, 5.gün ve 14.gün olacak şekilde PBS'de bekletilen numunelerin EDS haritalama görüntüleri çekilmiştir ve Resim 4.16'da verilmiştir.

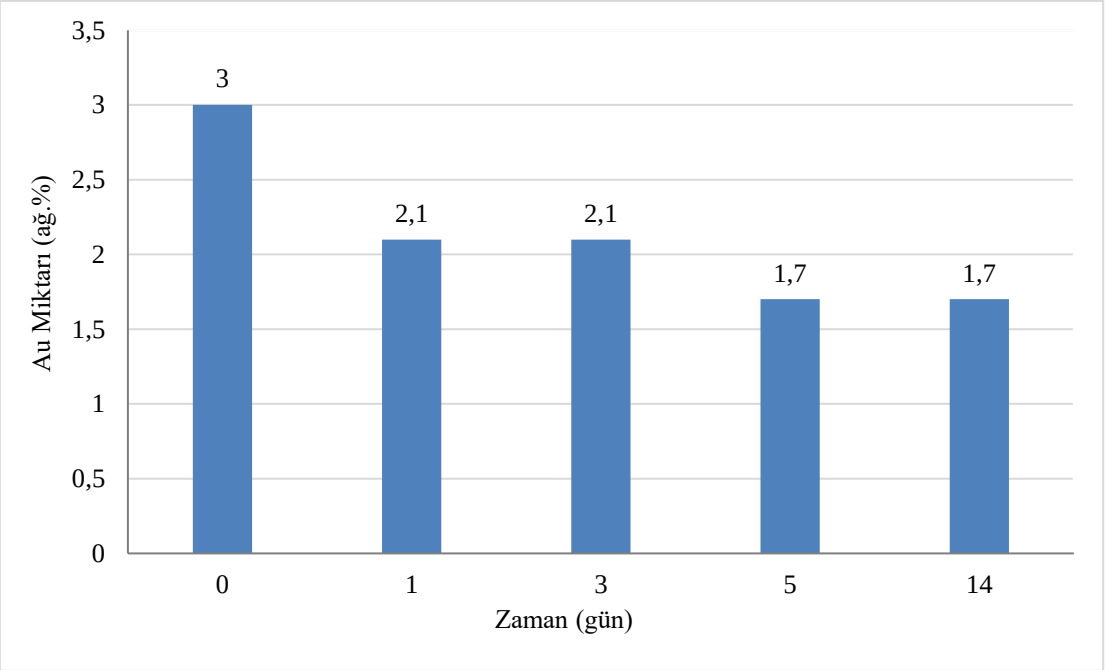


Resim 4.16: PLLA/Kol-I yara örtüsü üzerinde biriktirilen altın nanoparçacıkların EDS haritalamaları a) 0.saat, b) 1.gün, c) 3.gün, d) 5.gün, e) 14.gün

AuNP kaplı numunelerin PBS içerisine bırakılmadan önce (0.saat) yapılan ölçümlerinde Au miktarı ağırlıkça %3 olarak saptanmıştır. Bu örnekler kaplanma sonrası *in vitro* testlerdeki sterilizasyonun etkisini de eklemek için etanolde bekletilmiştir. Daha sonra PBS içerisine bırakılmıştır ve 0.saat, 1.gün, 3.gün, 5.gün ve 14.gün olacak şekilde yüzeyde kalan Au yüzdeleri ölçülmüştür ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

1.gün ve 3.gün EDS ölçümlerinde Au miktarı yaklaşık ağırlıkça %2,1 olarak ölçülmüştür. 5.günde ve 14.günde alınan veriler ile Au %1,7 olarak saptanmıştır.

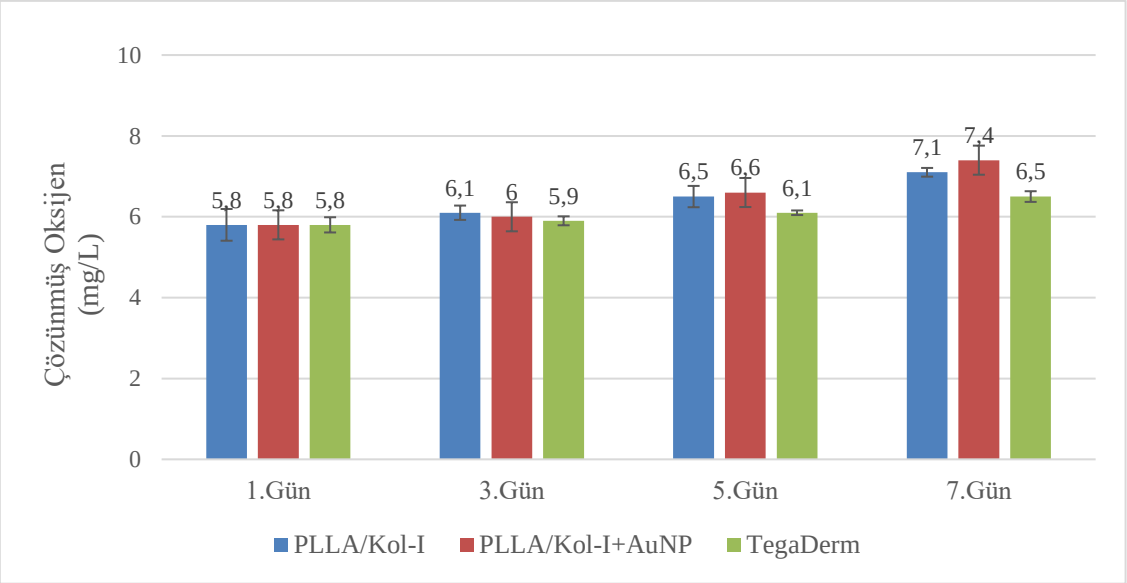
Buradan, AuNP'lerin 14 gün PBS içerisinde ağrılıkça yaklaşık %43'ünün salımının gerçekleştiği anlaşılmaktadır. PLLA/Kol-I yara örtülerinin üzerine antibakteriyel etkisi nedeniyle dekore edilen nanoparçacıkların 14 gün salıma rağmen yüzeyde bulunmaya devam ettiği görülmüştür.



Şekil 4.5: EDS verilerine göre PBS içerisinde 14 gün boyunca salınan altın (Au) nanoparçacıkların PLLA/Kol-I üzerinde kalan yüzde ağırlık miktarı

4.7. OKSİJEN GEÇİRGENLİK TESTİ

Numunelerin oksijen geçirgenliği, Winkler yöntemi kullanılarak belirlenmiştir ve sonuçlar çözünmüş oksijen miktarı (mg / L) olarak ifade edilmektedir. 1.gün, 3.gün, 5.gün ve 7.gün zaman dilimlerinde ölçümler yapılmıştır ve Şekil 4.6'da grafiği verilmiştir.



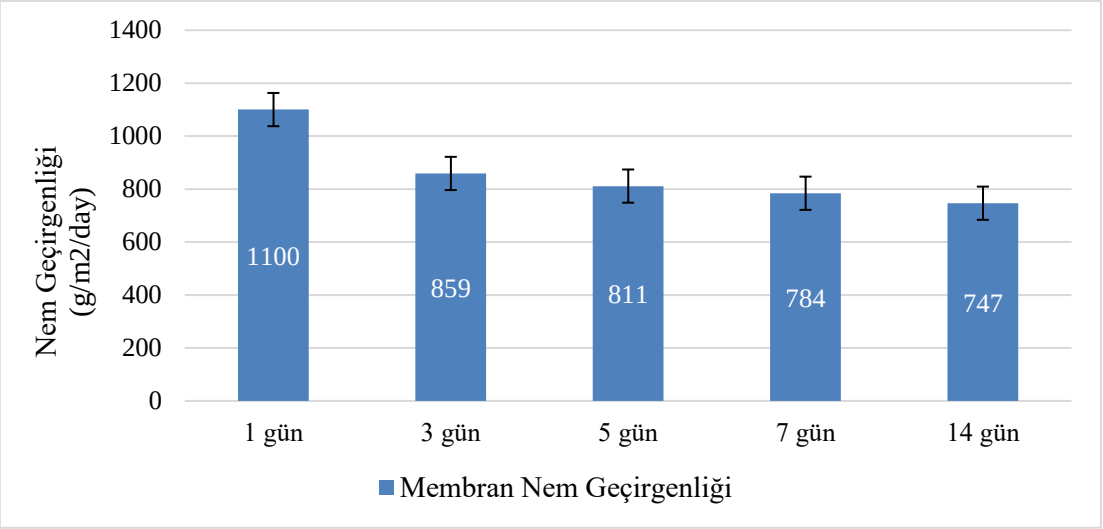
Şekil 4.6: PLLA/Kol-I, PLLA/Kol-I+AuNP ve Tegaderm yara örtülerinin oksijen geçirgenliğinin çözünmüş oksijen miktarı(ppm) cinsinden grafiği, hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir, *n=3*

En yüksek çözünmüş oksijen miktarı 7.gündeki ölçümde PLLA/Kol-I+AuNP örneğinde 7,4 ppm olarak ölçülmüştür. Çözünmüş oksijen miktarı alınan diğer ölçümlerde değişkenlik göstermiştir. PLLA/Kol-I+AuNP için çözünmüş oksijen miktarı 1.gün, 3.gün, 5.gün ve 7.gün olacak şekilde sırasıyla 5,8 ppm, 6 ppm, 6,6 ppm ve 7,4 ppm olarak hesaplanmıştır. Çözünmüş oksijen miktarı 7.güne kadar artış göstermiştir. Hava geçirmez şişeden (negatif kontrol) ve açık şişeden (pozitif kontrol) test edilen çözeltilerde sırasıyla çözünmüş oksijen 5,2 ppm ve 7,8 ppm olarak ölçülmüştür.

4.8. NEM GEÇİRGENLİĞİ TESTİ

Nem (su buharı) geçirgenlik testleri, ASTM E 96-80 (Desiccant Method) standardına uygun olarak yapılmıştır. Nemin sabitliği kabın içerisinde bulunan prob ile takip edilmiştir. 0.saat, 2.saat, 6.saat, 1.gün, 3.gün, 5.gün, 7.gün ve 14.gün olarak 1 dm^2 numuneden geçen nem miktarının (su buharı iletim hızı, WVTR) gram cinsinden değeri ölçülerek nefes alabilirlik ölçülmüştür ve Şekil 4.7'de grafik olarak verilmiştir.

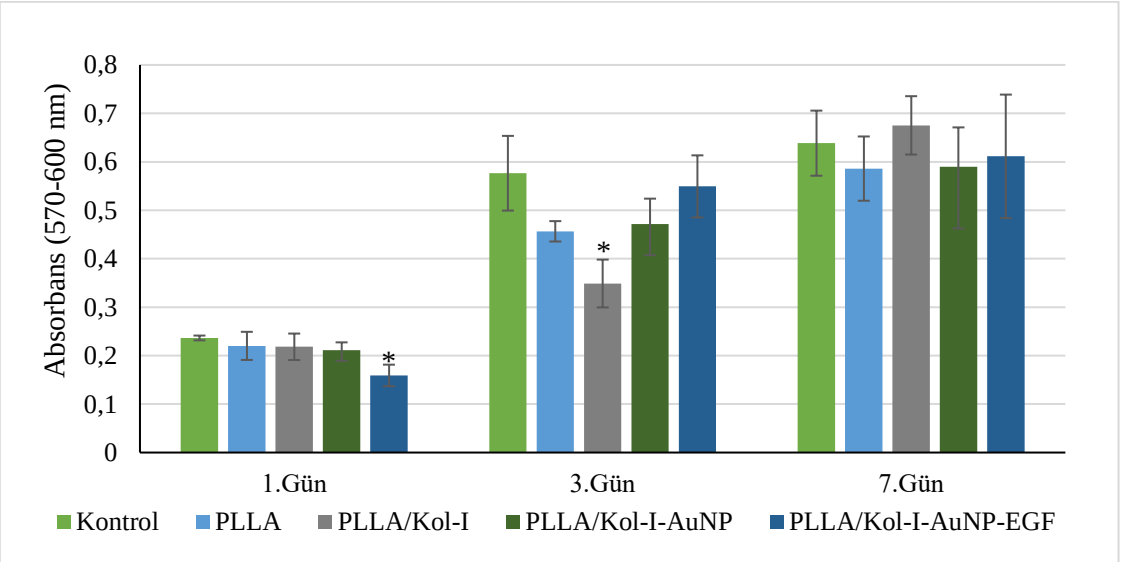
En yüksek nem geçirgenliği 1100 $gm^{-2}gün^{-1}$ olarak 1.günde hesaplanmıştır. Nem geçirgenliği değerleri 14 gün boyunca azalma eğilimi göstermiştir. Üretilen PLLA/Kol-I yara örtüsünün nem geçirgenliği, 3.gün, 5.gün, 7.gün ve 14.gün olacak şekilde sırasıyla 859, 811, 784 ve 747 $gm^{-2}gün^{-1}$ olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.7: PLLA/Kol-I yara örtülerinin nem geçirgenliği grafiği, hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir, n=3

4.9. HÜCRE PROLİFERASYON TESTİ

Hücre proliferasyon oranını belirlemek için 1, 3, 5 ve 7 gün sonra örneklere ve kontrollere PrestoBlue ile hücre proliferasyon testi uygulanmıştır. 570 nm dalga boyunda 600 nm referans değeriyle okuma yapılmıştır. 570-600 nm absorbans değerlerinin 1.gün, 3.gün ve 7.gün değerleri ile grafik oluşturulmuştur ve Şekil 4.8'de verilmiştir.

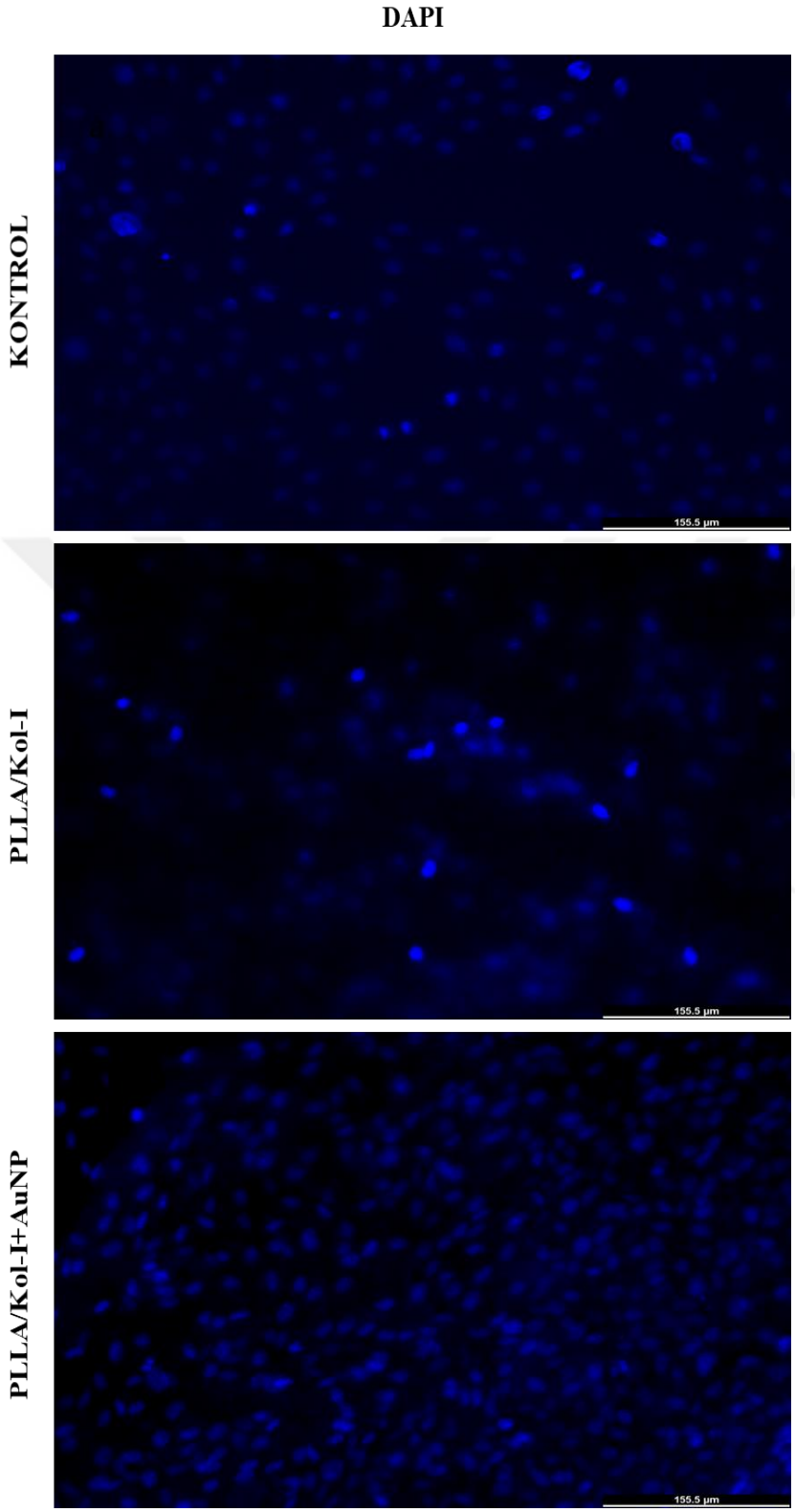


Şekil 4.8: Kontrol, PLLA, PLLA/Kol-I, PLLA/Kol-I+AuNP ve PLLA/Kol-I+AuNP+EGF için 1.gün, 3.gün ve 7.gün 570-600 nm absorbans değerleri, hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir, *n=3*. * gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir ($p<0,05$)

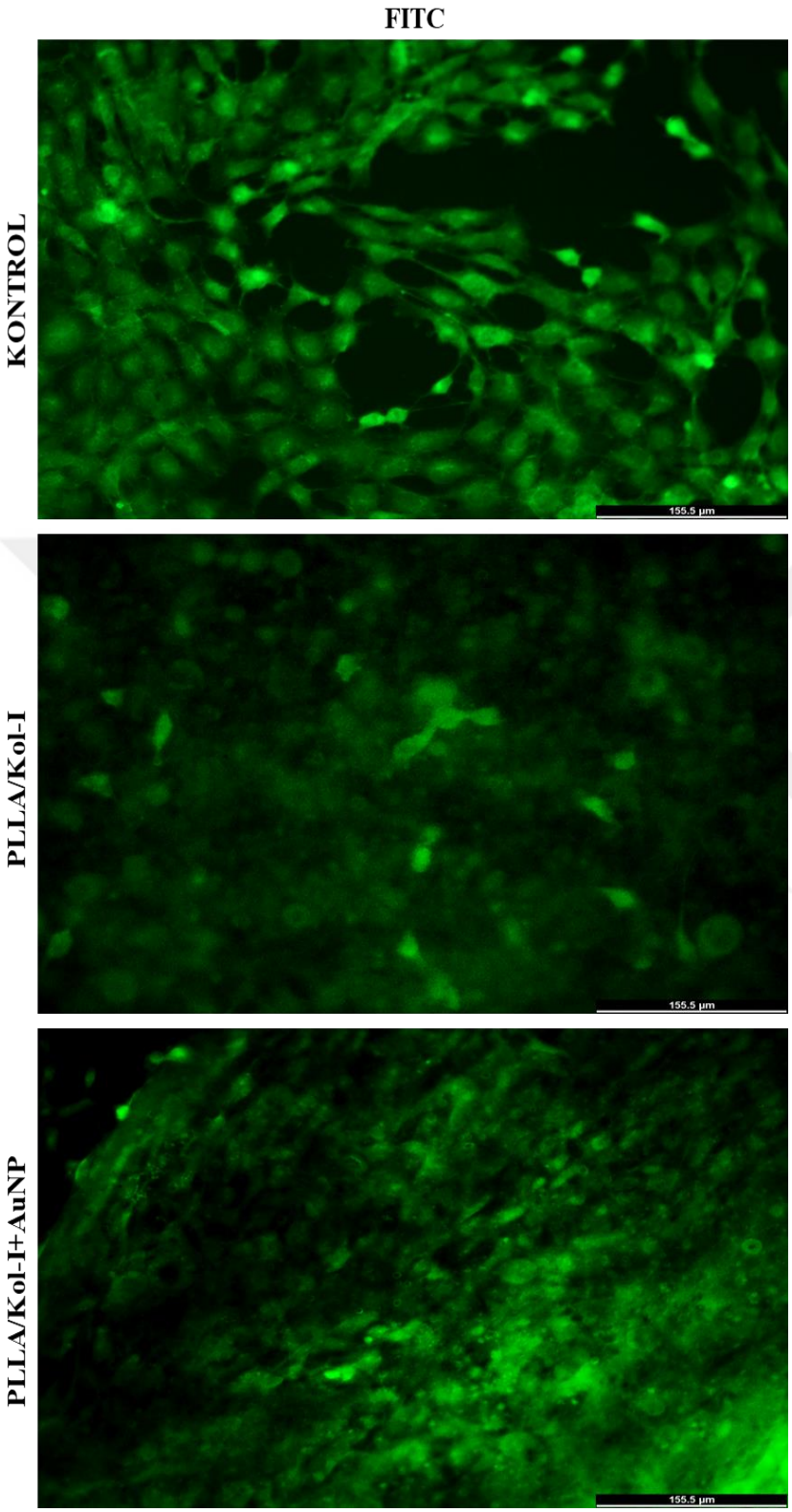
Bu grafik ile deneyin düzgün ilerlediği ve kontrolde normal bir artış olduğu görülmektedir. Tüm deney üç kere tekrarlanmıştır. Verilerin ortalamaları alınarak grafik oluşturulmuştur. Tek-yönlü ANOVA analizi yapıldıktan sonra gruplar arasındaki farkları belirlemek için t-test yapılmıştır. P <0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. 1.günde sadece PLLA/Kol-I+AuNP+EGF olan örnek kontrole göre anlamlı şekilde düşüktür. 3.günde ise sadece PLLA/Kol-I olan örnekte kontrole göre anlamlı şekilde düşüş yaşanmıştır. Tüm örneklerde hücre canlılığı oranları 1.günden 7.güne artış göstermiştir. Kontrol grubunun hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilmiştir. Bu durumda, en yüksek hücre canlılığı oranı 7.gün sonunda PLLA/Kol-I+AuNP+EGF örneğinde %108,3 olarak hesaplanmıştır.

4.10. İMMÜNOFLORESAN BOYAMA

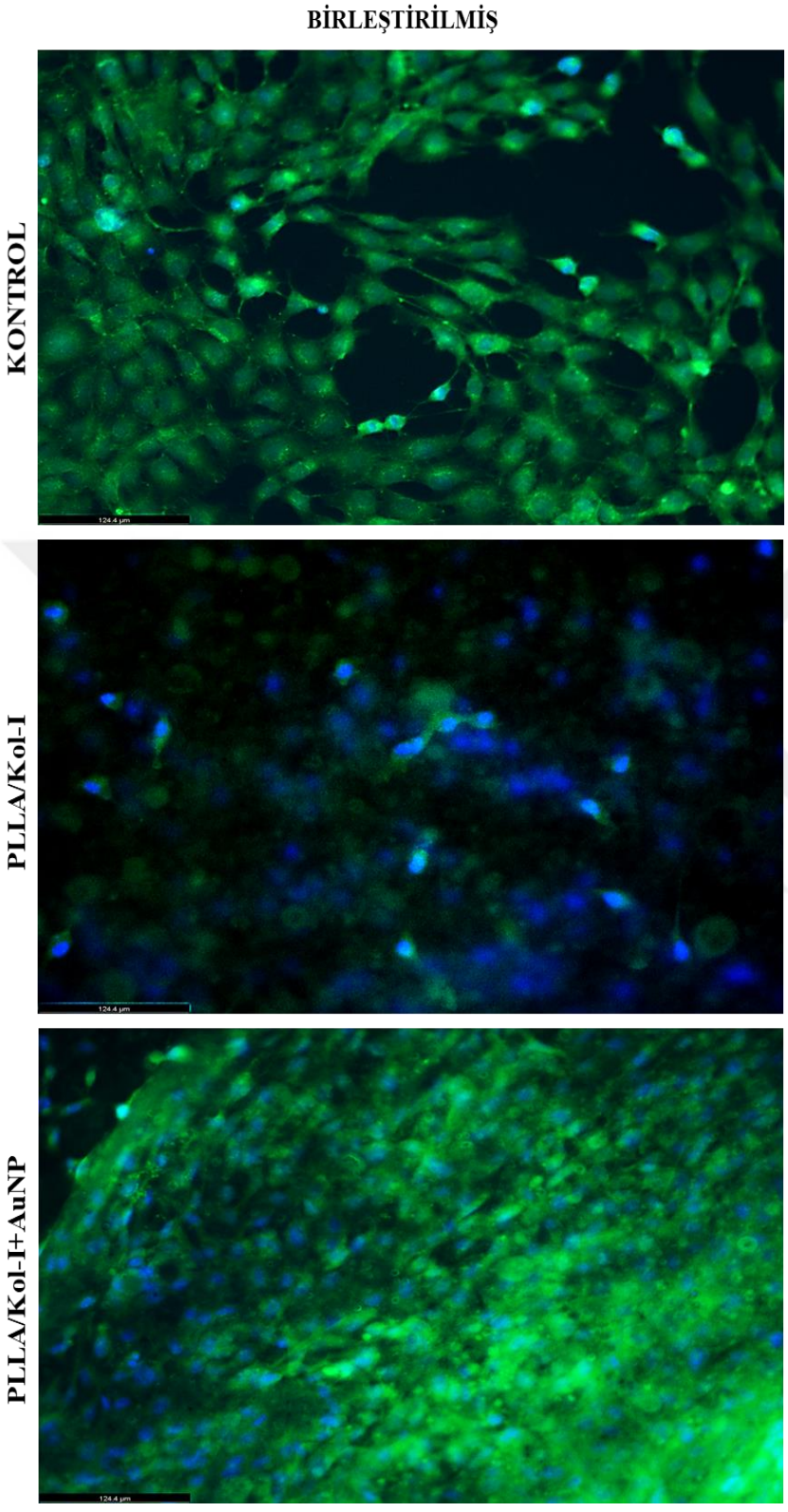
PLLA/Kol-I, PLLA/Kol-I+AuNP, PLLA/Kol-I+AuNP+EGF ve kontrol grubuna immünofloresans boyama yapılmıştır. DAPI görüntüleri Resim 4.17'de, FITC görüntüleri Resim 4.18'de, birleştirilmiş görüntüler Resim 4.19'da gösterilmiştir. Hücrelerin varlığı net bir şekilde görülmüştür. PLLA/Kol-I ve PLLA/Kol-I+AuNP gruplarında hücre kültür plakası üzerine ekilmiş olan kontrol grubuna göre oldukça yoğun hücre popülasyonu gözlemlenmiştir.



Resim 4.17: Kontrol, PLLA/Kol-I ve PLLA/Kol-I+AuNP örneklerindeki hücrelerin floresan görüntüleri, mavi (DAPI). Gösterge çubuğu: 155,5 µm

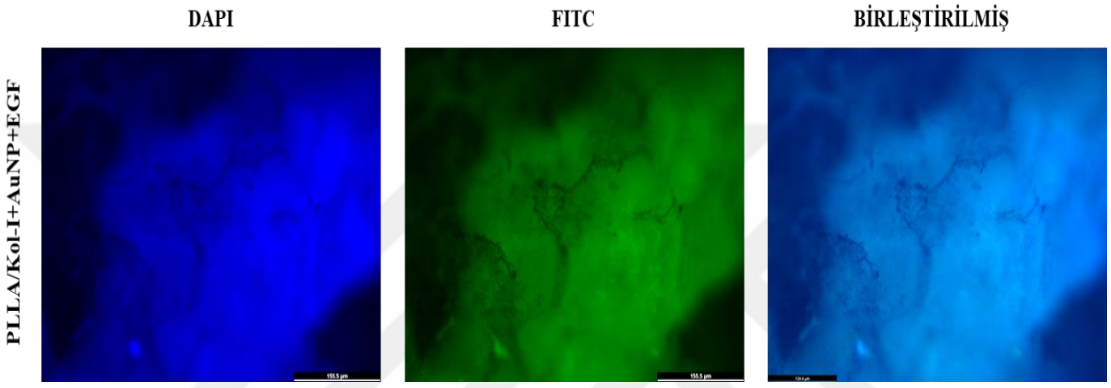


Resim 4.18: Kontrol, PLLA/Kol-I ve PLLA/Kol-I+AuNP örneklerindeki hücrelerin floresan görüntüleri, yeşil (FITC). Gösterge çubuğu: 155,5 µm



Resim 4.19: Kontrol, PLLA/Kol-I ve PLLA/Kol-I+AuNP örneklerindeki hücrelerin birleştirilmiş floresan görüntüleri, mavi (DAPI), yeşil (FITC). Gösterge çubuğu: 124,4 μm

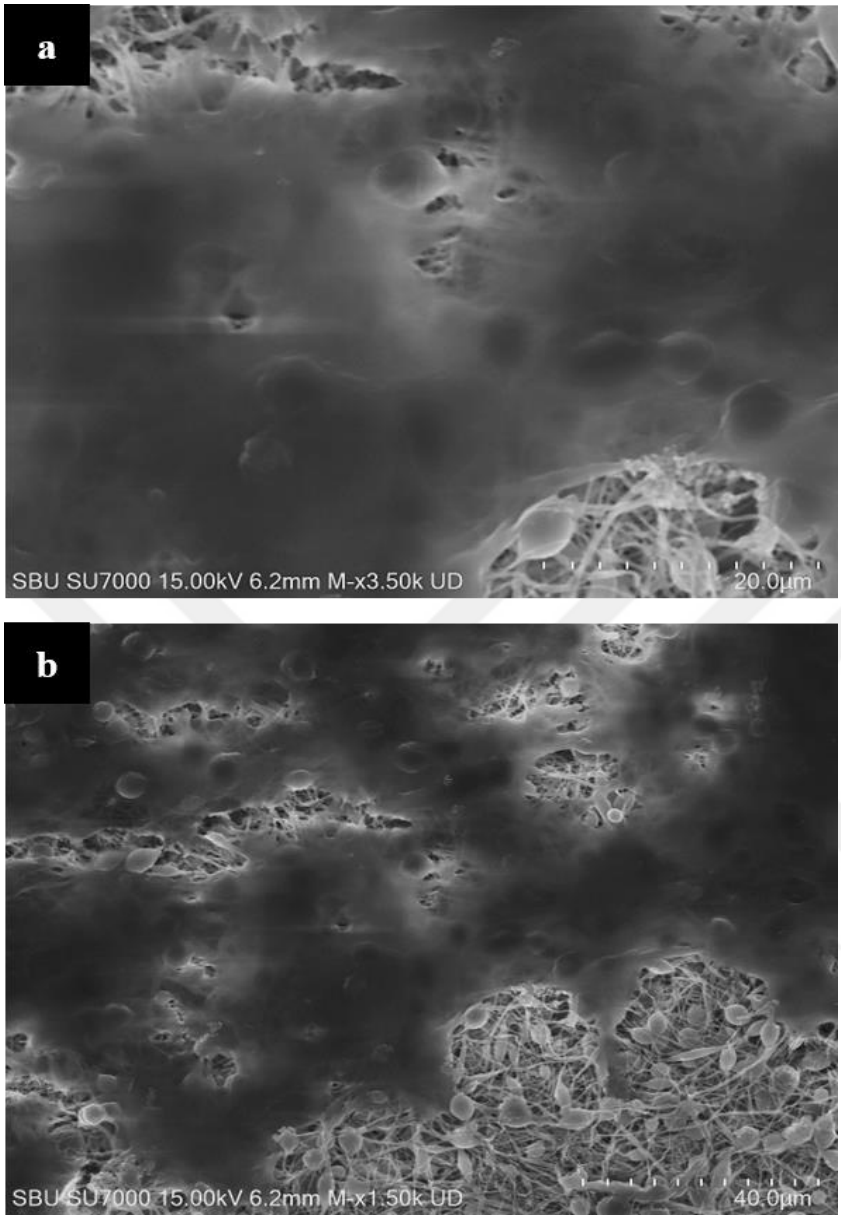
PLLA/Kol-I+AuNP+EGF örneğine ait floresan görüntüler ayrıca verilmiştir (Resim 4.20). EGF, numunelerin çekirdek kısmında bulunmaktadır. Floresan boyanın tüm fiberlerin içinde yayıldığından tüm numunenin otofloresan hale geldiği düşünülmüştür. Bu nedenle PrestoBlue testlerinde canlılıkları gösterilmiş olan hücrelerin varlığı fiber yapıdan ayırt edilememiştir. Diğer yandan, hücre canlılığının EGF bulunan örneklerde yüksek olması hücrelerin varlığını göstermektedir (Şekil 4.8).



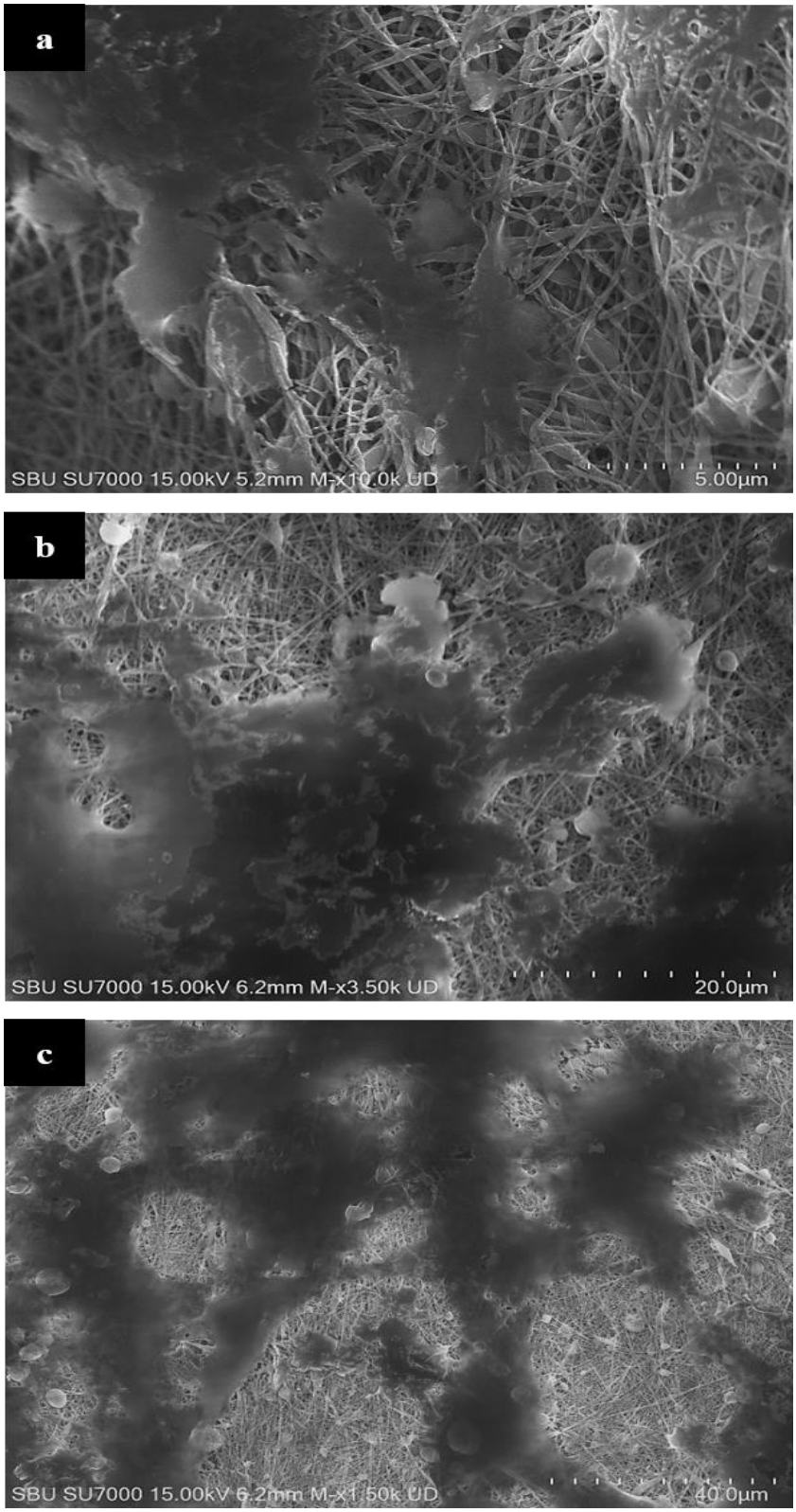
Resim 4.20: PLLA/Kol-I+AuNP+EGF örneğindeki hücrelerin floresan görüntüleri, mavi (DAPI), yeşil (FITC). Gösterge çubukları: 155,5 µm, 124,4 µm

4.11. HÜCRE YAYILMASI VE MORFOLOJİSİ

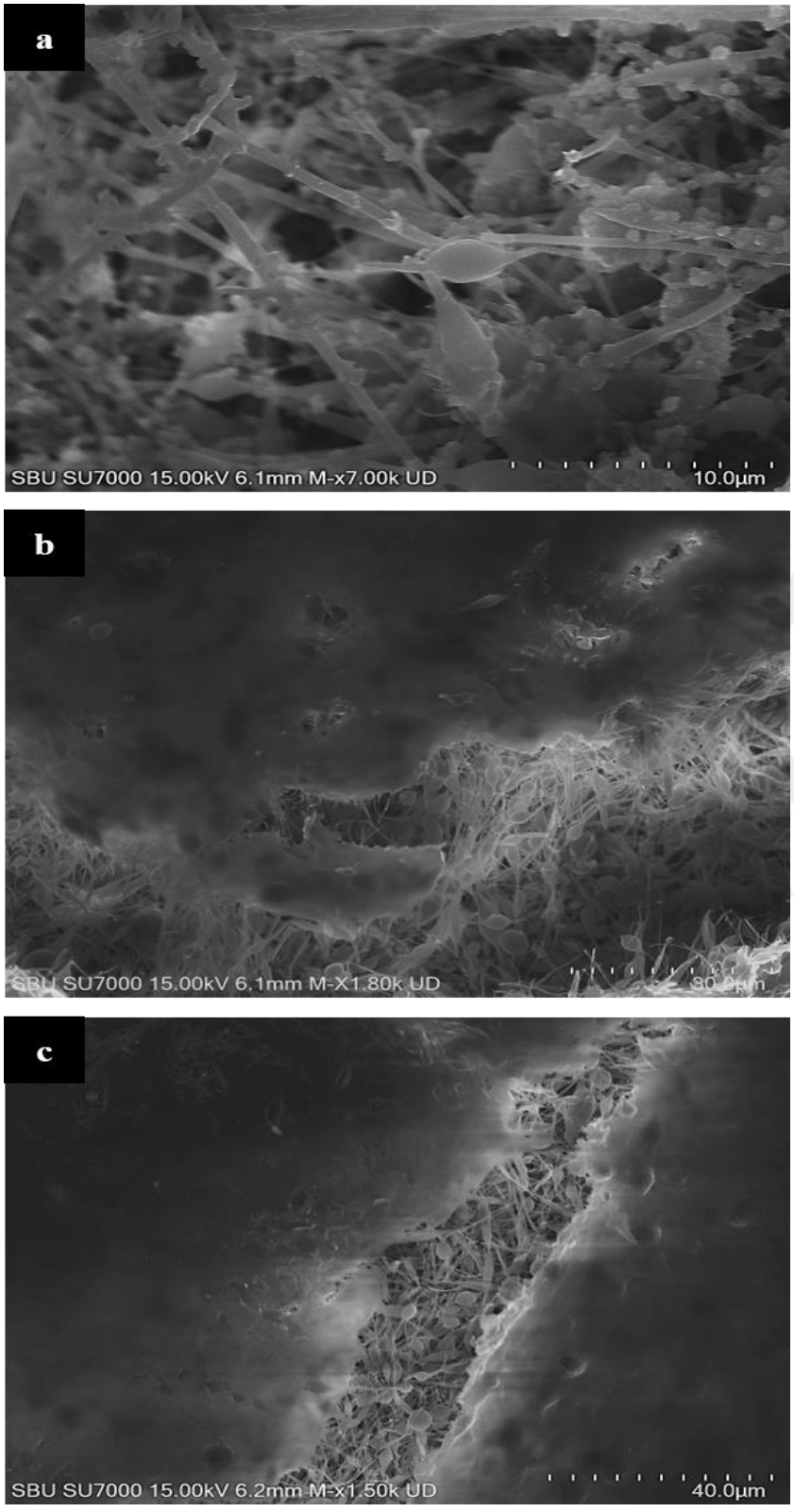
PLLA, PLLA/Kol-I, PLLA/Kol-I+AuNP ve PLLA/Kol-I+AuNP+EGF grupları, alkol ile dehidrasyon işlemi ardından tamamen kurutulduktan ve ultra ince (5nm) altın/paladyum bir tabaka püskürtmesiyle (sputter coater ile) kaplandıktan sonra SEM ile görüntülenmiştir. Hücrelerin bu yüzeyler üzerinde büyümesi, yayılması ve yüzeye tutunarak büyümeye devam ettikleri sırasıyla Resim 4.21'de, Resim 4.22'de, Resim 4.23'te ve Resim 4.24'te görülmektedir.



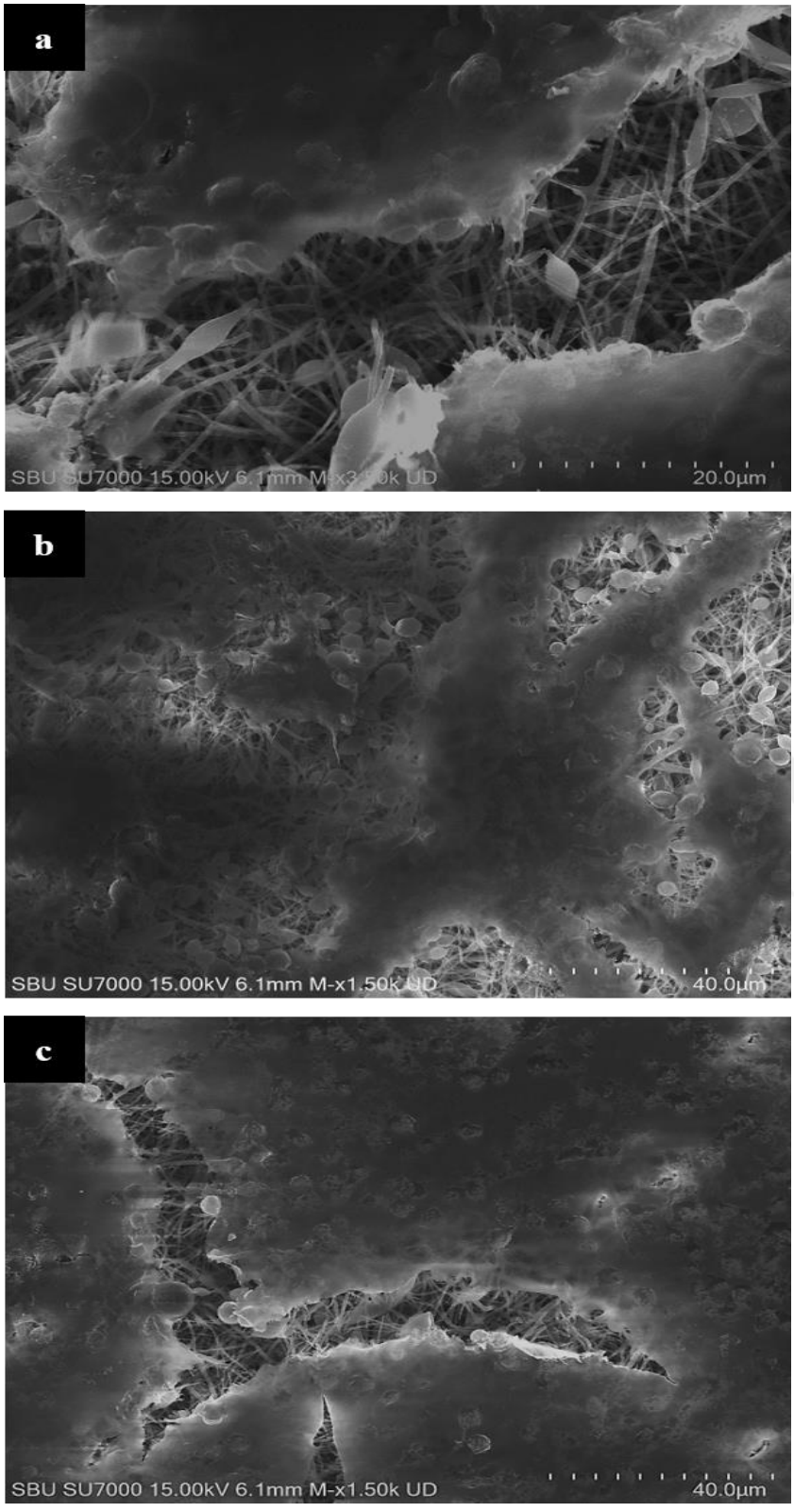
Resim 4.21: PLLA fiberleri üzerinde büyüyen ve yayılan NIH/3T3 hücrelerinin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: a)20 µm, b)40 µm



Resim 4.22: PLLA/Kol-I fiberleri üzerinde büyüyen ve yayılan NIH/3T3 hücrelerinin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: a)5 µm, b)20 µm, c)40 µm



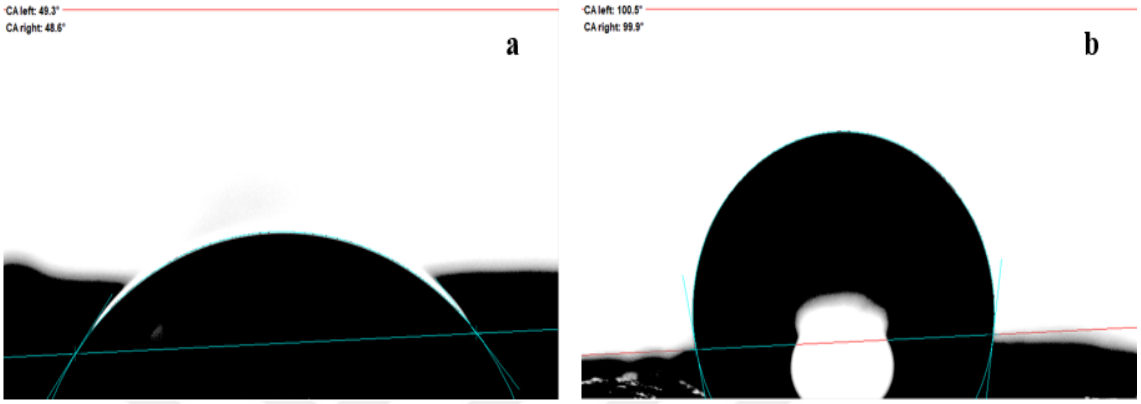
Resim 4.23: PLLA/Kol-I+AuNP fiberleri üzerinde büyüyen ve yayılan NIH/3T3 hücrelerinin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: a)10 µm, b)30 µm, c)40 µm



Resim 4.24: PLLA/Kol-I+AuNP+EGF fiberleri üzerinde büyüyen ve yayılan NIH/3T3 hücrelerinin SEM görüntüleri. Gösterge çubukları: a)20 µm, b-c)40 µm

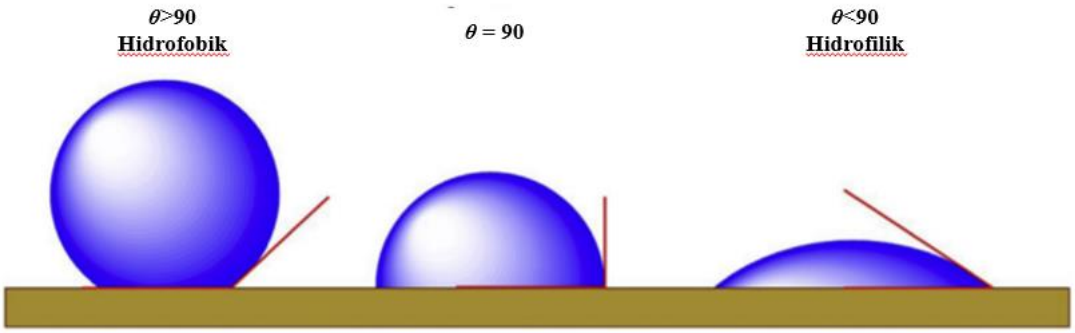
4.12. YÜZEY TEMAS AÇISI TESTİ

PLLA/Kol-I ve PLLA/Kol-I+AuNP+EGF numuneleri üzerine yüzey temas açısı ölçüm cihazı kullanılarak 5'er µl su damlatıldıktan sonra durağan damla görüntüsü alınmıştır. Resim 4.25'te yüzey temas açıları verilmiştir.



Resim 4.25: Yüzey temas açıları (a) PLLA/Kol-I, (b) PLLA/Kol-I+AuNP+EGF

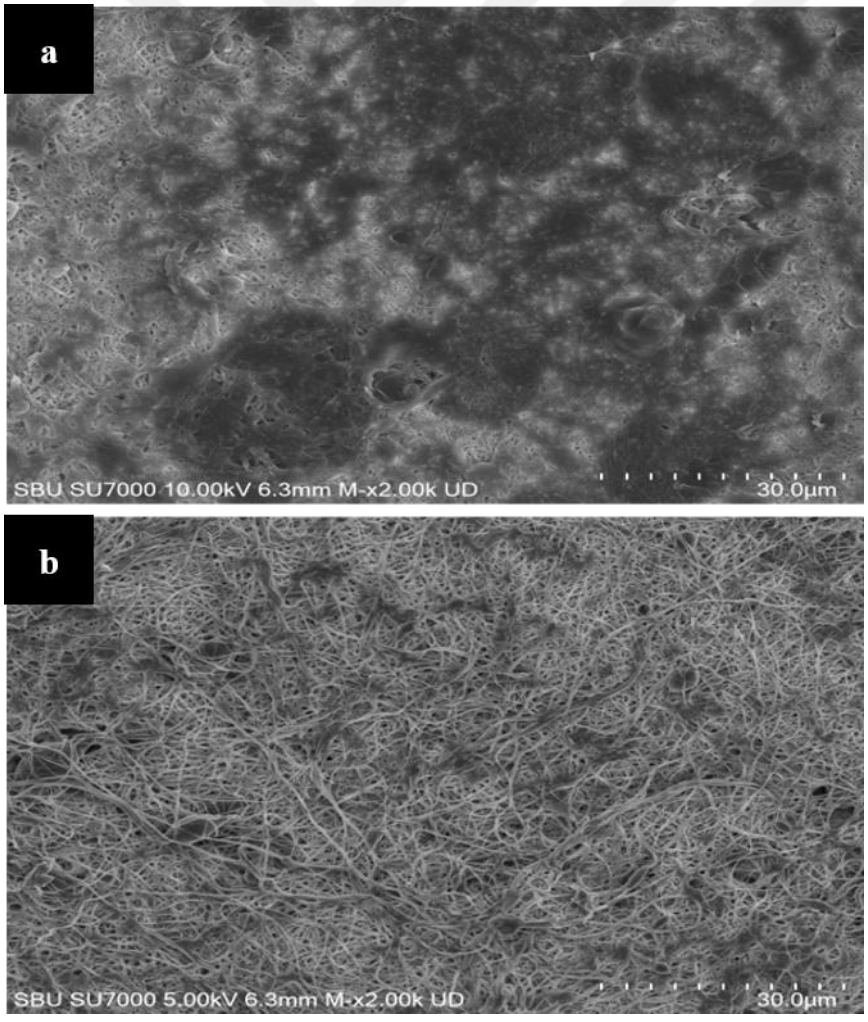
PLLA/Kol-I numunesinin yüzey temas açısı iki yönden yaklaşık 49°, PLLA/Kol-I+AuNP+EGF numunesinin yüzey temas açısı ise iki yönden ortalama 100° olarak ölçülmüştür. Bu ölçümler sonucunda Şekil 4.9'daki bilgilere göre, PLLA/Kol-I numunesinin hidrofilik olduğu PLLA/Kol-I+AuNP+ EGF numunesinin ise hidrofobik olduğu görülmüştür.



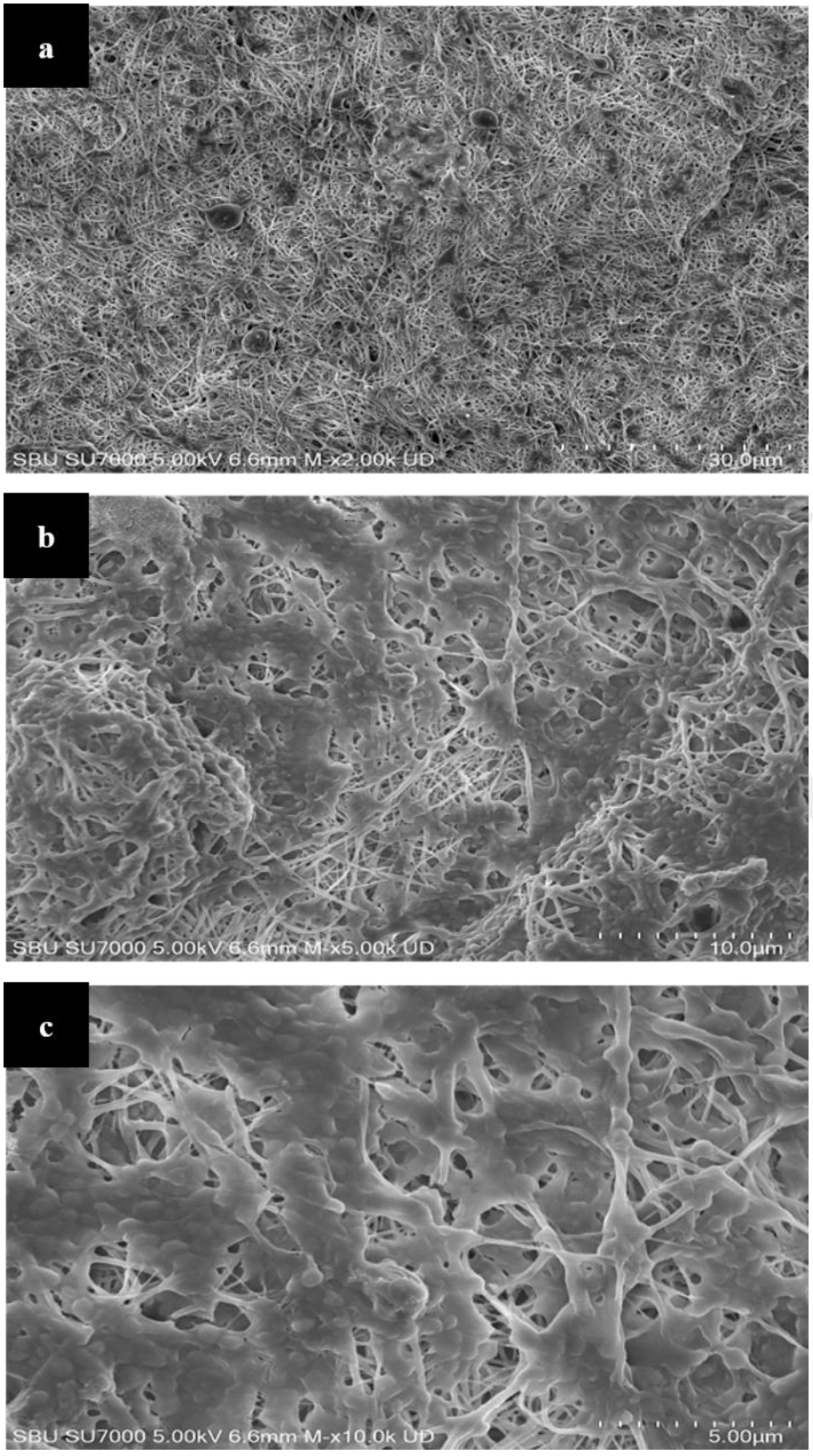
Şekil 4.9: Temas açısının hidrofiliklik ve hidrofobiklik analizi üzerindeki etkisi (160)

4.13. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE TESTİ

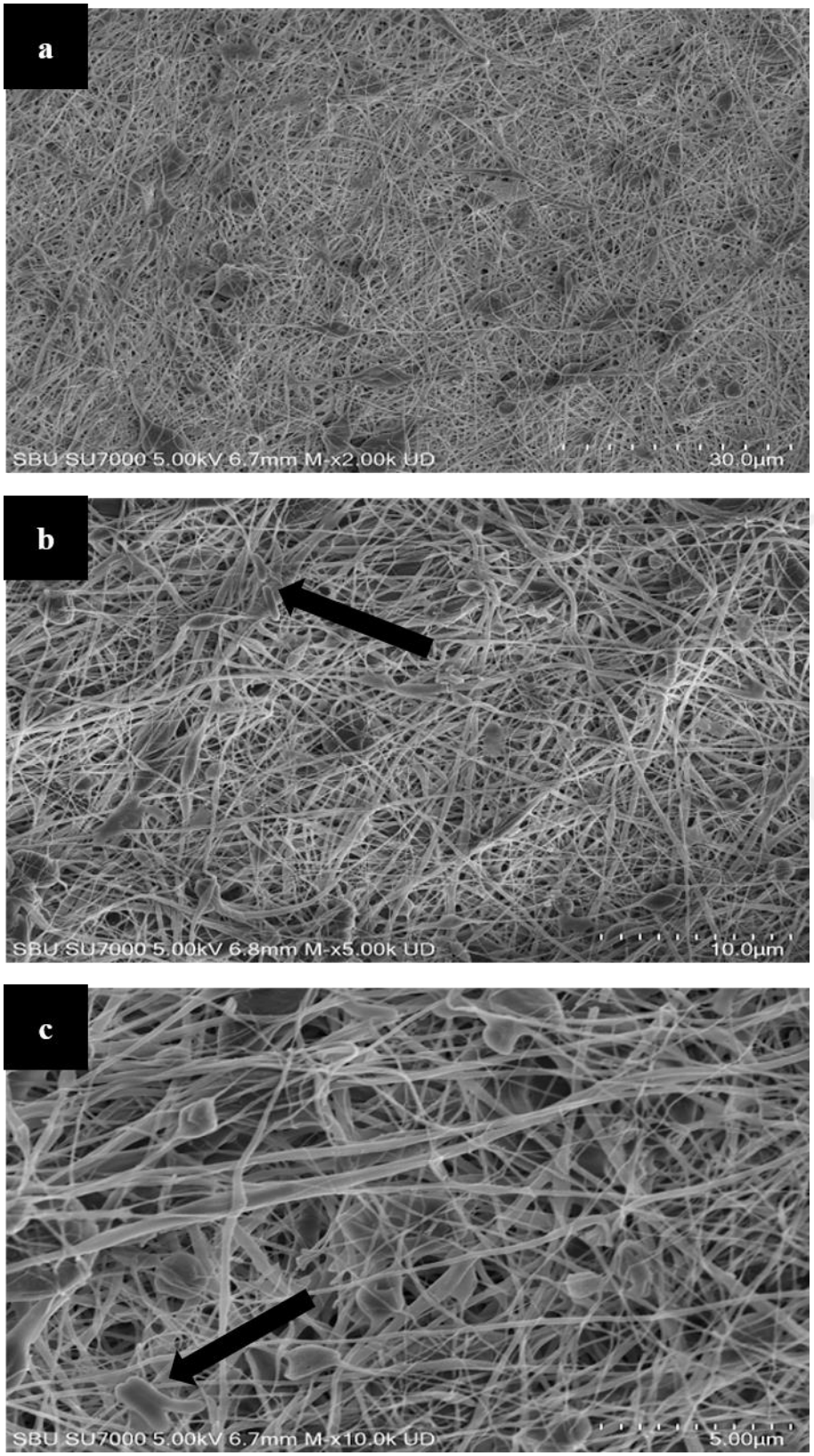
Bakteri kültür çalışmalarında PLLA/Kol-I ve PLLA/Kol-I+AuNP grupları, alkol ile dehidrasyon işleminden sonra tamamen kurutulduktan ve ultra ince (5nm) altın/paladyum bir tabaka püskürtmesiyle kaplandıktan sonra SEM ile görüntülenmiştir. Resim 4.26'da PLLA/Kol-I ve PLLA/Kol-I+AuNP üzerindeki *E.coli* bakterisinin karşılaştırmalı SEM görüntüleri gösterilmiştir. Resim 4.26(a)'da fiber üzerindeki koyu renkli alanlarla belirli olan *E.coli* bakteri tutunumunun, PLLA/Kol-I+AuNP üzerinde yapılan taramada oldukça az olduğu açıkça görülmektedir. Resim 4.27'de PLLA/Kol-I üzerindeki *S.aureus* bakterisinin, Resim 4.28'de ve Resim 4.29'da ise altın nanoparçacık içeren PLLA/Kol-I+AuNP örnekler üzerindeki *E.coli* ve *S.aureus* bakterilerinin SEM görüntüleri sırasıyla verilmiştir.



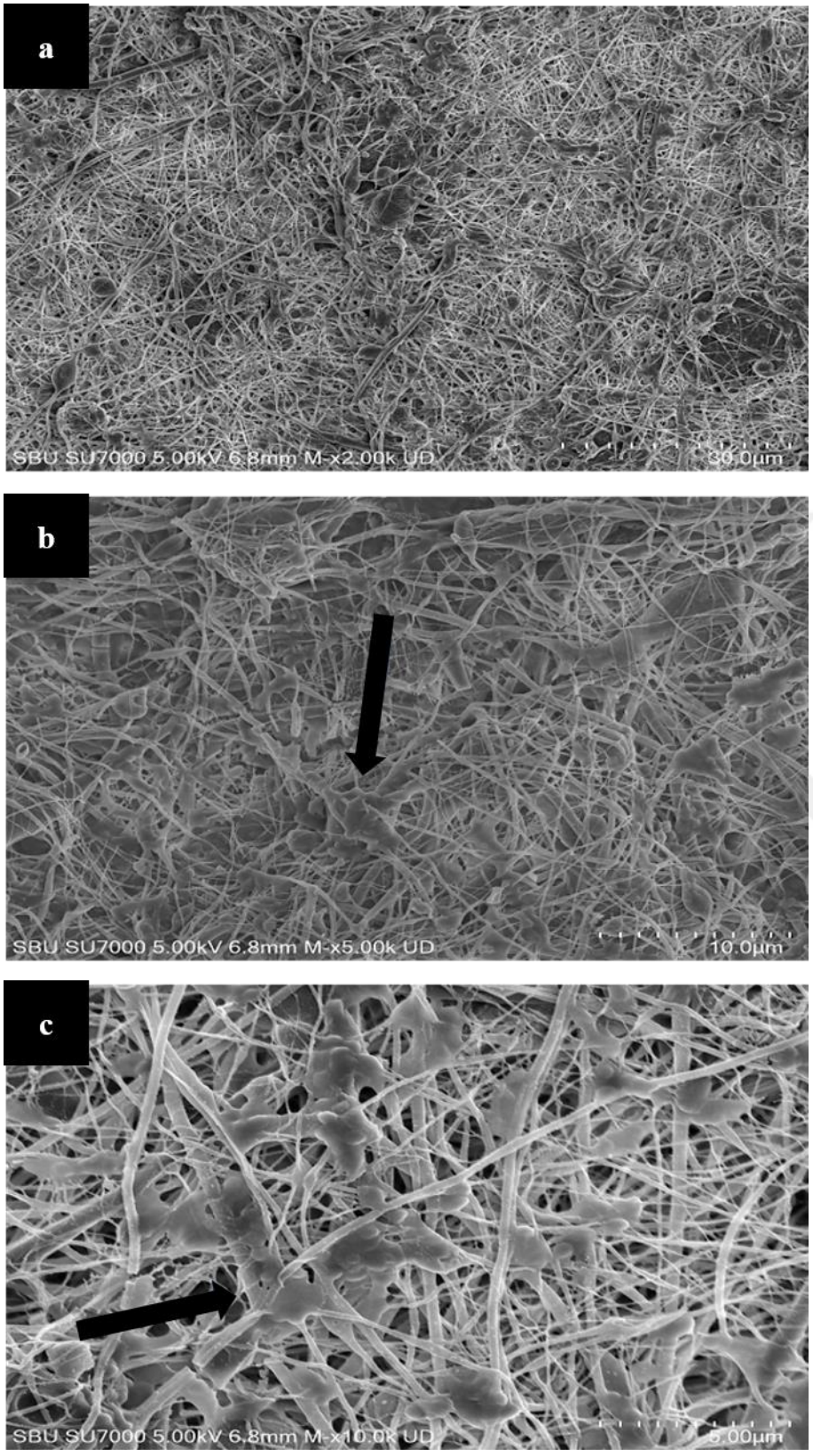
Resim 4.26: (a) PLLA/Kol-I ve (b) PLLA/Kol-I+AuNP üzerindeki *E.coli* bakterisinin karşılaştırmalı SEM görüntüleri. Fiberler üzerindeki koyu renkli alanlar bakteri hücrelerinin bulunduğu alanları göstermektedir. Büyütmeler; 2000×



Resim 4.27: PLLA/Kol-I numunesi üzerindeki *S.aureus* bakterisinin SEM görüntüleri. Fiberler üzerindeki koyu renkli alanlar bakteri hücrelerinin bulunduğu alanları göstermektedir. Büyütmeler (a) 2000×; (b) 5000×; (c) 10000×



Resim 4.28: PLLA/Kol-I+AuNP numunesi üzerindeki *E.coli* bakterisinin SEM görüntüleri. Bakteri hücreleri siyah ok ile işaretlenmiştir. Büyütmeler (a) 2000×; (b) 5000×; (c) 10000×



Resim 4.29: PLLA/Kol-I+AuNP numunesi üzerindeki *S.aureus* bakterisinin SEM görüntüleri. Bakteri hücreleri siyah ok ile işaretlenmiştir. Büyütmeler (a) 2000×; (b) 5000×; (c) 10000×

Resim 4.26'da verilen örneklerdeki *E.coli* bakterisinin karşılaştırılmasıyla PLLA/Kol-I+AuNP fiberlerindeki bakteri tutunmasının PLLA/Kol-I fiberlerine göre oldukça az olduğu görülmektedir.

Resim 4.27'de görüldüğü gibi sadece PLLA/Kol-I fiberlerden oluşan ve altın nanoparçacık içermeyen örneklerde *S.aureus* bakterisi oldukça fazla çoğalma ve yayılım göstermiştir. Burada fiber yapıda artan yüzey alanı da bakteri tutunumu açısından etkilidir. Altın nanoparçacıkların eklendiği PLLA/Kol-I+AuNP numunelerinde Resim 4.28'de ve Resim 4.29'da gösterildiği gibi bakterilerin fiberlere tutulumu, büyümesi ve yayılması fazlasıyla engellenmiştir. SEM ile yapılan yüzey taramalarında yaygın koloniler yerine az sayıda nadir rastlanan bakteri hücrelerine rastlanmış, bu bakterilerin alınan SEM mikrografilerine dahil edilebilmesi için çaba gösterilerek tüm numune yüzeyi çalışılmıştır. SEM görüntülerinde bakteri hücreleri yaygın olmadığından, okla işaretlenmiştir, örneğin Resim 4.28(c) ve Resim 4.29(c). Ancak, sonuçların niceliksel olarak ifade edilmesi ve istatistiksel olarak karşılaştırılabilmesi için, özellikle kültürlemeden sonra yüzeyden kaldırılan bakteri hücrelerinin, örneğin spektrofotometrik yöntemlerle, sayımının yapılarak karşılaştırılması gelecek çalışmalarda ele alınabilecek bir konudur.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, deri doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere koaksiyel olarak üretilen antibakteriyel özellikteki Au nanoparçacık kaplı ve EGF içeren PLLA/Kol-I yara örtüsünün özellikleri analiz edilmiştir.

Kolajen, biyomimetik malzemeler içinde en bol bulunan biyopolimerlerden biridir. Tüm vücut protein içeriğinin yaklaşık %25-35'ini oluşturan memelilerin birçok bağ dokusunun hücre dışı matrislerinde mevcuttur (179). Kolajenin doğal dokuya mekanik stabilite, güç ve elastikiyet sağladığı ve biyolojideki ana yapısal materyal olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (180). Kolajenin zayıf immünojenisitesi vardır. Kolajen fiberlerin implantasyonunun konakçı immün yanıtını aktive etmesi muhtemel değildir yüksek biyouyumluluğa sahiptir. Bu nedenle, kolajen nanofibröz iskele çoğu vücut dokusunun mühendisliği için uygundur (65). Ancak, saf kolajenden elde edilen fiber yapıdaki doku iskelelerinin mekanik dayanımı zayıftır. Bu nedenle kolajen, kompozit mikro/nano-fiberlerin üretilmesi için eğirme çözeltisi hazırlığı sırasında normal olarak sentetik polimerler ile karıştırılmıştır. Diğer polimerlerin eklenmesi, kompozit fiberlerin morfolojisini, mekanik ve biyolojik özelliklerini değiştirmeye yardımcı olur (181). Çekirdek-kabuk yapılı fiberler üreten koaksiyel elektroeğirme, kompozit kolajen lifleri üretmenin başka bir yöntemidir. Kolajen, iç (çekirdek) veya dış (kabuk) katman olarak elektroeğrilebilmektedir (73, 74). Powell ve ark., dondurularak kurutulmuş ve elektroeğrilmiş kolajen fiberlerin yara iyileşme potansiyelini karşılaştırmış ve her iki iskelenin, hava-sıvı arayüzünde insan epidermal keratinositleri ve dermal fibroblastlar ile kültürlendiğinde *in vitro* olarak keratinize epidermal tabaka ve katmanlı dermal tabaka oluşumunu desteklediğini bulmuştur (182). PLGA/kolajenden yapılan nanofibröz membranların insan fibroblastlarındaki yanıtlarda fonksiyonel olarak aktif olduğu ve erken evre yara iyileşmesinde yara iyileşmesini hızlandırıcı olarak çok etkili olduğu bulunmuştur (68). Farelerde yapılan bir çalışmada, elektroeğrilmiş kolajen-elastin-PCL iskeleleri keratinosit ve fibroblast proliferasyonunu, doku entegrasyonunu ve hızlandırılmış erken evre anjiyogenezini desteklemiştir. Deri altı implantasyondan sonraki ilk 2 hafta içinde sadece hafif bir inflamatuar yanıt gözlenmiştir (59). 2006 yılında Rho ve ark., ilk kez yara örtüsü olarak kullanılmak üzere bir kolajen nanofibröz matris üretmiştir.

Yapılan deney sonuçlarına göre, bu matrisin iyi bir gerilme mukavemeti (≈7 MPa), yüksek gözeneklilik ve yüksek yüzey alanı / hacim oranı ve ayrıca hücre yapışması, büyümesi ve çoğalması için gerekli özellikleri gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, *in vivo* analizler, kolajen nanofibröz membranların iyileşme sürecini geliştirebildiğini göstermektedir (105). Kolajen, yüksek biyouyumluluğa sahip olduğundan ve hücre dışı matris bileşeni olduğundan yara örtümüzde tercih edilmiştir.

PLLA, sentetik, biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen bir polimerdir. PLLA'nın benzersiz fizyokimyasal ve biyostimülatör özellikleri, onu diğer mevcut tedavilerden ayırır ve optimum sonuçlar için gereken benzersiz tedavi metodolojisinin temelini oluşturur (183). Lu ve ark.'nin bir çalışmasında, PLLA-kolajen ve PLLA-jelatin hibrit yapı iskeletlerinin dermal doku ve epidermisin yenilenmesini desteklediğini ve yeni doku oluşumu sırasında kasılmayı azalttığını göstermiştir. Bu sonuçlar, huni benzeri hibrit yapı iskeletlerinin deri dokusu rejenerasyonu için kullanılabileceğini göstermektedir (72). Kurpinski ve ark., PLLA fibröz malzeme morfolojisinin endotel hücrelerinin mat içine göçü üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Hizalanmış fiberlerin endotel hücrelerinin iskelelere sızmasını teşvik ettiğini bulmuşlardır (108). Yang ve ark., rapamisin yüklü PLLA gözenekli iskeleler üretmiştir ve rapamisinin salım süresini incelemişlerdir. Gözenekli PLLA yapı iskelelerindeki rapamisinin bariz bir şekilde sürdürülen salım etkisinin 20 güne kadar sürdüğü gösterilmiştir (184). Başka bir çalışmada, biyolojik olarak parçalanabilen çekirdek/kabuk yapılı PLLA/kitosan fiberler koaksiyel elektroeğirme ile üretilmiştir. PLLA/kitosan fiberleri, doku mühendisliğinde ilaç taşıyıcı olarak kullanılan PLLA'dan daha yüksek kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir (185). Gu ve ark., elektroeğrilmiş ağları üretmek için bir PLA ve jelatin karışımı kullanmıştır. Bu membranlar, dehidrasyondan kaçınmak için gerekli olan yaralardaki su kaybını azaltabilmiştir. Ayrıca, dermal fibroblastlar, bu zarların üstüne ekildikten sonra en az 4 gün boyunca yaşayabilir (105). Koaksiyel elektroeğirme ile üretilmiş çekirdek/kabuk poli(vinil pirolidon) (PVP)/PLA ultra ince fiberlerin doku rejenerasyonu için biyoaktif moleküllerin yüklenmesinde potansiyel olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (186). PLLA'nın biyouyumlu olması ve kolajenden daha iyi mekanik özelliklere sahip olması nedeniyle yara örtümüzde kullanılmıştır.

McCann ve diğ., çözücülerin karışmazlığının koaksiyel mikro/nano-fiberlerin oluşumu için kritik olduğunu iddia etmişlerdir (187). Bununla birlikte, birkaç araştırma grubu, çekirdek ve kabuk için karışabilir veya aynı bir çözücü kullanılarak koaksiyel mikro/nano-fiberlerin üretimini tanımlamıştır (188). Koaksiyel olarak elektroeğrilmiş fiberlerin, gen, ilaç ve biyoaktif molekül taşınmasında ve sensörlerde faydalı olduğu gösterilmiştir (189). Koaksiyel elektroeğirme işleminin tipik yaklaşımı, kabukta iyi bir şekilde elektroeğrilebilir polimer kullanılarak çekirdek içinde daha az elektroeğrilebilir çözeltilerden fiber oluşumunu mümkün kılmaktır (190). Koaksiyel elektroeğirme, hücrelerin belirli yüzey kimyası ile etkileşime girdiği sürekli biyolojik olarak aktif bir kabuğu korurken iskelenin mekanik özelliklerini değiştirme yeteneği sunar (191). Koaksiyel elektroeğirmesi, esas olarak salım sürelerinin uzaması nedeniyle ilaç molekülleri için kullanılır. Koaksiyel elektroeğirmesinin, karışım elektroeğirmesi ile karşılaştırıldığında daha uzun süreli salınım ve azaltılmış patlama sağladığı gösterilmiştir (192, 193). Özellikle, tek bir adımda farklı malzemelerden çok sayıda çekirdek-kabuk katmanları ile fiberler oluşturan koaksiyel elektroeğirmesi, doğada bulunmayan özelliklerin bir fiber olarak tek bir malzemede birleştirilmesini sağlar (194). Koaksiyel elektroeğirmenin jet stabilitesi ve fiber morfolojisi yalnızca işlemden, çözücüden ve çevresel parametrelerden değil, aynı zamanda çözücü karışabilirliğinden de etkilenir. Bununla birlikte, çelişkili sonuçlar bildirildiği için çözücü karışabilirliğinin rolü hala net bir şekilde açıklanamamıştır (65). Doğal polimerler, biyolojik uyumluluk, toksik olmama, biyolojik olarak parçalanabilirlik, antibakteriyel ve onları biyomedikal uygulama için uygun kılan olumlu mekanik yapı dahil olmak üzere çok çeşitli avantajlar sunar (195). Bu arada, sentetik polimerler, işlevleri ve özellikleri sentez sırasında yara gereksinimlerine uyacak şekilde formüle edilip modifiye edilebildiğinden, yara örtüleri olarak bir avantaja sahiptir. Öte yandan, mikro/nano-fiberlerin elektroeğirmesi için karışık polimerlerin en yüksek başarı oranına sahip olduğu görülmüştür (196). Bir çalışmada, PCL, mekanik mukavemet sağlamak için fiberin çekirdeği olarak, iyi biyouyumluluğundan yararlanmak için kolajen ise fiberin kabuğu olarak üretilmiştir. Sonuç olarak, nanofibröz yara örtüsü, yara iyileşmesine fayda sağlamak için çok sayıda işleve sahip bulunmuştur ve klinik uygulama için umut verici bir potansiyel göstermektedir (197). Alharbi ve ark., koaksiyel PLA/PVA matlarının, iyi bir hücre bağlanma ve proliferasyon özellikleri gösterdiğini

bulmuşlardır. Bu matlar, gelişmiş yüzey ıslatma ve mekanik özellikler sergilemiştir (198). PU çekirdek ve kolajen kabuklu çekirdek-kabuk fiberleri hem gelişmiş mekanik özellikler (kolajen fiberlere kıyasla) hem de yalnızca kolajene göre daha yüksek hücre proliferasyonu sonuçları göstermiştir (74). Maleki ve ark., tetrasiklin hidroklorid yüklü PLGA çekirdek-kabuk nanofiberlerin (koaksiyal bir elektroeğirme sistemiyle üretilen), sürekli ilaç salımı için harman fiberleriyle (aynı malzemelerle hazırlanan) karşılaştırmıştır ve çekirdek-kabuk nanoyapıları daha iyi sonuçlar vermiştir (105). Zahedi ve ark., aloe vera özütleri, koaksiyel elektroeğirme tekniği kullanılarak kitosan, polikaprolakton ve keratin içeren polimer fiberler içinde kapsüllenmiştir. Sonucunda, tıbbi bitkiler içeren hazırlanmış çekirdek-kabuk fiberli matların, yara iyileştirme uygulamaları için büyük bir potansiyele sahip olduğu görülmüştür (199). Çok sayıda işlevsel ve yapısal katmana sahip yapı iskelesi imalatı, doku mühendisliği için yeni bir yaklaşım sağlayabilmektedir (200). Tip I kolajen ve PLLA'nın elektroeğirme ile uygulaması, doku mühendisliği, yara örtüsü ve ilaç dağıtımında uygulanabilecek harmanlanmış mikro/nano-fiber iskeleler üretmeyi sağlar (201). Salehi ve ark., deri doku mühendisliği uygulamaları için kitosan kaplı bir katman kullanarak sürekli salımlı aloe vera (AV) jeli ile bir nanofibröz PLLA/kolajen iskelesi üretmiştir. Deri doku mühendisliği için istenen bir yapı iskelesi olarak düşünülebileceğini bildirmişlerdir (28). Doğada bulunmayan özelliklerin bir fiber olarak tek bir malzemede birleştirilmesini sağlamak amacıyla PLLA ve kolajen tip I, yara örtümüzü oluşturmak için koaksiyel olarak eğrilmiştir.

Fiber morfolojisi, tipik olarak çözeltinin kendine özgü özelliklerine (örneğin, polimer, konsantrasyon, iletkenlik, polarite, çözücünün yüzey gerilimi), işleme koşullarına (ör. uygulanan voltaj, toplayıcı, akış hızı) ve çevresel koşullara (örn. nem, sıcaklık) bağlıdır. Fiber morfolojisine katkıda bulunan parametrelerin sayısı göz önüne alındığında, teknik, çeşitli kurulum modifikasyonları yoluyla fiber geometrisini, toplama ve oryantasyonu değiştirme yeteneği ile son derece ayarlanabilir bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır (202). Mikro/nanometre ölçeğinde fiber çaplarına sahip fiberli yapı iskelelerinin doku mühendisliği için tatmin edici olduğu görüldüğünden, bu fiberli yapıların üretimi için süreçler geliştirmeye yönelik kapsamlı araştırmalar sürdürülmektedir (53). Bu tez çalışmasında düzgün ve homojen mikro/nano fiberler elde etmek için yapılan denemeler sonucunda en iyi elektroeğirme parametreleri 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı olarak

bulunmuştur. Çözelti polimerleri ise %15 PLLA ve %4 kolajen konsantrasyonlarında en iyi üretimi sağlamıştır.

Hızlı şişme davranışı, hidrofilik malzemelerin karakteristik özelliğidir (161). Sıvı, fiberler tarafından emildiğinde sonuç olarak fiberler şişer. Fiber şişme üzerine genişledikçe, fiberler arasındaki serbest boşluklar kapanır ve yara eksüdalarındaki bakteriler daha sonra hareketsiz hale getirilir. Bu, bakterilerin çoğalmasını önlemeye ve yara enfeksiyonunu azaltmaya yardımcı olabilir (203). İkincisi, sıvı kılcal kuvvetler tarafından fiberler arasında tutulursa, fiber yapısı boyunca kolayca hareket edebilir. Klinik olarak bu, yara eksüdalarının yaralı bölgeden yara örtüsünün altındaki sağlıklı derilere yayılması anlamına gelir. İdeal olarak, yara örtüleri büyük miktarda eksüdayı emebilmeli ve fiber yapısı içindeki sıvıyı içermelidir (166, 203). PBS içerisinde yapılan şişme testinde PLLA/Kol-I yara örtüsü numunelerinde en yüksek şişme oranı %148 olarak hesaplanmıştır. Yaradan eksüdanın emilmesine yardımcı olacak bir oran elde edilmiştir.

Polimerlerin yavaş bozunma hızı (tam bozulma için birkaç haftadan aya kadar), deri yaralarının tedavisi için potansiyel kullanımlarını sınırlar. Artmış degradasyon mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (204). Polimer degradasyonunun ilerlemesi, polimerin moleküler ağırlık düşüşünü belirleyerek, seçilen bir zaman aralığı içinde bir mikro terazide numunenin ağırlık kaybını ölçerek değerlendirilir (205). Proikakis ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada PLLA4-PEG45-PLLA4 hidrojelinin PBS içerisinde bozunmasını incelemişlerdir. 5.günden sonra hidrojelin ağırlığında hızlı bir düşüş gözlemlemişlerdir (206). Bu tez çalışmasında bozunma oranı 14.günden sonra artmıştır. Böylelikle yara iyileşmesi boyunca gereken süre PLLA/Kol-I yara örtüsü ile sağlanabilecektir.

Gelişmelere ve mevcut geniş yara örtüsü yelpazesine rağmen, bakteriyel enfeksiyona duyarlı olması nedeniyle yara yönetimi hala son derece zordur (207). Epitelizasyon için optimum bir mikro ortam ve sitotoksik faktörlerin yokluğu gereklidir. Zararı en aza indirme prensibi, yara pansuman seçiminde uygulanmalıdır. Gümüş bazlı pansumanlar hücre toksisitesi sergileyebilmektedir ve enfeksiyon olmadığında tercih edilmemelidir (208). Nanomalzemeler, geleneksel malzemelerin bilim ve teknolojinin tüm alanlarındaki çoğu uygulama ile yer değiştirilebileceği, umut verici ve verimli bir adaydır (209). Her biri farklı özelliklere ve spektrum

aktivitelerine sahip gümüş, altın ve çinko olmak üzere bazı metalürjik nanomalzemeler, bakterisit ve bakteriyostatik ajanlar olarak onaylanmıştır (210). AuNP'ler, moleküler problarla uygun yüzey biyokonjügasyonu ve dikkate değer optik ve immünolojik özellikleri nedeniyle nanobiyoteknoloji ve biyotıp alanında yeni bir platform olarak büyük ilgi görmektedir (211). AuNP'ler esas olarak tıbbi ve gen terapisinde, teşhis için biyosensörlerde büyük biyolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır ve AuNP'ler, gümüş nanoparçacıklar gibi diğer metalik nanomalzemelere kıyasla daha düşük toksisiteye sahip olabilirler (212). Küresel AuNP'ler boyut ve şekle bağlı optoelektronik özellikler, büyük yüzey/hacim oranı, mükemmel biyouyumluluk ve düşük toksisite gibi faydalı özelliklere sahiptir (213). Diğer faktörler, antibakteriyel mekanizmada önemli bir rol oynayan nanoparçacıkların konsantrasyonu ve büyüklüğüdür. AuNP'lerin gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler üzerindeki antibakteriyel mekanizması, AuNP'lerin konsantrasyonuna bağlıdır (214). AuNP'lerin katalitik ve antibakteriyel mekanizmasının ortalama boyutta bir azalma ile arttığı gösterilmiştir (215). Biyomedikal kullanımlar için, AuNP'lerin dışından fonksiyonelleştirilmesi, onları spesifik hastalık alanlarına hedeflemek ve hücrelerin veya biyomoleküllerle seçici olarak etkileşime girmelerini sağlamak için gereklidir (216). AuNP'lerin hücre toksisitesi öncelikle parçacık büyüklüklerine bağlıdır. Örneğin, küçük boyutlardaki altın nanoparçacıkların (1,4 nm) bağ dokusu fibroblastları, epitel hücreleri, makrofajlar ve melanom hücreleri için sitotoksik olduğu, 15 nm'lik boyut aralığındaki daha büyük altın nanoparçacıkların ise yüksek konsantrasyonlarda bile toksik olmadığı gösterilmiştir (217). Büyüklüğü 6-40 nm olan AuNP'ler, daha önce bildirilenlere göre yüksek antibakteriyel aktivite sergilemiştir (218). Bu aktivitenin mekanizması, boyuta ve doza bağımlı bulunmuştur. Bir yara örtüsü bakteri girişine mutlaka bir engel sunmalıdır (219). Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, yüksek morbidite ve mortalite oranlarına sahiptir. Son zamanlarda, antimikrobiyal ajanlarla yüklü yara örtüleri, iyileşme sürecini iyileştirmek, yara bakteriyel kolonizasyonunu ve enfeksiyonu azaltmak için uygun seçenekler olarak ortaya çıkmıştır (55). AuNP'ler anti bakteriyel özellik taşıdıklarından dolayı bu tez çalışmasında tercih edilmiştir. Gerçekleştirilen antibakteriyel aktivite testi sonucuna göre AuNP'nin eklendiği PLLA/Kol-I+AuNP numunelerinde *S.aureus* ve *E.coli* bakterilerinin fiberlere tutulumu, çoğalması ve yayılması yüksek miktarda engellenmiştir.

Bir tıbbi yara örtüsü, gazlar için geçirgen olmalıdır (220). Deri rejenerasyonu için ideal olarak uygun yapı iskelesi, biyolojik olarak parçalanabilirlik, biyolojik uyumluluk, iyi mekanik özellik, hücrelerin yapışması ve çoğalması, kontrollü sıvı kaybı ve oksijen geçirgenliği gibi birkaç özelliği içermelidir (221). Yara iyileşme süreci için oksijen önemlidir çünkü yara yatağındaki yüksek miktarda CO2, pH'ı düşürür. Oksijen, yara iyileşme oranını artırır. Düşük oksijen değeri, anaerobik bakterilerin çoğalma şansını artırır (222). Aşırı hava geçirgenliği, özellikle de daha yüksek nem buharı iletim hızı yarayı kurutabilir ve iyileşme üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabilir (223). Birincisi, yeni oluşan hücreler üzerinde doğrudan etki yoluyla (yara yatağının aşırı kuruması hücre ölümüne neden olur) ya da yara örtüsünün yaraya doğru büyümesiyle sonuçlanan iki mekanizmadan kaynaklanmaktadır (220). İkincisi, yeni oluşan doku ile pansuman etkileşiminin bir sonucudur, kabuklar oluşturur ve yaranın iyileşme hızı üzerinde olumsuz bir etkiye neden olur (224). Singh ve ark.'larının yaptığı çalışma sonucunda PVA-COOH/kitosan filmlerinin ortalama çözünmüş oksijen miktarı 9 ppm olarak ölçülmüştür. Tüm sonuçlar, doku homoeostazı, enerji üretimi, hücre zarı bakımı, mitokondriyal fonksiyon ve hücresel onarım için uygun olan çapraz bağlı PVA-COOH/kitosan filmlerinin kompakt yapısı boyunca yeterli oksijenin nüfuz edebildiğini göstermiştir (225). Normal şartlar altında, arıtılmış su, 0-35°C'de 7,0-14,6 mg/L aralığında çözünmüş oksijen değerine sahiptir (162). Bu tez çalışmasında sonuçlar ile PLLA/Kol-I yara örtüleri ticari yara örtüsü olan Tegaderm®'e kıyasla daha yüksek oksijen geçirgenliği sağlamıştır. En yüksek çözünmüş oksijen miktarı AuNP'nin olduğu örneklerinde 7,4 ppm olarak kaydedilmiştir. Bu oran yara iyileşme hızı açısından önemlidir ve yaranın kurumasına izin vermeyecek niteliktedir.

Uygun yara örtüsü için listelenen nanoliflerin özellikleri arasında sıvı alım kabiliyeti ve su buharı iletim hızları bulunur. Bu özellikler, yara örtülerinin yarayı hücre proliferasyonu ve epitel ve fibroblastların düzgün çalışması için gerekli olan optimum nemde tutup tutamayacağının belirlenmesinde de önemlidir (195). Deri yaralarının iyileştirilmesi için uygun nemin korunması önemlidir (161). Yara örtüsü tercihen altındaki nemli eksüdayı muhafaza edilecek kadar su buharı geçirgen olmalıdır, ancak yara yatağının kurumasına yol açan aşırı sıvı emilimi ve buharlaşma önlenir ve vücutla uyumlu olmalıdır (219). İyileşme başladığında, etkili iyileşmeyi sağlamak için uygun bir nem dengesi ve enfeksiyonların önlenmesi ve eksüda

yönetimi gereklidir (220). Aşırı su buharı geçirgenlik oranı, yara dokusunu kurutarak yara örtüsünün yara yüzeyine yapışmasına ve iyileşmeden sonra yara izi kalmasına neden olur, düşük su buharı geçirgenlik oranı ise eksüda birikimine yol açabilir ve yara iyileşmesini geciktirebilir ve bakteriyel enfeksiyon riskini artırabilir (161). İdeal bir yara örtüsü malzemesi, bir yara yüzeyinden buharlaşan su kaybını kontrol etmelidir. Normal deri oranı günlük 204 gr/m^2 iken, yaralı deri için birinci derece yanık için günde 279 g/m^2'den granüle bir yara için günde 5,138 g/m^2'ye kadar değişebilir (226). Kayıp oranlarının orta aralığı olan günlük 2,500 g/m^2 oranının, yara dehidrasyonu riski olmadan yeterli düzeyde nem sağlayacağı önerilmiştir (219). Bir malzemenin su buharı geçirme hızı normal derininkinden daha düşükse, doku kurur, yara ve örtü arasındaki eksüda enfeksiyona neden olur. Bu nedenle, yara örtüsü malzemeleri normal cilde göre daha yüksek bir su buharı iletim hızı değerine sahip olmalıdır (227). Bir yarayı iyileştirmek, hücre göçünü hızlandırmak ve yara bölgesinde epitelizasyonu kolaylaştırmak için yüksek nemin korunması gereklidir (228). Ticari yara örtüleri ile karşılaştırıldığında hidrokolloid cins Biofilm (Cli Med Ltd, 1.79 mm kalınlık) statik ölçümlerde ortalama olarak 2900 $gm^{-2}gün^{-1}$ değeri verirken, bu cinsteki Duoderm yaklaşık olarak 886 $gm^{-2}gün^{-1}$ buhar geçirgenliği verebilmektedir. Üretilen PLLA/Kol-1 yara örtüsünün nem geçirgenliğinin beş noktada yapılan ölçümlerinin ortalaması 860 g/m^2 olarak hesaplanmıştır ve ticari ürünler ile kıyaslanabilir seviyededir.

Büyüme faktörleri, hücreler ve mikro çevreleri arasındaki iletişimde hayati bir rol oynar (229). Yara iyileşmesi, başarılı olmak için koordineli sinyal moleküllerine dayanan karmaşık, çok faktörlü bir süreçtir. EGF, yara onarımını uyaran mitojenik bir polipeptiddir; bununla birlikte, yan etkileri azaltmak ve istenen terapötik faydaları elde etmek için uygulamasının kesin kontrolü gereklidir (230). EGF, keratinositlerin, endotelyal hücrelerin ve fibroblastların uyarılması, çoğalması ve göçünde, hücre dışı matris proteininin salgılanmasında ve ayrıca granülasyon dokusunun oluşumunda rol oynar. Bu nedenle klinisyenler, yara iyileşmesini ve deri yenilenmesini iyileştirmek için EGF uygulamasına odaklanmıştır (231). Klinik araştırmalar, EGF'nin topikal uygulamasının, ikinci derece yanık bölgelerinde epidermal rejenerasyon oranını hızlandırabildiğini ve ayrıca kronik yaraların iyileşme sürecini artırabildiğini ortaya koymuştur (229). İlk patlama salımını ortadan kaldırmak için, büyüme faktörleri bir çekirdek-kabuk ilaç dağıtım sistemi oluşturmak için polimer kabuğa dahil edilebilir

(232). Bu nedenle, çekirdek-kabuk yapısı, liflerin çekirdeğindeki ilaçları veya büyüme faktörlerini toksik çözücülerden etkilenmekten koruyabilir ve böylece biyoaktivitelerini koruyabilir (233). Büyüme faktörlerini (çekirdek) elektroeğrilmiş mikro/nano-fiberlere (kabuk) dahil etmek, uygun kimyasal veya biyolojik ipuçları sağlayarak iskelenin biyoaktivitesini artırabilir (234). Kontrollü salınımlı koaksiyel fiberler, ilaç dağıtımında üstün performans sergiler ve doku mühendisliğinde monolitik fiberlerden daha kararlı performans gösterdikleri bulunmuştur (171). Bir hayvan çalışmasında, dorsal yara bölgelerine temel fibroblast büyüme faktörü (FGF)/EGF) nanofibröz ağlar uygulandığında, diyabetik ülserlerin yara kapanma oranlarını 7 günde önemli ölçüde artırdığı görülmüştür (235). Ulubayram ve ark.'nın yaptığı çalışmada EGF içeren jelatin mikro küreler, bir tavşanın yara alanındaki küçülme boyutunu artırmıştır ve mononükleer hücrelerin veya immün reaksiyonların infiltrasyonuna neden olmamıştır (236). Choi ve ark., yara pansumanları olarak FGF ve EGF ile entegre koaksiyel olarak elektroeğrilmiş matlar üretmişlerdir. FGF, çekirdek-kabuk liflerinin çekirdeğine yüklenirken, EGF, kabuk yüzeyinde kimyasal olarak bağlanmıştır. FGF ve EGF'nin iki fazlı salınımının, orijinal keratinize doku ile benzer fenotiplerle doku iyileşmesini büyük ölçüde desteklediğini bulmuşlardır (156). Bununla birlikte, büyüme faktörlerinin kısa yarı ömrü ve yara örtüsü materyalinin üretiminde yapısını korumaya uygun olmayan deneysel koşullar gibi sebeplerle kliniğe gidecek son üründe büyüme faktörü kullanmanın birçok sınırlaması vardır. Bu tez çalışmasında, kolajen ile birlikte EGF'nin çekirdek kısımda elektroeğrilmesiyle ve üretim sonrasında AuNP'nin yüzeye emdirilmesiyle elde edilen PLLA/Kol-I+AuNP+EGF örnekler üzerinde fibroblast hücre canlılığında diğer numunelere göre anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu durum, EGF çözeltisinin çekirdek kısımda yeterli miktarda taşınamamasından, çekirdek kısımda bulunmasından dolayı salımının yavaş olmasından ve bu nedenle büyüme faktörünün yeterli seviyede salımının sağlanamamasından kaynaklanabilir.

Hücre canlılığının karakterizasyonu potansiyel yara örtüsü malzemeleri için çok önemlidir (237). Bir iskelede kültürlenen hücreler, sentetik bir yapı iskelesi olmadan vücutta olacakları gibi benzer bir davranışa sahip olmalıdır. İyileşme, hücreler çoğaldıkça, yer değiştirdikçe, farklılaştıkça ve iskele ile çevresindeki dokuyu yeniden şekillendirdikçe gerçekleşir. Hücrelerin çoğu iskele özelliklerine bağlı olduğundan, uygun yapışma, yayılma vb. için iskele tasarımında biyomateryal seçimi

büyük önem taşımaktadır (53). Bu yüzden hücrelerin doğal ortamını taklit edebilmek önemlidir. Bir yara örtüsü, yara dokusunda herhangi bir toksisiteye neden olmamalıdır (228). *In vitro* araştırmak ve ardından bu materyallerin ilgili uygulamaları için *in vivo* biyouyumluluğunu tahmin etmek için hücre toksisitesi testi yapılmaktadır (238). Aljinat içeren yara örtülerinin (Algisite M, SeaSorb ve Contreet-H), yüksek kalsiyum konsantrasyonları gösterdiği, önemli ölçüde azalmış keratinosit proliferasyonuna neden olduğu ve keratinosit morfolojisini etkilediği gösterilmiştir (208). Bir çalışmada, kolajen/PCL koaksiyel nanofiberlerinin yapı iskeleleri içinde hücre göçünü teşvik ettiği belirtilmiştir. Çalışmanın bulguları, kolajen/PCL nanofiberlerinin, doku mühendisliği uygulamaları için hücreler ve iskeleler arasında mükemmel entegrasyon elde etmeye yönelik yeni fonksiyonel biyomimetik fiberler olarak kullanılabileceğini göstermektedir (150). Tip I kolajen, kitosan ve polietilen oksitin kompozit nanofibröz membranları elektroeğirme ile üretilmiştir. Bu membranların, 3T3 fibroblastların büyümesine karşı toksisite göstermediği ve *in vitro* hücre uyumluluğuna sahip olduğu belirtilmiştir (148). Sentetik ve doğal polimerlerin bireysel avantajlarını birleştirmek için PLLA-kitosan hibrit iskeleler üretilmiştir. Hibrit yapı iskeleleri yüksek hücre bağlanma etkinliği, hücre çoğalması ve hücre canlılığı sergilemiştir. Bu çalışma, hibrit yapı iskeletlerinin PLLA'dan daha iyi mekanik mukavemet ve kitosandan daha mükemmel hücre uyumluluğu elde ettiğini göstermektedir (165). Bir başka çalışmada, kitosan ve kolajen ile harmanlanmış PLLA vasküler greft materyali için yüksek hemo-uyumluluk ve düşük sitotoksisite standartlarını karşıladığı gösterilmiştir (239). ISO 10993-5 standardına göre hücre toksisite testi sonuçlarının kontrole göre %70'ten düşük olmaması nedeni ile hiçbir numunenin toksik olmadığı gözlenmiştir (234, 235).

Elektroeğirme, 10 µm'den 10 nm'ye kadar değişen çaplarda çok ince fiberleri üretme yöntemidir (240). 0,14 nm-2,1 µm'lik elektroeğrilmiş fiberlerin getirdiği yüzey topografisinin hücre morfolojisini ve hücre proliferasyonunu etkilediği gösterilmektedir (159, 170). Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, fiber çapı hücrelerin çapından daha küçük olmasına rağmen hücrelerin nanofibröz yapılar üzerinde iyi bağlandığını, büyüdüğünü ve organize edildiğini göstermiştir (170, 241). Deneysel araştırmalar, fiber morfolojisinin ve fiber bileşiminin, hücrenin şeklini ve yönelim büyümesini büyük ölçüde belirlediğini göstermektedir (242). Fiber çapı ve yüzey mimarisinin fibroblast yapışması üzerinde önemli bir etkisi vardır.

Elektroeğrilmiş PCL fiberlerini kullanan Chen ve ark., 428 nm nanofibröz iskelede 3T3 fibroblast bağlantısının 1,6 μm'ye kadar olan daha büyük çaplı liflerden önemli ölçüde daha iyi olduğunu bulmuştur. Hücre proliferasyonu, 7 güne kadar olan tüm zaman noktalarında 428 nm fiber üzerinde en iyisi olarak raporlanmıştır (163). Bu tez çalışmasında yapılan ölçümler sonucunda fiber çapı ölçümünün ortalaması Φ=0,581 μm (581nm) bulunmuştur. Alınan SEM görüntüleri ile hücre yayılmasının çok iyi olduğu görülmüştür.

Hidrofiliklik ve hidrofobiklik terimleri, su moleküllerinin herhangi bir substratın yüzeyinde yayılmaya olan göreceli afinitesini tanımlamak için kullanılmıştır. Bu etkileşimin analizi, temas açısı (θ) olarak adlandırılır ve elde edilen değer, malzemelerin yüzey enerjisiyle ilişkilendirilir (172). Genel olarak θ<90 derece değeri, sıvıya ve 90 dereceden daha küçük su temas açısına sahip olan yüzeyi temsil ettiği kabul edilir ve hidrofilik olarak adlandırılır (243). θ>90 derece değeri, numunenin hidrofobik olduğunu gösterir (172, 243). Wu ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada AuNP miktarının artmasıyla, temas açıları başlangıçta 25,6 °'den 78,1 °'ye yükselmiştir (244). Saf PLLA fiberlerin yüzey temas açısı yaklaşık olarak 116° olarak literatürde yerini almaktadır (245). Bu bilgiler doğrultusunda fiberlere kolajen eklenmesi temas açısını oldukça düşürmüştür (θ=49°) ve hidrofilikliği arttırmıştır. PLLA/Kol-I+AuNP+EGF fiberlerinde temas açısı 100°'ye çıkmıştır ve yine de saf PLLA'ya kıyasla daha az hidrofobik olduğu görülmektedir, bu durum fibroblast hücre tutunması açısından olumludur. AuNP'li örneklerdeki temas açısı artışı literatür ile desteklenmektedir. PLLA/Kol-I+AuNP+EGF yara örtülerinin PLLA/Kol-I yara örtülerine kıyasla ıslanabilirliğinin azalmış olduğu ve yüzeyin hidrofobik özellik sergilediği gözlenmiştir.

SEM ile çalışılan örneklerde *E.coli* ve *S.aureus* bakterisinin tutunumu ve çoğalmasının PLLA/Kol-I+AuNP fiber örneklerde PLLA/Kol-I fiberlerine göre oldukça az olduğu gösterilmiştir. Her iki bakteri de yara kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar arasında en yaygın olanlardır ve antibiyotiklere dirençli olabilirler. Bu tez çalışmasında fiber yapıya AuNP eklenmesiyle fibroblast sitotoksistesine yol açmadan her iki bakteriye karşı etkili olabilecek bir ajanın kullanımı değerlendirilmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, hücrelerin tutunumu ve çoğalması için potansiyel olarak uygun yüzeyler sağlayan çekirdek-kabuk yapıdaki fiberlerden oluşan PLLA ve kolajen içeren yara örtülerinin etkinliği gösterilmiştir.

HFIP içerisinde ağırlıkça %15 PLLA ve %1 asetik asit içerisinde ağırlıkça %4 kolajen çözeltisinden 25 kV voltaj, 15 cm mesafe ve 0,5 ml/saat akış hızı elektroeğirme parametreleri kullanılarak üretilen fiber morfolojisinin düz ve homojen bir görünüme sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bu parametrelerin fiberlerde boncuk (bead) şekilli fiber oluşumuna yol açmadığı görülmüştür. Yara örtümüzü üretmek için optimal değerler olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Diğer analizler için üretilen örneklerin parametreleri optimum parametreler olarak ayarlanmıştır. Bu çalışmada yapılan ölçümler sonucunda fiber çapı ölçümünün ortalaması Φ=0,581 µm bulunmuştur.

PLLA/Kol-I yara örtüsü numunelerinde PBS içerisinde en yüksek şişme oranı %148 ile 14.gün sonunda kaydedilmiştir. Örneklerde 14. gün sonrasında biyobozunmanın başlamış olabileceği düşünülmüş olmasına rağmen deney sonuna kadar şişme davranışı devam etmiş olup 21.günde şişme yüzdesi azalmıştır. 14.güne kadar şişme özelliği göstermesi, üretilen PLLA/Kol-I yara örtüsünün büyük ölçüde eksüdayı emebileceği anlamına gelmektedir. PLLA/Kol-I yara örtüsü numunelerinin PBS içerisinde bozunma olmasına rağmen deney sonuna kadar ağırlık artışı devam etmiş olup 21.günden sonra ıslak ağırlıkta düşme görülmüştür.

AuNP'lerin basitçe çözeltiye daldırılıp kaplama yoluyla kullanılabileceği, yapılan EDS analizi ile desteklenmiştir. AuNP kaplı numunelerin bozunma analizi boyunca üzerinde bulundurduğu, sterilizasyon sonrası Au miktarının başlangıçta %3 olmasına rağmen PBS içerisinde 14.gün sonunda alınan ölçüm ile %1,7 oranında var olmaya devam ettiği gösterilmiştir. Yüzeye entegre edilen AuNP'lerin 14 gün sıvı ortamında kalmasına rağmen hala yüzeyden Au salımının devam etmesi AuNP'lerin en etkili tedavi yöntemini sunması açısından önemlidir çünkü yara örtüsünün bozunma sürecinde doğru orantılı bir biçimde bulunması gerekmektedir. Bu çalışmada yapılan analizlerin sonucu anlamlı ölçüde önemli olmaktadır.

Bu tez çalışmasında Hem PLLA/Kol-I hem de PLLA/Kol-I+AuNP, ticari yara örtüsü olan Tegaderm'e kıyasla daha yüksek oksijen geçirgenliği sağlamıştır. En yüksek çözünmüş oksijen miktarı AuNP bulunan örneklerde 7,2 ppm olarak hesaplanmıştır. Artma eğilimi gözlenmektedir. Elde edilen bu sonuçlar, doku homoeostazı ve hücresel onarım için uygun olabilecek yeterli oksijenin yara yüzeyine geçebileceğini gösterecektir.

Üretilen PLLA/Kol-I yara örtüsünün nem geçirgenliği ölçümlerinin ortalaması 860 g/m^2 olarak hesaplanmıştır ve ticari ürünler ile kıyaslanabilir seviyededir. PLLA/Kol-I yara örtümüzün su buharı geçirdiğini ve aşırı dehidrasyon olmadan düşük ila orta seviyeli eksüdatif yaralar için yara bölgesinde nemli bir ortam sağlayabileceği bu değer ile öngörülmektedir.

Yara örtüleri, yara alanında bulunan hücreler için hasarlı dokuyu entegre etmek, çoğaltmak, farklılaştırmak ve nihayetinde yeniden oluşturmak için geçici yapılar olarak hizmet edebilir. Bu çalışmada, NIH/3T3 fibroblastların, tüm PLLA/Kol-I örneklerinde çoğalmayı, nüfuz etmeyi ve tutunmayı başardığı gösterilmiştir. DAPI ve FITC-Phalloidin floresan boyalarıyla birlikte hücrelerin varlığı gösterilmiştir. EGF'nin yara iyileşmesini hızlandırma özelliğinden dolayı üretilen yara örtüsünde tercih edilmiştir. Bu tez çalışmasında, tekrarlanan hücre deneylerindeki tüm gruplarda iyi bir hücre canlılığı görülmüştür ancak çekirdek kısma EGF eklenmesi hücre canlılığında önemli bir etki yaratmamıştır. Gelecekteki çalışmalarda hücre canlılığının yanı sıra, aktivitesinin değerlendirilmesi ve EGF'nin çekirdek kısımdaki yüklenme kapasitesinin artırılması yoluna gidilebilir.

Bu tez çalışmasındaki tüm numuneler, yüksek hücre uyumluluğu göstermiştir. Bir biyomalzemenin biyouyumluluk açısından en önemli ve en temel göstergelerinden biri olan hücre toksisitesinin değerlendirilmesi sonucunda, tüm numunelerin hücre canlılığına olan etkisinde, ideal sayılan hücre kültür plakalarına ekilen (negatif) kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmamıştır. Hücre çoğalmasının ideal hücre plaka yüzeylerinde olduğu kadar iyi olduğu gösterilmiştir. ISO 10993-5 standardına göre hücre toksisite testi sonuçlarının kontrole göre %70'ten düşük olmaması nedeni ile tüm numunelerin toksik olmadığı sonucuna varılmıştır (234, 235).

Hücre ekiminden sonra yapılan SEM analizi ile elde edilen görüntülerde, NIH/3T3 fibroblast hücrelerinin boncuklu yapıda üretilmiş numunelerin kullanılmış

olmasına rağmen cok iyi hücre yapışması ve yayılımı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, yara iyileşmesi için gerekli olan koşulları sunacaktır.

Yara enfeksiyonu, iyileşme sürecini ve yaranın tamamen kapanmasını engelleyebilen günümüzün yara bakımı yönetiminin birincil komplikasyonlarından biridir. Yaralara ilaç verilmesi için farklı formdaki biyolojik kökenli malzemelerin saf halde uygulanması, işlem sırasında sıvıyı hızla emdikleri, fiziksel, mekanik özelliklerini kaybettikleri ve kararsız hale geldiklerinden çok etkili değildir. Bu nedenlerden ötürü, daha iyi eksüda yönetimi ve yara yerinde uzun süre kalmasını sağladıkları için günümüzün biyomedikal teknolojileriyle üretilmiş yara örtülerinin kullanılması tercih edilir. Bu tez çalışmasında, PLLA/Kol-I numunesinin yüzey temas açısı iki yönden yaklaşık 49°, PLLA/Kol-I+AuNP+EGF numunesinin yüzey temas açısı ise iki yönden ortalama 100° olarak ölçülmüştür. Bu ölçümler sonucunda PLLA/Kol-I numunesinin oldukça hidrofilik olduğu ancak numunelere AuNP ve EGF eklendiğinde yüzeyin hidrofobik hale geldiği görülmüştür. Ancak saf PLLA'ya göre kolajen eklenmiş fiberlerde yüksek hidrofilik özellik elde edilmiştir.

Yüzeye tutunan ve çoğalan bakterilerin fiber üzerindeki yayılımının elektron mikroskopisiyle incelenmesi sonucunda AuNP'nin eklendiği PLLA/Kol-I+AuNP numunelerinde *S.aureus* ve *E.coli* bakterilerinin fiberlere tutulumu, büyümesi ve yayılmasının azaldığı gözlemlenmiştir. AuNP varlığı sayesinde üretilen yara örtüsü, yara iyileşmesi boyunca antibakteriyel özellik sağlayarak yaranın iyileşmesini destekleyecektir.

Sonuç olarak bu yüksek lisans tez çalışması, yara iyileşmesini desteklemek için elektroeğrilmiş fiberlerin farklı özelliklerini göstermek üzere yapılandırılmıştır. Elektroeğrilmiş fiberler, mekanik stabilite, yüksek gözeneklilik, yüksek yüzey alanı/hacim oranı gibi faydalı özellikleri, uygun hücre bağlanmasını, farklılaşmasını ve çoğalmasını destekler. Ayrıca su, oksijen ve besin değişimine izin verir. ECM'nin yapısını ve işlevselliğini taklit etme yetenekleri, iyileşme ve enfeksiyon belirteçlerinin izlenmesine olanak tanır. Yüzey kimyası ve yüksek hidrofilik özelliği bakteri emilimini düzenler. AuNP'lerin yapıya eklenmesinin, yara alanında olası bakteri çoğalmasına engel olacağı bilinmektedir. Epidermal hücreler ve büyüme faktörleri ile aşılama yeteneği, yara iyileşmesini hızlandırır. Bu nedenle, bu çalışmada araştırılan özellikler, özellikle AuNP eklenmiş ve bir biyopolimer ile çekirdek-kabuk formunda

bir araya getirilmiş sentetik polimerden oluşturulan kompozit fiberlerin yara yönetiminde yararlı olduğunu göstermiştir. Gelecek çalışmalarda üretilen yara örtülerinin klinik öncesi biyouyumluluk ve yara yönetiminde etkililik verilerin elde edilmesi için *in vivo* hayvan deneyleriyle organizmada yara iyileşmesi sürecine etkilerin ve enfeksiyona karşı etkililiğin daha net ortaya koyulmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Venus, M., Waterman, J., McNab, I. (2010). Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*, 28, 469–472.
2. Kabashima, K., Honda, T., Ginhoux, F., Egawa, G. (2019). The immunological anatomy of the skin. *Nature Reviews Immunology*, 19, 19–30.
3. Haake, A.R., Polakowska, R.R. (1993). Cell death by apoptosis in epidermal biology. *Journal of Investigative Dermatology*, 101, 107–112.
4. Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., Juarranz, Á. (2016). Anatomy and Function of the Skin. In Nanoscience in Dermatology. Elsevier, pp. 1–14.
5. Fortunel, N.O., Martin, M.T. (2012). Cellular organization of the human epidermal basal layer: Clues sustaining a hierarchical model. *International Journal of Radiation Biology*, 88, 677–681.
6. Chadli, L., Martin, M.T., Fortunel, N.O. (2011). Investigating human keratinocyte stem cell identity. *European Journal of Dermatology*, 21, 4–11.
7. Thomason, H.A., Scothern, A., McHarg, S., Garrod, D.R. (2010). Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochemical Journal*, 429, 419–433.
8. Kowalczyk, A.P., Green, K.J. (2013). Structure, Function, and Regulation of Desmosomes. In Progress in Molecular Biology and Translational Science. *Elsevier*, 116, 95–118.
9. Brown, S.J., McLean, W.H.I. (2012). One remarkable molecule: filaggrin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 132, 751–762.
10. Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., Juarranz, Á. (2016). Chapter 1- Anatomy and Function of the Skin. In Hamblin, M.R., Avci, P., Prow, T.W. (eds), *Nanoscience in Dermatology*. Academic Press, Boston, 1–14.
11. Messenger, A.G. (1993). The control of hair growth: An overview. *Journal of Investigative Dermatology*, 101, 4–9.
12. Eady, R.A. (1988). The basement membrane. Interface between the epithelium and the dermis: structural features. *Archives of Dermatology*, 124, 709–712.
13. Fine, J.-D. (1994). International symposium on epidermolysis bullosa. *Journal of Investigative Dermatology*, 103, 839–843.
14. James, W.D., Berger, T.G., Elston, D.M. Odom. (2006). In *Andrews' Diseases of the Skin: Clinical Dermatology*.
15. Gayraud, B., Höpfner, B., Jassim, A., Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L. (1997). Characterization of a 50-kDa component of epithelial basement membranes using GDA-J/F3 monoclonal antibody. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 9531–9538.
16. Kolarsick, P.A.J., Kolarsick, M.A., Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin: *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3, 203–213.
17. Stepp, M.A., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A., Elwell, J., Gipson, I.K. (1990). Alpha 6 beta 4 integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 8970–8974.
18. Smith, L.T., Holbrook, K.A. (1986). Embryogenesis of the dermis in human skin. *Pediatric Dermatology*, 3, 271–280.
19. Philips, N., Auler, S., Hugo, R., Gonzalez, S. (2011). Beneficial Regulation of Matrix Metalloproteinases for Skin Health. *Enzyme Research*, 2011, 427285.
20. Skobe, M., Detmar, M. (2000). Structure, Function, and Molecular Control of the Skin Lymphatic System. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 5, 14–19.
21. Goldsmith, L.A., Katz, S.I., Gilchrest, B.A., Paller, A.S., Leffell, D.J., Wolff, K. (2012). Section 3. Overview of Biology, Development, and Structure of Skin. In *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. (8th ed.). The McGraw-Hill Companies, New York, NY.
22. Blanpain, C., Fuchs, E. (2014). Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science*, 344.
23. Mort, R. L., Jackson, I. J., Patton, E. E. (2015). The melanocyte lineage in development and disease. *Development*, 142, 620-632.
24. Romani, N., Clausen, B.E., Stoitzner, P. (2010). Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunological reviews*, 234, 120.
25. Johnson, K.O. (2001). The roles and functions of cutaneous mechanoreceptors. *Current Opinion in Neurobiology*, 11, 455–461.

26. Lippert, U., Artuc, M., Grützkau, A., Babina, M., Guhl, S., Haase, I., Henz, B. M. (2004). Human Skin Mast Cells Express H2 and H4, but not H3 Receptors. *Journal of Investigative Dermatology*, 123, 116–123.
27. Bhardwaj, N., Chouhan, D., Mandal, B.B. (2018). 3D functional scaffolds for skin tissue engineering. In *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds*. Elsevier, pp. 345–365.
28. Salehi, M., Farzamfar, S., Bastami, F., Tajerian, R. (2016). Fabrication and characterization of electrospun plla/collagen nanofibrous scaffold coated with chitosan to sustain release of aloe vera gel for skin tissue engineering. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications*, 28, 1650035.
29. Shevchenko, R.V., James, S.L., James, S.E. (2010). A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of The Royal Society Interface*, 7, 229–258.
30. Porter, C., Tompkins, R.G., Finnerty, C.C., Sidossis, L.S., Suman, O.E., Herndon, D.N. (2016). The metabolic stress response to burn trauma: current understanding and therapies. *The Lancet*, 388, 1417–1426.
31. Papini, R. (2004). Management of burn injuries of various depths. *BMJ*, 329, 158–160.
32. MacNeil, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445, 874–880.
33. Maver, T., Maver, U., Kleinschek, K.S., Raščan, I.M., Smrke, D.M. (2015). Advanced therapies of skin injuries. *Wiener klinische Wochenschrift*, 127, 187–198.
34. Miller, S.J., Burke, E.M., Rader, M.D., Coulombe, P.A., Lavker, R.M. (1998). Re-epithelialization of porcine skin by the sweat apparatus. *The Journal of Investigative Dermatology*, 110, 13–19.
35. Gianino, E., Miller, C., Gilmore, J. (2018). Smart Wound Dressings for Diabetic Chronic Wounds. *Bioengineering*, 5, 51.
36. Siddiqui, A.R., Bernstein, J.M. (2010). Chronic wound infection: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*, 28, 519–526.
37. Zhang, P., Lu, J., Jing, Y., Tang, S., Zhu, D., Bi, Y. (2017). Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Medicine*, 49, 106–116.
38. Moxey, P.W., Gogalniceanu, P., Hinchliffe, R.J., Loftus, I.M., Jones, K.J., Thompson, M.M., Holt, P. J. (2011). Lower extremity amputations- a review of global variability in incidence: Lower extremity amputations-a global review. *Diabetic Medicine*, 28, 1144–1153.
39. Yussof, S.J.Mohd., Omar, E., Pai, D.R., Sood, S. (2012). Cellular events and biomarkers of wound healing. *Indian Journal of Plastic Surgery*, 45, 220–228.
40. Carr, P.C., Cropley, T.G. (2019). Sports Dermatology. *Clinics in Sports Medicine*, 38, 597–618.
41. Moss, C. (2000) Genetic skin disorders. *Seminars in Neonatology*, 5, 311–320.
42. Andrews, R.M., McCarthy, J., Carapetis, J.R., Currie, B.J. (2009). Skin Disorders, Including Pyoderma, Scabies, and Tinea Infections. *Pediatric Clinics of North America*, 56, 1421–1440.
43. Wild, T., Rahbarnia, A., Kellner, M., Sobotka, L., Eberlein, T. (2010). Basics in nutrition and wound healing. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 26, 862–866.
44. Tottoli, E.M., Dorati, R., Genta, I., Chiesa, E., Pisani, S., Conti, B. (2020). Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *Pharmaceutics*, 12, 735.
45. Dalisson, B., Barralet, J. (2019). Bioinorganics and Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials*, 8, 1900764.
46. Enoch, S., Leaper, D.J. (2007). Basic science of wound healing. *Surgery*, 26, 31-37.
47. Robson, M.C. (1997). The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 5, 12–17.
48. Robson, M.C., Hill, D.P., Woodske, M.E., Steed, D.L. (2000). Wound healing trajectories as predictors of effectiveness of therapeutic agents. *Archives of Surgery (Chicago, Ill.: 1960)*, 135, 773–777.
49. Eaglstein, W.H., Falanga, V. (1997). Chronic wounds. *The Surgical Clinics of North America*, 77, 689–700.
50. Kamel, R.A., Ong, J.F., Eriksson, E., Junker, J.P.E., Caterson, E.J. (2013). Tissue Engineering of Skin. *Journal of the American College of Surgeons*, 217, 533–555.
51. Föhn, M., Bannasch, H. (2007). Artificial skin. *Methods in Molecular Medicine*, 140, 167–182.
52. Kim, G., Ahn, S., Kim, Y., Cho, Y., Chun, W. (2011). Coaxial structured collagen–alginate scaffolds: fabrication, physical properties, and biomedical application for skin tissue regeneration. *Journal of Materials Chemistry*, 21, 6165.
53. Mohamed, A., Xing, M.M. (2012). Nanomaterials and nanotechnology for skin tissue engineering. *International Journal of Burns and Trauma*, 2, 29–41.
54. Liu, W., Cao, Y. (2007). Application of scaffold materials in tissue reconstruction in immunocompetent mammals: our experience and future requirements. *Biomaterials*, 28, 5078–5086.

55. Simões, D., Miguel, S.P., Ribeiro, M.P., Coutinho, P., Mendonça, A.G., Correia, I.J. (2018). Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 127, 130–141.
56. Jayakumar, R., Prabaharan, M., Sudheesh Kumar, P.T., Nair, S.V., Tamura, H. (2011). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 29, 322–337.
57. Ding, J., Zhang, J., Li, J., Li, D., Xiao, C., Xiao, H., Chen, X. (2019). Electrospun polymer biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 90, 1–34.
58. Wang, Y., Beekman, J., Hew, J., Jackson, S., Issler-Fisher, A.C., Parungao, R., Maitz, P. K. (2018). Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 123, 3–17.
59. Chong, C., Wang, Y., Fathi, A., Parungao, R., Maitz, P.K., Li, Z. (2019). Skin wound repair: Results of a pre-clinical study to evaluate electropsun collagen–elastin–PCL scaffolds as dermal substitutes. *Burns*, 45, 1639–1648.
60. Wu, L., Norman, G., Dumville, J.C., O'Meara, S., Bell-Syer, S.E. (2015). Dressings for treating foot ulcers in people with diabetes: an overview of systematic reviews. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 7.
61. Nair, L.S., Laurencin, C.T. (2006). Polymers as Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery. In Lee, K., Kaplan, D. (eds), *Tissue Engineering I*, 102, 47–90.
62. Eisenbarth, E. (2007). Biomaterials for Tissue Engineering. *Advanced Engineering Materials*, 9, 1051–1060.
63. Dabiri, G., Damstetter, E., Phillips, T. (2014). Choosing a Wound Dressing Based on Common Wound Characteristics. *Advances in Wound Care*, 5, 32–41.
64. Chattopadhyay, S., Raines, R.T. (2014). Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, 101, 821–833.
65. Law, J.X., Liau, L.L., Saim, A., Yang, Y., Idrus, R. (2017). Electrospun Collagen Nanofibers and Their Applications in Skin Tissue Engineering. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 14, 699–718.
66. Parenteau-Bareil, R., Robert, G., Berthod, F. (2010). Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*, 3.
67. An, B., Kaplan, D.L., Brodsky, B. (2014). Engineered recombinant bacterial collagen as an alternative collagen-based biomaterial for tissue engineering. *Frontiers in Chemistry*, 2, 40.
68. Liu, S.-J., Kau, Y.-C., Chou, C.-Y., Chen, J.-K., Wu, R.-C., Yeh, W.-L. (2010). Electrospun PLGA/collagen nanofibrous membrane as early-stage wound dressing. *Journal of Membrane Science*, 355, 53–59.
69. Rho, K.S., Jeong, L., Lee, G., Seo, B.-M., Park, Y.J., Hong, S.-D., Min, B. M. (2006). Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials*, 27, 1452–1461.
70. Nair, L.S., Laurencin, C.T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 32, 762–798.
71. Sheikholeslam, M., Wright, M.E.E., Jeschke, M.G., Amini-Nik, S. (2018). Biomaterials for Skin Substitutes. *Advanced Healthcare Materials*, 7.
72. Lu, H., Oh, H.H., Kawazoe, N., Yamagishi, K., Chen, G. (2012). PLLA–collagen and PLLA–gelatin hybrid scaffolds with funnel-like porous structure for skin tissue engineering. *Science and Technology of Advanced Materials*, 13, 064210.
73. Duan, N., Geng, X., Ye, L., Zhang, A., Guo, L., Gu, Y. (2016). A vascular tissue engineering scaffold with core–shell structured nano-fibers formed by coaxial electrospinning and its biocompatibility evaluation. *Biomedical Materials*, 11, 035007.
74. Chen, R., Huang, C., Ke, Q., He, C., Wang, H., Mo, X. (2010). Preparation and characterization of coaxial electrospun thermoplastic polyurethane/collagen compound nanofibers for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79, 315–325.
75. Tseng, H.-J., Tsou, T.-L., Wang, H.-J., Hsu, S. (2013). Characterization of chitosan-gelatin scaffolds for dermal tissue engineering: Characterization of chitosan-gelatin scaffolds for dermal tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7, 20–31.
76. Mir, M., Ali, M.N., Barakullah, A., Gulzar, A., Arshad, M., Fatima, S., Asad, M. (2018). Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. *Progress in Biomaterials*, 7, 1–21.
77. Das, S., Baker, A.B. (2016). Biomaterials and nanotherapeutics for enhancing skin wound healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4, 82.
78. Bramhill, J., Ross, S., Ross, G. (2017). Bioactive Nanocomposites for Tissue Repair and Regeneration: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14, 66.

79. Frykberg, R.G., Banks, J. (2015). Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, 4, 560–582.
80. Langton, A.K., Sherratt, M.J., Griffiths, C.E.M., Watson, R.E.B. (2010). Review Article: A new wrinkle on old skin: the role of elastic fibres in skin ageing: Elastic fibres and skin ageing. *International Journal of Cosmetic Science*, 32, 330–339.
81. Petersen, E., Wågberg, F., Ängquist, K.-A. (2002). Serum Concentrations of Elastin-derived Peptides in Patients with Specific Manifestations of Atherosclerotic Disease. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 24, 440–444.
82. Faury, G. (2001). Function–structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres. *Pathologie Biologie*, 49, 310–325.
83. Daamen, W., Veerkamp, J., Vanhest, J., Vankuppevelt, T. (2007). Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials*, 28, 4378–4398.
84. Casasco, M., Casasco, A., Icaro Cornaglia, A., Farina, A., Calligaro, A. (2003). Differential Distribution of Elastic Tissue in Human Natural Skin and Tissue-Engineered Skin. *Journal of Molecular Histology*, 35, 421–428.
85. Mogoşanu, G.D., Grumezescu, A.M. (2014). Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 463, 127–136.
86. Morshed, M., Ag, I., Sr, C., Bhi, R. (2014). The Current Available Biomaterials Being Used For Skin Tissue Engineering. 2014.
87. Gsib, O., Egles, C., Bencherif, S. (2017). Fibrin: An Underrated Biopolymer for Skin Tissue Engineering. *Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 1, 1.
88. Janmey, P.A., Winer, J.P., Weisel, J.W. (2009). Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *Journal of The Royal Society Interface*, 6, 1–10.
89. Ahmed, T.A.E., Dare, E.V., Hincke, M. (2008). Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14, 199–215.
90. Bidault, L., Deneufchatel, M., Hindié, M., Vancaeyzeele, C., Fichet, O., Larreta-Garde, V. (2015). Fibrin-based interpenetrating polymer network biomaterials with tunable biodegradability. *Polymer*, 62, 19–27.
91. Collins, M.N., Birkinshaw, C. (2013). Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1262–1279.
92. Papakonstantinou, E., Roth, M., Karakiulakis, G. (2012). Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-Endocrinology*, 4, 253–258.
93. Teriete, P., Banerji, S., Noble, M., Blundell, C.D., Wright, A.J., Pickford, A.R., Jackson, D. G. (2004). Structure of the Regulatory Hyaluronan Binding Domain in the Inflammatory Leukocyte Homing Receptor CD44. *Molecular Cell*, 13, 483–496.
94. Klagas, I., Goulet, S., Karakiulakis, G., Zhong, J., Baraket, M., Black, J.L., Roth, M. (2009). Decreased hyaluronan in airway smooth muscle cells from patients with asthma and COPD. *European Respiratory Journal*, 34, 616–628.
95. Islam, S., Bhuiyan, M.A.R., Islam, M.N. (2017). Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *Journal of Polymers and the Environment*, 25, 854–866.
96. Dutta, P.K., Dutta, J., Tripathi, V.S. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63-20-31.
97. Bhuiyan, M.A.R., Shaid, A., Bashar, M.M., Haque, P., Hannan, M.A. (2013). A Novel Approach of Dyeing Jute Fiber with Reactive Dye after Treating with Chitosan. *Open Journal of Organic Polymer Materials*, 3, 38376.
98. Chou, C.-K., Chen, S.-M., Li, Y.-C., Huang, T.-C., Lee, J.-A. (2015). Low-molecular-weight chitosan scavenges methylglyoxal and N (ε)-(carboxyethyl)lysine, the major factors contributing to the pathogenesis of nephropathy. *SpringerPlus*, 4, 312.
99. Ravi Kumar, M.N.V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1–27.
100. Croisier, F., Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49, 780–792.
101. Paul, W., Sharma, C. (2004). Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 18.
102. Sultan, Md.T., Lee, O.J., Kim, S.H., Ju, H.W., Park, C.H. (2018). Silk Fibroin in Wound Healing Process. In Chun, H.J., Park, K., Kim, C.-H., Khang, G. (eds), *Novel Biomaterials for Regenerative Medicine*, Volume 1077. Springer Singapore, Singapore, pp. 115–126.
103. Kapoor, S., Kundu, S.C. (2016). Silk protein-based hydrogels: Promising advanced materials for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 31, 17–32.

104. Thangavel, P., Ramachandran, B., Kannan, R., Muthuvijayan, V. (2017). Biomimetic hydrogel loaded with silk and L -proline for tissue engineering and wound healing applications: SF and LP Loaded Hybrid Hydrogels for Wound Healing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 105, 1401–1408.
105. Miguel, S.P., Figueira, D.R., Simões, D., Ribeiro, M.P., Coutinho, P., Ferreira, P., Correia, I. J. (2018). Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 169, 60–71.
106. Bliley, J.M., Marra, K.G. (2015). Polymeric Biomaterials as Tissue Scaffolds. In *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. Elsevier, 149–161.
107. Hacker, M.C., Krieghoff, J., Mikos, A.G. (2019). Synthetic Polymers. In *Principles of Regenerative Medicine*. Elsevier, pp. 559–590.
108. Toncheva, A., Spasova, M., Paneva, D., Manolova, N., Rashkov, I. (2014). Polylactide (PLA)-Based Electrospun Fibrous Materials Containing Ionic Drugs as Wound Dressing Materials: A Review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 63, 657–671.
109. Suwantong, O., Pankongadisak, P., Deachathai, S., Supaphol, P. (2014). Electrospun poly(l-lactic acid) fiber mats containing crude Garcinia mangostana extracts for use as wound dressings. *Polymer Bulletin*, 71, 925–949.
110. Yang, H., Wang, L., Xiang, C., Li, L. (2018). Electrospun porous PLLA and poly(LLA-co-CL) fibers by phase separation. *New Journal of Chemistry*, 42, 5102–5108.
111. Inai, R., Kotaki, M., Ramakrishna, S. (2005). Structure and properties of electrospun PLLA single nanofibres. *Nanotechnology*, 16(2), 208-13.
112. Lü, J.-M., Wang, X., Marin-Muller, C., Wang, H., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C. (2009). Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 9, 325–341.
113. Chou, S.-F., Woodrow, K.A. (2017). Relationships between mechanical properties and drug release from electrospun fibers of PCL and PLGA blends. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 65, 724–733.
114. Zheng, Z., Liu, Y., Huang, W., Mo, Y., Lan, Y., Guo, R., Cheng, B. (2018). Neurotensin-loaded PLGA/CNC composite nanofiber membranes accelerate diabetic wound healing. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46, 493–501.
115. Li, Z., Tan, B.H. (2014). Towards the development of polycaprolactone based amphiphilic block copolymers: molecular design, self-assembly and biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 45, 620–634.
116. Lee, P.Y., Cobain, E., Huard, J., Huang, L. (2007). Thermosensitive Hydrogel PEG–PLGA–PEG Enhances Engraftment of Muscle-derived Stem Cells and Promotes Healing in Diabetic Wound. *Molecular Therapy*, 15, 6.
117. Abdelkader, D.H., Osman, M.A., El-Gizawy, S.A., Hawthorne, S.J., Faheem, A.M., McCarron, P.A. (2018). Effect of poly(ethylene glycol) on insulin stability and cutaneous cell proliferation in vitro following cytoplasmic delivery of insulin-loaded nanoparticulate carriers – A potential topical wound management approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 114, 372–384.
118. Huang, Z., Lu, M., Zhu, G., Gao, H., Xie, L., Zhang, X., Li, X. (2011). Acceleration of diabetic-wound healing with PEGylated rhaFGF in healing-impaired streptozocin diabetic rats: Modified rhaFGF and enhanced diabetic wound-healing effect. *Wound Repair and Regeneration*, 19, 633–644.
119. Unnithan, A.R., Sasikala, A.R.K., Park, C.H., Kim, C.S. (2017). Electrospun Polyurethane Nanofibrous Mats for Wound Dressing Applications. In *Polyurethane Polymers*. Elsevier, pp. 233–246.
120. Nirmala, R., Kalpana, D., Navamathavan, R., Lee, Y.S., Kim, H.Y. (2013). Preparation and Characterizations of Silver Incorporated Polyurethane Composite Nanofibers via Electrospinning for Biomedical Applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13, 4686–4693.
121. Subbiah, T., Bhat, G.S., Tock, R.W., Parameswaran, S., Ramkumar, S.S. (2005). Electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 96, 557–569.
122. Xue, J., Wu, T., Dai, Y., Xia, Y. (2019). Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chemical Reviews*, 119, 5298–5415.
123. Sun, B., Long, Y.Z., Zhang, H.D., Li, M.M., Duvail, J.L., Jiang, X.Y., Yin, H. L. (2014). Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Progress in Polymer Science*, 39, 862–890.
124. Liao, Y., Loh, C.-H., Tian, M., Wang, R., Fane, A.G. (2018). Progress in electrospun polymeric nanofibrous membranes for water treatment: Fabrication, modification and applications. *Progress in Polymer Science*, 77, 69–94.

125. Collins, G., Federici, J., Imura, Y., Catalani, L.H. (2012). Charge generation, charge transport, and residual charge in the electrospinning of polymers: A review of issues and complications. *Journal of Applied Physics*, 111, 044701.
126. Tong, H.-W., Wang, M. (2012). Negative voltage electrospinning and positive voltage electrospinning of tissue engineering scaffolds: a comparative study and charge retention on scaffolds. *Nano Life*, 02, 1250004.
127. Zhou, H., Shi, Z., Wan, X., Fang, H., Yu, D.-G., Chen, X., Liu, P. (2019). The relationships between process parameters and polymeric nanofibers fabricated using a modified coaxial electrospinning. *Nanomaterials*, 9, 843.
128. Sun, Z., Zussman, E., Yarin, A.L., Wendorff, J.H. Greiner, A. (2003). Compound Core–Shell Polymer Nanofibers by Co-Electrospinning. *Advanced Materials*, 15, 1929–1932.
129. Song, W., Yu, X., Markel, D.C., Shi, T., Ren, W. (2013). Coaxial PCL/PVA electrospun nanofibers: osseointegration enhancer and controlled drug release device. *Biofabrication*, 5, 035006.
130. Yarin, A.L. (2011). Coaxial electrospinning and emulsion electrospinning of core-shell fibers. *Polymers for Advanced Technologies*, 22, 310–317.
131. Mickova, A., Buzgo, M., Benada, O., Rampichová, M., Fisar, Z., Filova, E., Amler, E. (2012). Core/Shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system. *Biomacromolecules*, 13, 952–62.
132. Maleki, M., Latifi, M., Amani Tehran, M., Mathur, Dr.S. (2013). Electrospun core–shell nanofibers for drug encapsulation and sustained release. *Polymer Engineering & Science*, 53.
133. Bhardwaj, N., Kundu, S.C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28, 325–347.
134. Pham, Q.P., Sharma, U. (2006). Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Engineering*, 12(5), 1197-211.
135. Koski, A., Yim, K., Shivkumar, S. (2004). Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Materials Letters*, 58, 493–497.
136. Beachley, V., Wen, X. (2009) Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Materials Science and Engineering: C*, 29, 663–668.
137. Zahedi, P., Karami, Z., Rezaeian, I., Jafari, S.-H., Mahdaviani, P., Abdolghaffari, A.H., Abdollahi, M. (2012). Preparation and performance evaluation of tetracycline hydrochloride loaded wound dressing mats based on electrospun nanofibrous poly(lactic acid)/poly(ϵ-caprolactone) blends. *Journal of Applied Polymer Science*, 124, 4174–4183.
138. Thakur, R.A., Florek, C.A., Kohn, J., Michniak, B.B. (2008). Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 364, 87–93.
139. Torres-Giner, S., Martinez-Abad, A., Gimeno-Alcañiz, J.V., Ocio, M.J., Lagaron, J.M. (2012). Controlled Delivery of Gentamicin Antibiotic from Bioactive Electrospun Polylactide-Based Ultrathin Fibers. *Advanced Engineering Materials*, 14, 112–122.
140. Su, Y., Li, X., Wang, H., He, C., Mo, X. (2009). Fabrication and characterization of biodegradable nanofibrous mats by mix and coaxial electrospinning. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 2285–2294.
141. Sohrabi, A., Shaibani, P.M., Etayash, H., Kaur, K., Thundat, T. (2013). Sustained drug release and antibacterial activity of ampicillin incorporated poly(methyl methacrylate)–nylon6 core/shell nanofibers. *Polymer*, 54, 2699–2705.
142. Kalinov, K., Ignatova, M., Maximova, V., Rashkov, I., Manolova, N. (2014). Modification of electrospun poly(ε-caprolactone) mats by formation of a polyelectrolyte complex between poly(acrylic acid) and quaternized chitosan for tuning of their antibacterial properties. *European Polymer Journal*, 50, 18–29.
143. Nguyen, T.T.T., Chung, O.H., Park, J.S. (2011). Coaxial electrospun poly(lactic acid)/chitosan (core/shell) composite nanofibers and their antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 86, 1799–1806.
144. Lai, H.-J., Kuan, C.-H., Wu, H.-C., Tsai, J.-C., Chen, T.-M., Hsieh, D.-J., Wang, T. W. (2014). Tailored design of electrospun composite nanofibers with staged release of multiple angiogenic growth factors for chronic wound healing. *Acta Biomaterialia*, 10, 4156–4166.
145. Peh, P., Lim, N.S.J., Blocki, A., Chee, S.M.L., Park, H.C., Liao, S., Raghunath, M. (2015). Simultaneous delivery of highly diverse bioactive compounds from blend electrospun fibers for skin wound healing. *Bioconjugate Chemistry*, 26, 1348–1358.
146. Ceylan, M., Yang, S.-Y., Asmatulu, R. (2017). Effects of gentamicin-loaded PCL nanofibers on growth of Gram positive and Gram negative bacteria. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 5, 40-51.

147. Jin, G., Prabhakaran, M.P., Kai, D., Ramakrishna, S. (2013). Controlled release of multiple epidermal induction factors through core–shell nanofibers for skin regeneration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85, 689–698.
148. Chen, J.-P., Chang, G.-Y., Chen, J.-K. (2008). Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 313–314, 183–188.
149. Gu, S.-Y., Wang, Z.-M., Ren, J., Zhang, C.-Y. (2009). Electrospinning of gelatin and gelatin/poly(l-lactide) blend and its characteristics for wound dressing. *Materials Science and Engineering: C*, 29, 1822–1828.
150. Zhang, Y.Z., Venugopal, J., Huang, Z.-M., Lim, C.T., Ramakrishna, S. (2005). Characterization of the Surface Biocompatibility of the Electrospun PCL-Collagen Nanofibers Using Fibroblasts. *Biomacromolecules*, 6, 2583–2589.
151. Lin, J., Li, C., Zhao, Y., Hu, J., Zhang, L.-M. (2012). Co-electrospun Nanofibrous Membranes of Collagen and Zein for Wound Healing. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 4, 1050–1057.
152. Chuysinuan, P., Chimnoi, N., Techasakul, S., Supaphol, P. (2009). Gallic Acid-Loaded Electrospun Poly(L-Lactic Acid) Fiber Mats and their Release Characteristic. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 210, 814–822.
153. Lu, H., Feng, Z., Gu, Z., Liu, C. (2009). Growth of outgrowth endothelial cells on aligned PLLA nanofibrous scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 1937–1944.
154. Pakravan, M., Heuzey, M.-C., Ajji, A. (2012). Core–Shell Structured PEO-Chitosan Nanofibers by Coaxial Electrospinning. *Biomacromolecules*, 13, 412–421.
155. Choi, J.S., Leong, K.W., Yoo, H.S. (2008). In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). *Biomaterials*, 29, 587–596.
156. Jiang, H., Wang, L., Zhu, K. (2014). Coaxial electrospinning for encapsulation and controlled release of fragile water-soluble bioactive agents. *Journal of Controlled Release*, 193, 296–303.
157. Khodkar, F., Ebrahimi, N.G. (2017). Preparation and properties of antibacterial, biocompatible core–shell fibers produced by coaxial electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science*, 134.
158. António, M., Nogueira, J., Vitorino, R., Daniel-da-Silva, A.L. (2018). Functionalized gold nanoparticles for the detection of c-reactive protein. *Nanomaterials*, 8, 200.
159. Badami, A., Kreke, M., Thompson, M., Riffle, J., Goldstein, A. (2006). Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates. *Biomaterials*, 27, 596–606.
160. Wang, X., Wang, Q., Huang, F., Wei, Q. (2016). The morphology of Taylor cone influenced by different coaxial composite nozzle structures. *Fibers and Polymers*, 17, 624–629.
161. Huang, S., Chen, H.-J., Deng, Y.-P., You, X., Fang, Q., Lin, M. (2020). Preparation of novel stable microbicidal hydrogel films as potential wound dressing. *Polymer Degradation and Stability*, 181, 109349.
162. Singh, B., Pal, L. (2012). Sterculia crosslinked PVA and PVA-poly(AAm) hydrogel wound dressings for slow drug delivery: Mechanical, mucoadhesive, biocompatible and permeability properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 9, 9–21.
163. Chen, M., Patra, P.K., Warner, S.B., Bhowmick, S. (2007). Role of Fiber Diameter in Adhesion and Proliferation of NIH 3T3 Fibroblast on Electrospun Polycaprolactone Scaffolds. *Tissue Engineering*, 13, 579–587.
164. Abdel-Mohsen, A.M., Jancar, J., Massoud, D., Fohlerova, Z., Elhadidy, H., Spotz, Z., Hebeish, A. (2016). Novel chitin/chitosan-glucan wound dressing: Isolation, characterization, antibacterial activity and wound healing properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 510, 86–99.
165. Jiao, Y., Liu, Z., Zhou, C. (2007). Fabrication and characterization of PLLA-chitosan hybrid scaffolds with improved cell compatibility. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 80, 820–825.
166. Ao, H., Jiang, W., Nie, Y., Zhou, C., Zong, J., Liu, M., Wan, Y. (2020). Engineering quaternized chitosan in the 3D bacterial cellulose structure for antibacterial wound dressings. *Polymer Testing*, 86, 106490.
167. Peng, C.-C., Liao, W.-H., Chen, Y.-H., Wu, C.-Y., Tung, Y.-C. (2013). A microfluidic cell culture array with various oxygen tensions. *Lab on a Chip*, 13, 3239–3245.
168. Lall, N., Henley-Smith, C.J., De Canha, M.N., Oosthuizen, C.B., Berrington, D. (2013). Viability Reagent, PrestoBlue, in Comparison with Other Available Reagents, Utilized in Cytotoxicity and Antimicrobial Assays. *International Journal of Microbiology*, 2013, e420601.
169. You, M., Peng, G., Li, J., Ma, P., Wang, Z., Shu, W., Chen, G. Q. (2011). Chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds coated with PHA granule binding protein PhaP fused with RGD peptide. *Biomaterials*, 32, 2305–2313.

170. Noriega, S.E., Hasanova, G.I., Schneider, M.J., Larsen, G.F., Subramanian, A. (2012). Effect of Fiber Diameter on the Spreading, Proliferation and Differentiation of Chondrocytes on Electrospun Chitosan Matrices. *Cells, Tissues, Organs*, 195, 207–221.
171. Yan, L., Wang, H., Xu, H., Zheng, R., Shen, Z. (2020). Epidermal stimulating factors-gelatin/polycaprolactone coaxial electrospun nanofiber: ideal nanoscale material for dermal substitute. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 0, 1–16.
172. Hebbar, R.S., Isloor, A.M., Ismail, A.F. (2017). Chapter 12 - Contact Angle Measurements. In Hilal, N., Ismail, A.F., Matsuura, T., Oatley-Radcliffe, D. (eds), *Membrane Characterization*. Elsevier, 219–255.
173. Tort, S., Acartürk, F., Beşikci, A. (2017). Evaluation of three-layered doxycycline-collagen loaded nanofiber wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 529, 642–653.
174. Katas, H., Lim, C.S., Nor Azlan, A.Y.H., Buang, F., Mh Busra, M.F. (2019). Antibacterial activity of biosynthesized gold nanoparticles using biomolecules from Lignosus rhinocerotis and chitosan. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27, 283–292.
175. Yılmaz Atay, H., Çelik, E. (2017). Investigations of antibacterial activity of chitosan in the polymeric composite coatings. *Progress in Organic Coatings*, 102, 194–200.
176. Alippilakkotte, S., Kumar, S., Sreejith, L. (2017). Fabrication of PLA/Ag nanofibers by green synthesis method using Momordica charantia fruit extract for wound dressing applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 529, 771–782.
177. Martí, M., Frígols, B., Serrano-Aroca, A. (2018). Antimicrobial Characterization of Advanced Materials for Bioengineering Applications. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (138):57710.
178. Chen, D.-R. (2007). Investigation of compound jet electrospray: Particle encapsulation. *Physics of Fluids - PHYS FLUIDS*, 19.
179. Bazrafshan, Z., Stylios, G.K. (2019). Spinnability of collagen as a biomimetic material: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 693–705.
180. Baek, J., Sovani, S., Choi, W., Jin, S., Grogan, S.P., D'Lima, D.D. (2018). Meniscal Tissue Engineering Using Aligned Collagen Fibrous Scaffolds: Comparison of Different Human Cell Sources. *Tissue Engineering. Part A*, 24, 81–93.
181. Zhou, Y., Yao, H., Wang, J., Wang, D., Liu, Q., Li, Z. (2015). Greener synthesis of electrospun collagen/hydroxyapatite composite fibers with an excellent microstructure for bone tissue engineering. *International journal of nanomedicine*, 10, 3203–15.
182. Powell, H., Supp, D., Boyce, S. (2008). Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes. *Biomaterials*, 29, 834–843.
183. Fitzgerald, R., Bass, L.M., Goldberg, D.J., Graivier, M.H., Lorenc, Z.P. (2018). Physiochemical Characteristics of Poly-L-Lactic Acid (PLLA). *Aesthetic Surgery Journal*, 38, S13–S17.
184. Yang, W., He, N., Li, Z. (2016). Rapamycin Release Study of Porous Poly(L-lactic acid) Scaffolds, Prepared via Coaxial Electrospinning. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16, 9404–9412.
185. Ji, X., Yang, W., Wang, T., Mao, C., Guo, L., Xiao, J., He, N. (2013). Coaxially electrospun core/shell structured poly(l-lactide) acid/chitosan nanofibers for potential drug carrier in tissue engineering. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 9, 1672–1678.
186. Sun, B., Duan, B., Yuan, X. (2006). Preparation of core/shell PVP/PLA ultrafine fibers by coaxial electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science*, 102, 39–45.
187. McCann, J.T., Li, D., Xia, Y. (2005). Electrospinning of nanofibers with core-sheath, hollow, or porous structures. *Journal of Materials Chemistry*, 15, 735–738.
188. Yu, J.H., Fridrikh, S., Rutledge, G.C. (2004). Production of Submicrometer Diameter Fibers by Two-Fluid Electrospinning. *Advanced Materials*, 16, 1562–1566.
189. Gonçalves, R.P., Silva, F.F.F. da, Picciani, P.H.S., Dias, M.L. (2015). Morphology and Thermal Properties of Core-Shell PVA/PLA Ultrafine Fibers Produced by Coaxial Electrospinning. *Materials Sciences and Applications*, 06, 189.
190. Buzgo, M., Mickova, A., Rampichova, M., Doupnik, M. (2018). 11- Blend electrospinning, coaxial electrospinning, and emulsion electrospinning techniques. In Focarete, M.L., Tampieri, A. (Eds), *Core-Shell Nanostructures for Drug Delivery and Theranostics*. Woodhead Publishing, 325–347.
191. Blackstone, B.N., Drexler, J.W., Powell, H.M. (2014). Tunable Engineered Skin Mechanics via Coaxial Electrospun Fiber Core Diameter. *Tissue Engineering Part A*, 20, 2746–2755.
192. Zhang, M., Li, Z., Liu, L., Sun, Z., Ma, W., Zhang, Z., Zhang, R., Sun, D. (2016). Preparation and Characterization of Vancomycin-Loaded Electrospun Rana chensinensis Skin Collagen/Poly(L-lactide) Nanofibers for Drug Delivery. *Journal of Nanomaterials*, e9159364.
193. Pant, B., Park, M., Park, S.-J. (2019). Drug delivery applications of core-sheath nanofibers prepared by coaxial electrospinning: A Review. *Pharmaceutics*, 11, 305.

194. Han, D., Steckl, A.J. (2019). Coaxial electrospinning formation of complex polymer fibers and their applications. *ChemPlusChem*, 84, 1453–1497.
195. Sylvester, M.A., Amini, F., Tan, C.K. (2020). Electrospun nanofibers in wound healing. *Materials Today: Proceedings*, 29, 1–6.
196. Andreu, V., Mendoza, G., Arruebo, M., Irusta, S. (2015). Smart Dressings Based on Nanostructured Fibers Containing Natural Origin Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Regenerative Compounds. *Materials*, 8, 5154–5193.
197. Wei, Q., Xu, F., Xu, X., Geng, X., Ye, L., Zhang, A., Feng, Z. (2016). The multifunctional wound dressing with core–shell structured fibers prepared by coaxial electrospinning. *Frontiers of Materials Science*, 10, 113–121.
198. Alharbi, H.F., Luqman, M., Khalil, K.A., Elnakady, Y.A., Abd-Elkader, O.H., Rady, A.M., Alharthy N.H, Karim M.R. (2018). Fabrication of core-shell structured nanofibers of poly (lactic acid) and poly (vinyl alcohol) by coaxial electrospinning for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 98, 483–491.
199. Zahedi, E., Esmaeili, A., Eslahi, N., Shokrgozar, M.A., Simchi, A. (2019). Fabrication and characterization of core-shell electrospun fibrous mats containing medicinal herbs for wound healing and skin tissue engineering. *Marine Drugs*, 17, 27.
200. Wang, Y., Guo, H., Ying, D. (2013). Multilayer scaffold of electrospun PLA–PCL–collagen nanofibers as a dural substitute. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 101, 1359–1366.
201. Banerjee, A. (2008). Thermal and morphological analysis of collagen-PLLA electrospun blends. *Thesis*.
202. Kishan, A.P., Cosgriff-Hernandez, E.M. (2017). Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review: Advancements in electrospinning design for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105, 2892–2905.
203. Qin, Y. (2008). The gel swelling properties of alginate fibers and their applications in wound management. *Polymers for Advanced Technologies*, 19, 6–14.
204. Rottmar, M., Richter, M., Mäder, X., Grieder, K., Nuss, K., Karol, A., von Rechenberg, B., Zimmermann, E., Buser, S., Dobmann, A., Blume, J., & Bruinink, A. (2015). In vitro investigations of a novel wound dressing concept based on biodegradable polyurethane. *Science and technology of advanced materials*, 16(3), 034606.
205. Proikakis, C., Mamouzelos, N., Tarantili, P., Andreopoulos, A. (2006). Swelling and hydrolytic degradation of poly(d, l-lactic acid) in aqueous solutions. *Polymer Degradation and Stability*, 91, 614–619.
206. Peng, H., Varanasi, S., Wang, D.K., Blakey, I., Rasoul, F., Symons, A., Hill, D.J.T., Whittaker, A.K. (2016). Synthesis, swelling, degradation and cytocompatibility of crosslinked PLLA-PEG-PLLA networks with short PLLA blocks. *European Polymer Journal*, 84, 448–464.
207. Zhou, J., Yao, D., Qian, Z., Hou, S., Li, L., Jenkins, A.T.A., Fan, Y. (2018). Bacteria-responsive intelligent wound dressing: Simultaneous In situ detection and inhibition of bacterial infection for accelerated wound healing. *Biomaterials*, 161, 11–23.
208. Paddle-Ledinek, J.E., Nasa, Z., Cleland, H.J. (2006). Effect of Different Wound Dressings on Cell Viability and Proliferation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117, 110S.
209. Azam, A., Ahmed, F., Arshi, N., Chaman, M., Naqvi, A.H. One step synthesis and characterization of gold nanoparticles and their antibacterial activities against E. coli (ATCC 25922 strain).of Theoretical & Applied Sciences, *International Journal of Theoretical & Applied Sciences*, 1, 1-4.
210. Mohamed, M.M., Fouad, S.A., Elshoky, H.A., Mohammed, G.M., Salaheldin, T.A. (2017). Antibacterial effect of gold nanoparticles against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 5, 23–29.
211. Dykman, L. A., Khlebtsov, N. G. (2017). Immunological properties of gold nanoparticles. *Chemical science*, 8, 1719-1735.
212. Shamaila, S., Zafar, N., Riaz, S., Sharif, R., Nazir, J., Naseem, S. (2016). Gold Nanoparticles: An Efficient Antimicrobial Agent against Enteric Bacterial Human Pathogen. *Nanomaterials*, 6, 71.
213. Yeh, Y.-C., Creran, B., Rotello, V.M. (2012). Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, 4, 1871–1880.
214. Nanda, A., Belliraj, R.,, Ragunathan (2015). In-vitro hepatoprotective activity of Moringa oleifera mediated synthesis of gold nanoparticles. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7, 781–788.
215. Lin, C., Tao, K., Hua, D., Ma, Z., Zhou, S. (2013). Size Effect of Gold Nanoparticles in Catalytic Reduction of p-Nitrophenol with NaBH4. *Molecules*, 18, 12609–12620.
216. DePablo, J. (2015). Nanoparticles in liquid crystals, and liquid crystals in nanoparticles. 12. AIChE Annual Meeting.

217. Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Jahnen-Dechent, W. (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 3, 1941–1949.
218. Zhou, Y., Kong, Y., Kundu, S., Cirillo, J.D., Liang, H. (2012). Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against Escherichia coli and bacillus Calmette-Guérin. *Journal of Nanobiotechnology*, 10, 19.
219. Ujang, Z., Rashid, A.H.A., Suboh, S.K., Halim, A.S., Lim, C.K. (2014). Physical Properties and Biocompatibility of Oligochitosan Membrane Film as Wound Dressing. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 12, 155–162.
220. Maver, T., Hribernik, S., Mohan, T., Maja Smrke, D., Maver, U., Stana-Kleinschek, K. (2015). Functional wound dressing materials with highly tunable drug release properties. *RSC Advances*, 5, 77873–77884.
221. Ahlawat, J., Kumar, V., Gopinath, P. (2019). Carica papaya loaded poly (vinyl alcohol)-gelatin nanofibrous scaffold for potential application in wound dressing. *Materials Science and Engineering: C*, 103, 109834.
222. Singh, B., Varshney, L., Francis, S., Rajneesh (2017). Synthesis and characterization of tragacanth gum based hydrogels by radiation method for use in wound dressing application. *Radiation Physics and Chemistry*, 135, 94–105.
223. Pivec, T., Peršin, Z., Kolar, M., Maver, T., Dobaj, A., Vesel, A., Stana-Kleinschek, K. (2014). Modification of cellulose non-woven substrates for preparation of modern wound dressings. *Textile Research Journal*, 84, 96–112.
224. Field, C.K., Kerstein, M.D. (1994) Overview of wound healing in a moist environment. *The American Journal of Surgery*, 167, S2–S6.
225. Zhang, D., Zhou, W., Wei, B., Wang, X., Tang, R., Nie, J., Wang, J. (2015). Carboxyl-modified poly(vinyl alcohol)-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 125, 189–199.
226. Mi, F.-L., Shyu, S.-S., Wu, Y.-B., Lee, S.-T., Shyong, J.-Y., Huang, R.-N. (2001). Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*, 22, 165–173.
227. Lee, Y. M., Kim, S. S., Park, M. H., Song, K. W., Sung, Y. K., Kang, I. K. (2000). β-Chitin-based wound dressing containing silver sulfurdiazine. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 11, 817-823.
228. Rezvanian, M., Amin, M.C.I.M., Ng, S.-F. (2016). Development and physicochemical characterization of alginate composite film loaded with simvastatin as a potential wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 137, 295–304.
229. Dinh, T., Braunagel, S., Rosenblum, B.I. (2015). Growth factors in wound healing: the present and the future? *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, 32, 109–119.
230. Li, X., Ye, X., Qi, J., Fan, R., Gao, X., Wu, Y., Guo, G. (2016). EGF and curcumin co-encapsulated nanoparticle/hydrogel system as potent skin regeneration agent. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 3993–4009.
231. Norouzi, M., Soleimani, M. (2016). Chapter 28- EGF-Loaded Nanofibers for Skin Tissue Engineering. In Hamblin, M.R., Avci, P., Prow, T.W. (Eds), *Nanoscience in Dermatology*. Academic Press, Boston, pp. 367–373.
232. Perez, R.A., Kim, H.-W. (2015). Core–shell designed scaffolds for drug delivery and tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 21, 2–19.
233. Li, H., Xu, Y., Xu, H., Chang, J. (2014). Electrospun membranes: control of the structure and structure related applications in tissue regeneration and drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 2, 5492–5510.
234. Cheng, G., Ma, X., Li, J., Cheng, Y., Cao, Y., Wang, Z., Li, Z. (2018). Incorporating platelet-rich plasma into coaxial electrospun nanofibers for bone tissue engineering. *International Journal of Pharmaceutics*, 547, 656–666.
235. Choi, J.S., Choi, S.H., Yoo, H.S. (2011). Coaxial electrospun nanofibers for treatment of diabetic ulcers with binary release of multiple growth factors. *Journal of Materials Chemistry*, 21, 5258–5267.
236. Ulubayram, K., Nur Cakar, A., Korkusuz, P., Ertan, C., Hasirci, N. (2001). EGF containing gelatin-based wound dressings. *Biomaterials*, 22, 1345–1356.
237. Naseri-Nosar, M., Ziora, Z.M. (2018). Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites. *Carbohydrate Polymers*, 189, 379–398.
238. Zhang, X., Yang, D., Nie, J. (2008). Chitosan/polyethylene glycol diacrylate films as potential wound dressing material. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 456–462.

239. Fiqrianti, I.A., Widiyanti, P., Manaf, M.A., Savira, C.Y., Cahyani, N.R., Bella, F.R. (2018). Poly-L-lactic Acid (PLLA)-Chitosan-Collagen Electrospun Tube for Vascular Graft Application. *Journal of Functional Biomaterials*, 9.
240. Cramariuc, B., Cramariuc, R., Scarlet, R., Manea, L.R., Lupu, I.G., Cramariuc, O. (2013). Fiber diameter in electrospinning process. *Journal of Electrostatics*, 71, 189–198.
241. Kim, K., Luu, Y.K., Chang, C., Fang, D., Hsiao, B.S., Chu, B., Hadjiargyrou, M. (2004). Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 98, 47–56.
242. Fan, J., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, Y., Cao, F., Yang, Q., Tian, F. (2019). Explanation of the cell orientation in a nanofiber membrane by the geometric potential theory. *Results in Physics*, 15, 102537.
243. Zhao, T., Jiang, L. (2018). Contact angle measurement of natural materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161, 324–330.
244. Wu, S., Lan, X., Zhao, W., Li, Y., Zhang, L., Wang, H., Tao, S. (2011). Controlled immobilization of acetylcholinesterase on improved hydrophobic gold nanoparticle/Prussian blue modified surface for ultra-trace organophosphate pesticide detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 27, 82–87.
245. Yue, M., Zhou, B., Jiao, K., Qian, X., Xu, Z., Teng, K., Jiao, Y. (2015). Switchable hydrophobic/hydrophilic surface of electrospun poly (l-lactide) membranes obtained by CF4 microwave plasma treatment. *Applied Surface Science*, 327, 93–99.